

**FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DO MUNICÍPIO DE ASSIS
INSTITUTO MUNICIPAL DE ENSINO SUPERIOR DE ASSIS**

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**AVALIAR O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPO
DORSAL DE WAY 100635 UM ANTAGONISTA DE RECEPTOR
5HT_{1A} SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS
AO LABIRINTO EM T ELEVADO**

**ASSIS
2009**

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**AVALIAR O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPO
DORSAL DE WAY 100635 UM ANTAGONISTA DE RECEPTOR
5HT_{1A} SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS
AO LABIRINTO EM T ELEVADO**

Monografia apresentada ao
Instituto Municipal de Ensino
Superior de Assis – IMESA, como
requisito para obtenção do Título
de Bacharel em Enfermagem

Orientadora:
Prof^a. Dr.^a Lucinéia dos Santos

ASSIS

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Viviane Batista Estrada

Título: Avaliar o efeito da administração intra-hipocampo dorsal de WY 100635 um antagonista de receptor 5HT1A sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em T elevado.

Monografia apresentada ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a.

Instituição: _____

Julgamento:

Assinatura: _____

Prof^a.

Instituição: _____

Julgamento:

Assinatura: _____

Prof^a.

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Atilio Estrada Capriole e Marina Batista Estrada (*In Memória*) os maiores amores da minha vida a quem dedico todas as minhas vitórias.

AGRADECIMENTO

A Deus pela oportunidade concedida.

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão.

Minha orientadora Lucinéia dos Santos por compartilhar seu conhecimento, pela sua atenção, apoio e incentivo.

As minhas colegas Emy e Marli pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Fisiologia pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da Unesp, pela concessão do espaço e materiais para a realização da pesquisa.

Aos meus amigos da 1ª Turma de Enfermagem da Fema.

RESUMO

Este estudo investigou o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} presentes no hipocampo dorsal na mediação das respostas comportamentais de defesas geradas no labirinto em T elevado (LTE) bem como avaliou a influência da imobilização prévia e do isolamento, sobre o efeito da injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635, um antagonista de receptor 5-HT_{1A} e investigou o efeito de WAY 100635 sobre a atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do campo aberto. Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de 250 gramas. Concluiu-se que a exposição prévia, a imobilização e ao isolamento alteraram as respostas de esquiva no LTE, não alterando os resultados de fuga, estes resultados sugerem que no LTE, os agentes estressores estão preferencialmente envolvidos na regulação e manifestação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada e não ao pânico. Por fim, a administração intra-hipocampo dorsal do WAY 100635 não alterou a atividade locomotora dos animais.

Palavras-Chave: Ansiedade Generalizada. Hipocampo Dorsal. Receptores 5HT_{1A}. WAY 100635.

ABSTRACT

This study investigated the involvement of serotonergic 5-HT_{1A} present in the dorsal hippocampus in mediating the behavioral responses of defenses generated in the elevated T (LTE). For this we evaluated the influence of prior restraint and isolation on the effect of intra-dorsal hippocampus of WAY 100635, an antagonist of 5-HT_{1A} receptor and the effect of WAY 100635 on the locomotor activity of animals in the open field test. This project was developed in the Laboratory of Physiology from the Department of Biological Sciences, UNESP-Assis. We used male Wistar rats with average weight of 250 grams. The results showed that prior exposure to immobilization and isolation increased avoidance responses in LTE, while not altering the results of flight, suggesting that the LTE stressor agents are preferentially involved in the regulation and expression of defensive behaviors related to generalized anxiety and not panic. Moreover, as WAY 100635 reversed the anxiogenic response generated by stress agents in the previous LTE is likely that this response is related to increased release of 5-HT in dorsal hippocampus and 5-HT_{1A} receptors postsynaptic present in this region are recruited during acquisition of inhibitory avoidance. Furthermore we observed that 5-HT_{1A} receptors of the dorsal hippocampus do not seem to account for changes in motor activity of animals.

Keywords: Generalized Anxiety. Dorsal hippocampus. 5HT_{1A} receptors. WAY 100635.

LISTA DE FIGURAS

Labirinto em T elevado	p.20
Campo aberto	p.20
Anestesia intraperitoneal	p.21
Aparelho esteriotáxico	p.22
Exposição da calvária	p.23
Fixação do parafuso de aço inoxidável.....	p.23
Utilização de resina acrílica autopolimerizável	p.24
Latência de esquiva inibitória e fuga	p.30
Média do número de quadrados percorridos no teste de campo aberto.....	p.31

SUMÁRIO

1. Introdução	p.9
2. Problema e problematização	p.11
3. Objetivo	p.12
3.1 Geral	p.12
3.2 Especifico	p.12
4. Justificativa	p.13
5. Revisão da literatura	p.15
6. Metodologia	p.19
6.1. Animais	p.19
6.2. Materiais e aparatos utilizados	p.19
6.3. Droga	p.20
6.4. Procedimentos	p.21
6.4.1. Cirurgia	p.21
6.4.2. Análises comportamentais	p.24
6.4.3 Perfusão	p.27
6.4.4. Histologia	p.27
6.4.4. Análise dos dados	p.27
7. Resultados	p.28
8. Discussão	p.32
9. Bibliografia	p.34

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é um estado emocional subjetivamente vivenciado como não prazeroso e desconfortável, que se origina nas reações de defesa, geradas frente a estímulos ou situações aversivas que normalmente se encontram presentes no meio em que vivemos. Sua expressão envolve mudanças do humor e da cognição, que são acompanhadas por alterações comportamentais e fisiológicas, tais como taquicardia, sudorese, aumento da tensão muscular, inquietude e alerta. No entanto, quando manifestada em níveis adequados e normais, a ansiedade é importante para a motivação e desempenho do indivíduo, ativando e mobilizando o organismo à sua adaptação ao ambiente (PRATT, 1992; GRAEFF, 1994, 1999). O limite entre o que se denomina ansiedade normal e patológica é muitas vezes difícil de estabelecer. Sabe-se que a ansiedade torna-se patológica quando a resposta ao estímulo recebido torna-se exagerada e irracional, interferindo no funcionamento do indivíduo e perturbando acentuadamente o seu desempenho em diversas atividades (PRATT, 1992; GRAEFF, 1994, 1999).

Na tentativa de melhor entender este estado emocional, propostas têm sido feitas associando reações específicas de defesa a determinados distúrbios de ansiedade reconhecidos clinicamente, tais como, a ansiedade generalizada, as fobias específicas e o distúrbio do pânico (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993; GRAY; McNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2002). Em adição, também tem sido descrito que experiências estressantes prévias podem modificar as respostas comportamentais de defesa diante de estímulos ou situações aversivas (GUIMARÃES et al., 1993; MENDONÇA NETTO E GUIMARÃES, 1996; MENDONÇA NETTO E GUIMARÃES, 1998; PADOVAN E GUIMARÃES, 2000).

Em paralelo às pesquisas que visam relacionar as reações específicas de defesa aos distúrbios de ansiedade, muitas têm sido as tentativas em associar cada nível de defesa com a estrutura encefálica responsável pela expressão da resposta comportamental (GRAEFF, 2002).

Assim como, vários estudos procuram elucidar as bases neuroquímicas destes comportamentos.

A partir desses estudos, a serotonina (5-HT) tem se destacado como um importante mediador de padrões comportamentais e autonômicos relacionados a este estado emocional, por consequência, no mecanismo de ação de drogas ansiolíticas (GRAEFF, 1981, 1993, 1994, 1999; GRIEBEL, 1995; GRAY; McNAUGHTON, 2000; ZANGROSSI JR. et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2002). Entretanto, resultados conflitantes têm sido relatados, mostrando que a 5-HT aumenta (GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; HODGES et al., 1987; WISE et al., 1972; TYE et al., 1977) ou diminui a ansiedade (KISER et al., 1980; HODGES et al., 1987).

A variabilidade das funções da serotonina nas respostas de defesa deve-se não somente a diversidade de suas vias, mas também a presença de diferentes tipos e subtipos de receptores 5-HT no sistema nervoso central.

Até o presente momento, estão determinadas sete famílias dos receptores serotoninérgicos, 5-HT₁₋₇, compreendendo um total de 14 subtipos do receptor 5-HT em mamíferos, que se diferenciam tanto estruturalmente, como farmacologicamente (BARNES; SHARP, 1999). De todos os receptores caracterizados, os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} (KOEK et al., 1992), 5-HT₃ (COSTALL; NAYLOR, 1991) e 5-HT₇ (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004) têm sido associados à ansiedade.

2. PROBLEMA E PROBLEMATIZAÇÃO

2.1 Problema

Devido à complexidade do sistema nervoso, bem como do sistema serotoninérgico, inúmeras são as dificuldades na elucidação do papel da 5-HT e de seu receptor 5-HT_{1A} na mediação do distúrbio de ansiedade.

2.2 Problematização

O sistema nervoso central possui mais de um mecanismo de controle sobre a ansiedade, e estes são diferentemente modulados pela neurotransmissão serotoninérgica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} presentes no hipocampo dorsal, uma estrutura encefálica, na mediação das respostas comportamentais de defesa geradas no labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal de ansiedade que procura gerar em um mesmo rato duas respostas defensivas: a esquiva inibitória e a fuga que têm sido relacionadas, respectivamente, à ansiedade generalizada e ao pânico.

3.2 Específicos

Avaliar a influência da imobilização prévia e do isolamento, condições de estresse, no processamento das respostas comportamentais de defesa geradas em ratos submetidos ao LTE.

Avaliar a influência da imobilização prévia e do isolamento, sobre o efeito da injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}, em ratos submetidos ao LTE.

Investigar o efeito de WAY 100635 sobre a atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do campo aberto.

4. JUSTIFICATIVA

Dos nove núcleos (B1 a B9) contendo corpos de neurônios serotoninérgicos existentes no tronco cerebral (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964), foi demonstrado que o núcleo mediano da rafe - NMR (B5 e B8) e o núcleo dorsal da rafe - NDR (B6 e B7) são os que apresentam um maior número de neurônios serotoninérgicos que se projetam ascendentemente para regiões prosencefálicas (TÖRK; HORNING, 1990). Dentro dessas regiões, o hipocampo, principalmente o dorsal, recebe densa inervação serotoninérgica do NMR (VERTES et al., 1999). Além disso, no hipocampo tem sido encontrado um grande número de receptores 5-HT_{1A} (HAMON, 1997; BARNES; SHARP, 1999).

Na tentativa de verificar se os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal estariam implicados na modulação da ansiedade generalizada gerada no LTE, Dos Santos e colaboradores (2005) observaram, após administração intra-hipocampo dorsal do WAY 100635, que os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos presentes no hipocampo dorsal não são recrutados durante a aquisição da resposta de esquiva inibitória gerada no LTE, ou seja, da ansiedade generalizada gerada neste modelo comportamental. Assim, a 5-HT liberada no hipocampo dorsal teria um papel modulatório, mas não de gerador da resposta de ansiedade generalizada medida no LTE. Entretanto, esses mesmos autores mostraram que o efeito ansiogênico, observado após a injeção de WAY 100635 no NMR, é abolido quando o mesmo antagonista serotoninérgico é injetado no hipocampo dorsal. Portanto, receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal estariam implicados nas conseqüências comportamentais da manipulação farmacológica seletiva de neurônios serotoninérgicos no NMR.

Portanto, diante dos resultados encontrados falta ainda responder a seguinte pergunta: A exposição prévia dos animais a situações estressantes pode alterar as respostas comportamentais de defesa geradas no LTE e também alterar o efeito da administração intra-hipocampo dorsal do WAY 100635, a ponto de recrutar a participação dos receptores 5-HT_{1A} presentes nesta estrutura?

Assim, diante dessa pergunta é possível perceber a necessidade da realização de novos estudos para a melhor compreensão do papel do hipocampo dorsal, bem como dos receptor 5-HT_{1A} na mediação da ansiedade gerada no LTE.

4. REVISÃO DA LITERATURA

Em 1991 Deakin e Graeff propuseram uma hipótese na qual sugeriram que o sistema nervoso central possui mais de um mecanismo de controle sobre a ansiedade, e que estes são diferentemente modulados pela neurotransmissão serotoninérgica. De acordo com esses autores, a via prosencefálica que se origina no NDR e inerva a amígdala e córtex frontal facilitaria os comportamentos defensivos expressos em resposta aos perigos potencial ou distal, por exemplo, a esquivia inibitória. Por outro lado, a via NDR-periventricular, que inerva a matéria cinzenta periaquedutal dorsal - MCPD, inibiria reações de fuga e luta em resposta ao perigo proximal. Finalmente, a via prosencefálica que conecta o NMR ao hipocampo aumentaria a resistência ou tolerância ao estresse crônico, pois modularia respostas desencadeadas por eventos aversivos continuados. Deakin e Graeff (1991) ressaltaram que o mau funcionamento dos sistemas serotoninérgicos nestas vias levaria a distúrbios específicos de ansiedade ou de humor. Assim, a disfunção da via NDR/amígdala/córtex, NDR/MCPD e NMR/hipocampo levaria, respectivamente, aos distúrbios patológicos da ansiedade generalizada, pânico e depressão.

Evidências clínicas e comportamentais apóiam a hipótese proposta em 1991 por Deakin e Graeff sobre o papel dual da serotonina na ansiedade (DEAKIN et al., 1994; GRAEFF, 1993, 2002). Entretanto, alguns aspectos desta teoria merecem considerações. O NMR se projeta densamente para o hipocampo, preferencialmente para o hipocampo dorsal (VERTES et al., 1999) e uma quantidade significativa de neurônios serotoninérgicos participa dessas projeções (McKENNA; VERTES, 2001). Assim, este núcleo tem sido implicado no funcionamento do sistema de inibição comportamental proposto por Gray (para uma revisão ver GRAY; McNAUGHTON, 2000) e, conseqüentemente no processamento da ansiedade.

Segundo Gray e McNaughton (2000), no sistema de inibição comportamental, a participação do NMR é de fundamental importância, visto que a destruição deste núcleo leva a uma interrupção na transmissão de

informações ao hipocampo, fazendo com que o animal deixe de reconhecer o estímulo ameaçador em situações aversivas e aumente a sua atividade exploratória. Além do mais, tem sido mostrado que as drogas ansiolíticas clássicas ou mesmo da classe da buspirona exercem suas ações por inibir as vias serotoninérgicas ascendentes que partem do NMR e inervam o sistema septo-hipocampal (FUXE et al., 1975; GRAY, 1975; McNAUGHTON; MASON, 1980; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Em adição, tem sido observado que lesões do NMR geram sinais nítidos de desinibição comportamental, indicando redução de ansiedade (JACOBS et al., 1974; SREBRO; LORENS, 1975; JACOBS; COHEN, 1976; FILE; DEAKIN, 1980; ANDRADE et al., 1999; ANDRADE; GRAEFF, 2001), enquanto a estimulação elétrica desta estrutura induz respostas comportamentais e autonômicas características da reação emocional do rato a estímulos aversivos condicionados (GRAEFF; SILVEIRA FILHO, 1978).

Evidências, obtidas por Andrade e colaboradores (2004) no LTE, indicam que os neurônios presentes no NMR desempenham papel diferencial na regulação de comportamentos defensivos, que têm sido associados com subtipos específicos de distúrbios de ansiedade. O LTE é um modelo experimental de ansiedade que procura gerar em um mesmo rato duas respostas defensivas: a esquiva inibitória e a fuga que têm sido relacionadas, respectivamente, à ansiedade generalizada e ao pânico (GRAEFF et al., 1993; VIANA et al., 1994; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997; GRAEFF et al., 1998; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2002; POLTRONIERI et al., 2003).

Assim, Andrade e colaboradores (2004) procurando investigar a participação do NMR na mediação das respostas defensivas geradas no LTE, observaram que a lesão eletrolítica do NMR prejudica tanto a resposta de esquiva inibitória como a fuga, enquanto a destruição seletiva dos neurônios serotoninérgicos do NMR pela neurotoxina 5,7 DHT prejudica somente a esquiva inibitória.

Em complemento aos estudos realizados por Andrade e colaboradores (2004), resultados recentes obtidos com a manipulação

farmacológica do NMR mostraram que as duas respostas comportamentais de defesa observada no LTE, esquiva inibitória e fuga são afetadas por drogas que estimulam ou inibem de maneira não seletiva a atividade dos neurônios do NMR (DOS SANTOS et al., 2005). Diferentemente, a administração intra-NMR de drogas que interferem seletivamente com a atividade dos neurônios serotoninérgicos do NMR, afetaram somente a resposta de esquiva inibitória no LTE. Enquanto o 8-OH-DPAT, um agonista de receptores 5-HT_{1A}, prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, o WAY-100635, um antagonista dos mesmos receptores, facilitou a aquisição desse comportamento defensivo, sendo que as duas drogas não alteraram o comportamento de fuga (DOS SANTOS et al., 2005). A atividade locomotora dos animais foi alterada somente com a administração intra-NMR de drogas não seletivas aos neurônios serotoninérgicos.

Portanto, os resultados obtidos no LTE mostram que projeções serotoninérgicas que partem do NMR estão seletivamente envolvidas na modulação da esquiva inibitória, ou seja, de uma resposta defensiva relacionada à ansiedade generalizada (ANDRADE et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2005) e não com o pânico.

Estas respostas comportamentais observadas no LTE provavelmente refletem as conseqüências do aumento na liberação de 5-HT em estruturas chaves do sistema nervoso central, relacionadas ao medo e a ansiedade. Nesta direção tem sido mostrado que o hipocampo dorsal recebe grande inervação serotoninérgica do NMR (AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES, 1991; VERTES et al., 1999) e alta concentração de receptores 5-HT_{1A} são encontrados nesta região (MARCINKIEWICZ et al., 1984; PAZOS; PALACIONS, 1985).

Em adição, um aumento no nível de 5-HT no hipocampo dorsal tem sido associado com alterações na esquiva inibitória observada após estimulação dos neurônios 5-HT do NMR (DOS SANTOS et al., 2005). Esta associação tem sido baseada em estudos morfológicos, bem como, no papel funcional do hipocampo dorsal no processamento da memória e aprendizado (DAVIDSON; JARRARD, 2004; BERTOLIO et al., 2006).

Nesta direção, no LTE, Dos Santos e colaboradores (2005) mostraram que a administração intra-hipocampo dorsal do 8-OH-DPAT facilita a aquisição da esquiva inibitória, um efeito ansiogênico. Por outro lado, a injeção intra-hipocampo dorsal do WAY 100635, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}, não altera as respostas de esquiva inibitória. Esta ausência de efeito indica que receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos presentes no hipocampo dorsal não são recrutados durante a aquisição da resposta de esquiva inibitória gerada no LTE. Assim, a 5-HT liberada no hipocampo dorsal teria um papel modulatório, mas não de gerador da resposta de ansiedade generalizada medida no LTE. Entretanto, esses mesmos autores mostraram que o efeito ansiogênico, observado após a injeção de WAY 100635 no NMR, é abolido quando o mesmo antagonista serotoninérgico é injetado no hipocampo dorsal. Portanto, receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal estariam implicados nas conseqüências comportamentais da manipulação farmacológica seletiva de neurônios serotoninérgicos no NMR.

Por fim, considerando que experiências estressantes anteriores podem modificar as respostas comportamentais de defesa geradas diante de novos estímulos aversivos (GUIMARÃES et al., 1993 MENDONÇA NETTO; GUIMARÃES, 1996), iremos avaliar se os animais de laboratórios submetidos a uma situação prévia de estresse apresentarão um aumento de ansiedade no LTE, e se a resposta gerada será mediada por receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal.

6. METODOLOGIA

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis.

6.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de 250 gramas no início das sessões experimentais, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Após transporte ao biotério do laboratório de fisiologia, os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm) forradas com serragem (cinco animais por caixa) por um período mínimo de sete dias para ambientação. Após este período, os animais foram transportados individualmente até a sala de cirurgia, em uma caixa de polipropileno forrada com serragem medindo 28 x 17 x 13 cm. O biotério teve a temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e programa de iluminação artificial ativado (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Os animais receberam água e comida ad libitum durante todo o experimento.

4.2 Material e aparatos utilizados

Labirinto em T elevado - O LTE (Figura 1) é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura), elevados 50 cm em relação ao solo. Um dos braços é circundado por paredes laterais (40 cm de altura) e está disposto perpendicularmente aos dois outros braços que permanecem desprovidos de paredes. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são delimitados por uma proteção de 1 cm de altura (GRAEFF et al., 1993).

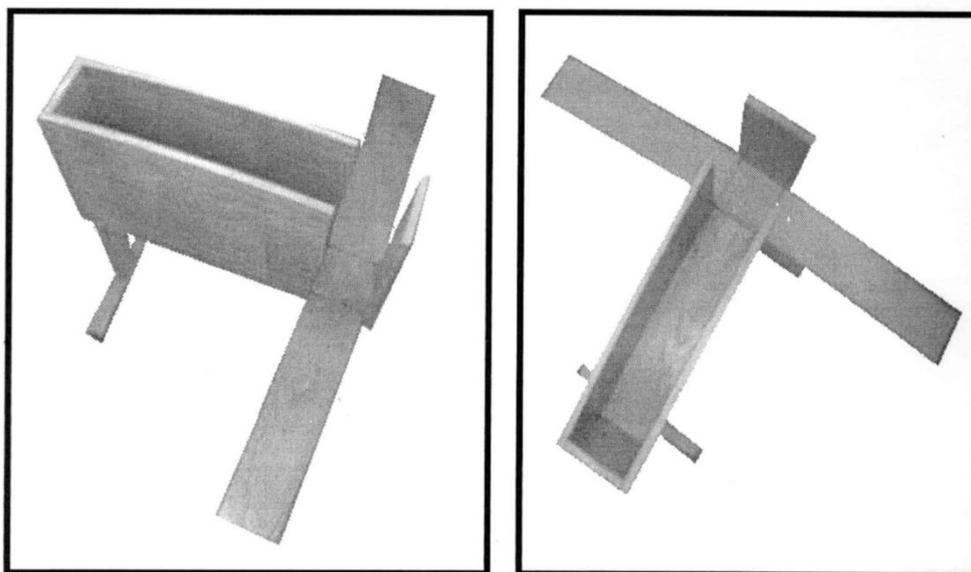


Figura 1 - Labirinto em T elevado

Campo aberto - O teste será conduzido em uma arena de madeira (Figura 2) medindo 60 x 60 cm, com 30 cm de altura e com nove quadrados demarcados (20 x 20 cm). A luminosidade medida tanto no labirinto, como na arena será de 50 lux.

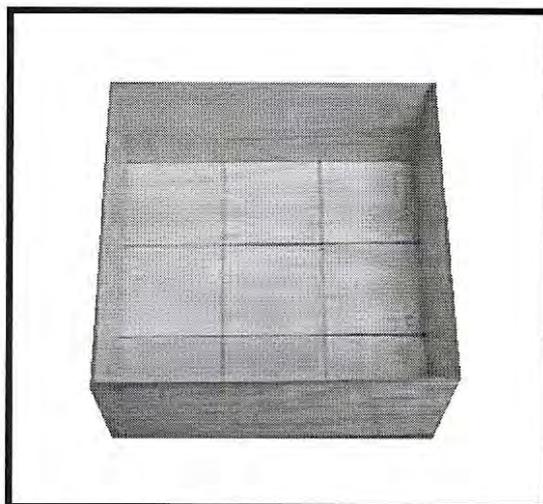


Figura 2 - Campo Aberto

4.3 Droga

- Maleato de WAY 100635 (*N*-[2-(4-[2-Metoxifenil]-1-piperazinil)etil]-*N*-2 piridinil-cic1ohexanocarboxamida, Sigma,

EUA) - diluído em salina estéril.

4.4 Procedimentos

6.4.1 Cirurgia

Implantação da cânula no hipocampo dorsal

Os animais foram anestesiados (Figura 3) com tribromoetanol (i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico (DAVID-KOPF, EUA) (Figura 4) pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após indução anestésica, uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi administrada (0,2 mL/animal, i.m.), a fim de prevenir possíveis infecções.



Figura 3 – Anestesia intraperitoneal



Figura 4 – Aparelho estereotáxico (DAVID-KOPF, EUA)

Após a tricotomia na região da cabeça, foi realizada a anti-sepsia do campo cirúrgico com polivinilpirrolidona-iodo à 1% (PVPI). Na região da incisão foi administrado, via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Poucos minutos depois, foi realizada a incisão longitudinal a fim de expor a calvária (figura 5) e remover o periósteo por raspagem.



Figura 5 – Exposição da calvária

Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, um orifício foi perfurado com uma broca dental para a fixação de um parafuso de aço inoxidável (Figura 6). Este parafuso serve como âncora da prótese de acrílico a ser disposta no crânio do animal.

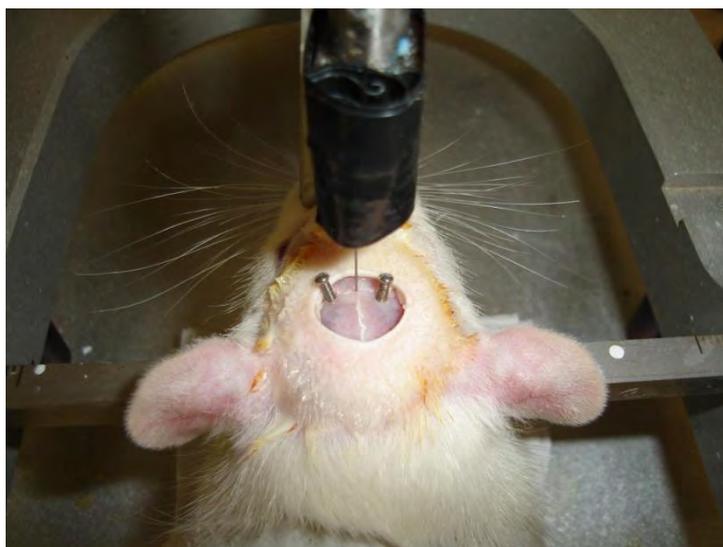


Figura 6 – Fixação do parafuso de aço inoxidável

Em seguida um orifício no osso parietal esquerdo foi feito para introdução da cânula-guia no NMR, tendo bregma como referência para cada plano de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1998) e com as seguintes coordenadas: ântero-posterior = -4.0 mm (bregma); Lateral = 2.8

mm; profundidade = 2.1 mm; inclinação da haste = 0 graus. A utilização de uma resina acrílica autopolimerizável (Figura 7) permitiu a fixação das cânulas guias à calota craniana.



Figura 7 – Utilização de resina acrílica autopolimerizável

Finalmente, foi introduzido, nas cânulas, um mandril de aço inoxidável para evitar entupimento, sendo que este também foi fixado com acrílico. Depois da cirurgia os animais foram alojados em pares em gaiolas de acrílico (20 × 19 × 35 cm) para recuperação, por sete dias, antes de serem testados.

6.4.2 Análises comportamentais

Habituação

No quarto e quinto dias depois do implante das cânulas guias, os animais foram habituados. Nesses dias, os animais foram transferidos para a sala em que o teste do LTE foi realizado. Nesta sala, cada animal, foi submetido ao manuseio do experimentador, uma vez ao dia, sempre no período da tarde, com duração de cinco minutos.

Exposição prévia ao braço aberto do LTE

No dia seguinte a última sessão de habituação, todos os animais foram deixados individualmente, por trinta minutos, em um dos braços abertos do LTE. Os braços abertos foram separados dos demais por

uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Este procedimento potencializa o comportamento de fuga por reduzir respostas comportamentais à novidade, tais como a exploração e a inibição do comportamento (TEIXEIRA et al., 2000).

Imobilização

Após a exposição prévia ao braço aberto do LTE os animais foram mantidos por 2 horas em uma caixa de metal (modelo descrito por GUIMARÃES et al., 1993) numa luminosidade de 190 lux.

Isolamento

Após a imobilização os animais foram mantidos isolados no biotério em uma caixa de caixa de polipropileno forrada com serragem medindo 28 x 17 x 13 cm.

Etapas e grupos experimentais

No sétimo dia, após o implante das cânulas guias, os ratos foram distribuídos em diferentes grupos de tratamento e a administração da droga em estudo foi realizada.

Assim, avaliamos o efeito da administração intra-hipocampo dorsal do WAY 100635 em ratos submetidos previamente a imobilização e isolamento. No grupo 1 os animais receberam injeção bilateral de salina no hipocampo dorsal (0,2 μ L). No grupo 2, os animais receberam injeção bilateral de 0,2 μ L de WAY 100635 (0,18 nmol). No grupo 3, os animais receberam injeção bilateral de 0,2 μ L de WAY 100635 (0,37 nmol). No grupo 4, os animais submetidos a imobilização receberam injeção bilateral de 0,2 μ L de WAY 100635 (0,74 nmol). Dez minutos após o término das injeções, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no LTE e no campo aberto.

A injeção intra-hipocampo dorsal da droga foi realizada introduzindo pela cânula guia uma agulha odontológica (Mizzy) até atingir o alvo 1,5 mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha foi acoplada a uma

microseringa (Hamilton 701-RN, EUA) de 10 μ L, conectada a uma extensão de tubo de polietileno (PE-10) preenchido com água. Para controle do volume e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba injetora digital de forma que um volume de 0,2 μ L da droga ou de salina seja injetado durante um minuto. A agulha permanecerá no local da injeção por mais um minuto para evitar o refluxo da droga. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno foi utilizado para verificar se a droga realmente foi microinjetada.

A dose a ser administrada foi escolhida de acordo com resultados prévios da literatura (DOS SANTOS et al., 2005; WIRTSHAFTER; McWILLIANS, 1987; ANDRADE et al., 2000).

Avaliação no labirinto em T elevado

O teste no LTE foi iniciado pela tomada da esquiva inibitória. Para verificar este comportamento, cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e foi medida a latência gasta pelo mesmo para sair deste braço com as quatro patas (Linha de base). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de trinta segundos entre elas (Esquiva 1 e Esquiva 2), quando o animal voltou para uma caixa individual de acrílico. O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tomadas de esquiva foi de cinco minutos. Depois deste período, o animal foi retirado pelo experimentador e colocado em sua caixa para dar continuidade ao teste.

Trinta segundos após o término da tomada da Esquiva 2, foi avaliado o comportamento de fuga. Para isso, cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto ao qual este animal foi exposto previamente no dia anterior, e foi medido o tempo gasto para a saída deste braço com as quatro patas (Fuga 1). A latência de saída de um dos braços abertos foi medida por mais duas vezes (Fuga 2 e Fuga 3) com intervalos de trinta segundos entre elas sendo que, neste intervalo, o animal permaneceu na caixa de acrílico. Posteriormente ao teste de cada animal, o labirinto foi limpo com álcool a 20%.

Avaliação no campo aberto

Trinta segundos após a tomada da Fuga 3, cada animal foi colocado individualmente no centro de campo aberto para observação da atividade locomotora. Durante 5 minutos foi registrado o número de quadrados percorridos pelo animal. Depois do teste de cada animal, o campo aberto foi limpo com álcool a 20%.

6.4.3 Perfusão

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana a 25% (3 mL/animal, ip.) e sofreram perfusão intra-cardíaca com salina seguida por formol a 10%. Depois da perfusão, foi inserida uma agulha odontológica (11,5 × 0,3 mm) pela cânula guia e injetado 0,2 µL do corante azul de Evans a 1 %. Os encéfalos foram removidos e armazenados em formol a 10%, até a data da confecção das lâminas histológicas.

6.4.4 Histologia

Os encéfalos foram cortados em secções coronais de 50 µm de espessura por meio de um criostato de congelamento (Leica CM1850) para verificação macroscópica do sítio de injeção, segundo a foto micrografias do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

6.4.5 Análise dos dados

As latências de esquiva inibitória e de fuga foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fatores independentes o tratamento e o estresse prévio (confinamento) e como medida repetida as diferentes tentativas efetuadas (Linha de base, Esquiva 1 e Esquiva 2 ou Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3). Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

A atividade locomotora no teste do campo aberto foi submetida a ANOVA de duas vias, tendo como fator independente o tratamento e o estresse prévio. Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

7. RESULTADOS

A Figura 1A mostra o efeito da injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635 sobre o comportamento de esquiva inibitória em ratos que foram submetidos ou não previamente a situação de estresse (confinamento). A ANOVA de medidas repetidas revelou aquisição da resposta de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,144)=99.89$; $p=0.000$]. Essas respostas foram alteradas pelo tratamento com WAY 100635 [fator tratamento: $F(3,72)=3.18$; $p=0.029$], mas não foram alteradas pelo confinamento [fator confinamento: $F(1,72)=1.22$; $p=0.273$]. Não houve interação entre os fatores tentativa e tratamento [fator interação: $F(6,72)=1.91$; 789]. Houve interação entre os fatores confinamento e tratamento [fator interação: $F(3,72)=2.90$; $p=0.041$] e entre os fatores confinamento e tentativa [fator interação: $F(2,144)=5.29$; $p=0.006$]. Não houve interação entre todos os fatores [fator interação: $F(6,142)=0.53$; $p=0.783$]. O teste de Duncan mostrou que na linha de base a esquiva inibitória foi facilitada pelo confinamento ($p<0,05$), sendo este efeito bloqueado pelo tratamento com WAY 100635 nas doses de 0,18 e 0,37 nmol ($p<0,05$). Na esquiva 2 a esquiva inibitória foi prejudicada pelo tratamento com WAY 100635 na dose de 0,18 nmol ($p<0,05$).

A Figura 1B mostra a ausência de efeito do confinamento e da injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635 sobre as respostas de fuga no LTE. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito estatisticamente significativo entre as diversas tentativas [fator tentativa: $F(2,144)=8.57$; $p=0.000$]. Observa-se que o tratamento não alterou as respostas de fuga [fator tratamento: $F(3,72)=0.13$; 0.943] sendo que o mesmo foi verificado com o confinamento [fator confinamento: $F(1,72)=1.71$; $p=0.195$]. Não houve interação entre os fatores tentativa e tratamento [fator interação: $F(6,144)=0.75$; $p=0.611$]. Houve interação entre os fatores confinamento e tentativa [fator interação: $F(2,144)=3.46$; $p=0.034$], mas não houve entre os fatores confinamento e tratamento [fator interação: $F(2,72)=0.76$; $p=0.522$]. Não houve interação entre todos os fatores [fator interação: $F(6,144)=1.26$; $p=0.280$]. O teste de Duncan não revelou diferenças significativas.

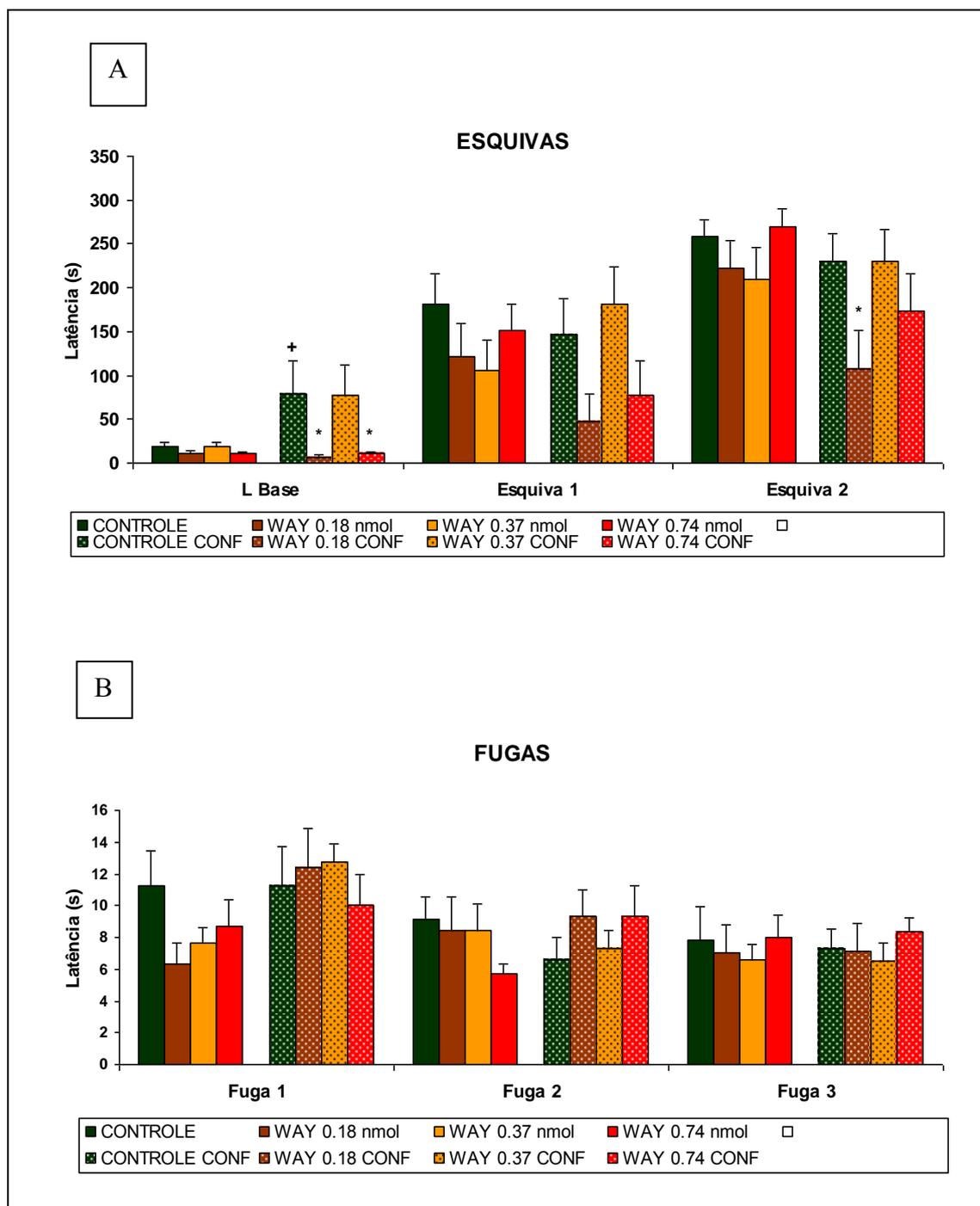


Figura 1 – Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado (A) e de um dos braços abertos (B) do LTE de ratos submetidos à variáveis estressoras prévias (confinamento) ou não e submetidos à injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635 ou de salina. * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle em uma mesma tentativa ($n=10$ para todos os grupos).

A Tabela 2 mostra que não existiu diferença significativa entre os grupos quanto ao número de quadrados percorridos no teste do campo aberto [F(3,72)=0,45; p=0,715].

Drogas (nmol)	Nºde quadrados
Experimento 8	
Salina	47,70 ± 4,41
Way 100635 (0.18)	51,70 ± 3,68
Way 100635 (0.37)	48,90 ± 5,06
Way 100635 (0.74)	53,00 ± 3,78
Salina	34,90 ± 5,33
Way 100635 (0.18) + Confinamento	44,70 ± 6,59
Way 100635 (0.37) + Confinamento	29,80 ± 6,38
Way 100635 (0.74) + Confinamento	40,81 ± 5,47

Tabela 2 – Média (\pm EPM) do número de quadrados percorridos no teste do campo aberto pelos animais submetidos às variáveis estressoras prévias (confinamento) e à injeção intra-hipocampo dorsal de WAY 100635. *p<0.05 comparado com o grupo controle e o estresse prévio

8. DISCUSSÃO

No presente estudo nós avaliamos inicialmente se os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal estariam envolvidos na modulação das respostas defensivas geradas no LTE. Conforme descrito na introdução, o hipocampo dorsal recebe densa inervação serotoninérgica do NMR (VERTES et al., 1999) e um grande número de receptores 5-HT_{1A} é encontrado nessa região (HAMON, 1997; BARNES; SHARP, 1999). Nesta direção, os resultados por nós obtidos com a injeção intra-hipocampo dorsal do WAY 100635 em ratos que não foram submetidos previamente a situações de estresse mostraram que, no LTE, a administração desse antagonista de receptor 5-HT_{1A} não alterou as respostas de esquiva inibitória e de fuga. Em consonância, tem sido observado que a administração do WAY 100635 no hipocampo dorsal não induz alterações nas respostas defensivas comportamentais geradas no teste de interação social e Labirinto em cruz elevado (LCE) (FILE et al., 1996; GONZALES et al., 1998; KENNY et al., 2000). Também, trabalhando com o LCE Nunes-de-Souza e colaboradores (2002) observaram que a administração intra-hipocampo dorsal de WAY 100635 não mostrou efeito sobre o comportamento dos animais. De acordo com esses autores, os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo dorsal não participam na mediação das respostas de ansiedade gerada naquele modelo. Assim, nossos dados sugerem que a 5-HT liberada no hipocampo dorsal teria um papel modulatório, mas não de gerador da resposta de esquiva inibitória medida no LTE.

Entretanto, observamos que a imobilização prévia e o isolamento, condições de estresse, alteraram o processamento das respostas de esquiva no LTE, ou seja, essas variáveis aumentaram a ansiedade dos animais submetidos a esse modelo comportamental. Estudos têm mostrado que realmente as experiências estressantes anteriores podem modificar as respostas comportamentais de defesa (GUIMARÃES et al., 1993 MENDONÇA NETTO; GUIMARÃES, 1996).

É provável que esta resposta ansiogênica observada no LTE após a imobilização prévia e o isolamento reflita as conseqüências do aumento na liberação de 5-HT no hipocampo dorsal. Esta hipótese decorre

do fato da administração de intra-hipocampo dorsal de WAY 100635 na dose de 0,18 nmol ter bloqueado a resposta ansiogênica observada na linha de base e na esQUIVA 2. Assim, em condições de estresse prévio os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos presentes no hipocampo dorsal são recrutados durante a aquisição da resposta de esQUIVA inibitória.

Outro importante achado do presente estudo é que a exposição prévia a imobilização e ao isolamento somente alteraram as respostas de esQUIVA no LTE, não alterando os resultados de fuga. Portanto, esses resultados sugerem que, no LTE, os agentes estressores estão preferencialmente envolvidos na regulação e manifestação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada e não ao pânico.

Por fim, em nosso estudo, a administração intra-hipocampo dorsal do WAY 100635 não alterou a atividade locomotora dos animais.

Em conclusão, receptores 5-HT_{1A} hipocampais participam seletivamente na modulação da esQUIVA inibitória no LTE, um comportamento defensivo relacionado ao distúrbio de ansiedade generalizada. Variáveis estressoras são capazes de aumentar a ansiedade em animais submetidos a este modelo comportamental. Provavelmente a ansiogênese manifestada esteja relacionada à maior liberação de 5-HT no hipocampo dorsal e receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos presentes nesta região são recrutados durante a aquisição da resposta de esQUIVA inibitória. Receptores 5-HT_{1A} do hipocampo dorsal parecem não responder pelas alterações da atividade motora dos animais.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, T. G. C. S.; GRAEFF, F. G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 70, p. 1-14, 2001.

ANDRADE, T. G. C. S.; MACEDO, C. E. A.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 153, p. 55-60, 2004.

ANDRADE, T. G. C. S.; SILVA, A. A. M. R.; SILVA, C. L.; GRAEFF, F. G. Effect of electrolytic lesion of the median raphe nucleus on behavioral and physiological measures of stress. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v. 49, p. 279-289, 1999.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of differential ascending projections of the dorsal and median raphe. **J. Comp. Neurol.**, v. 179, p. 641-668, 1978.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.

BERTOGLIO, L.J.; JOÇA, S.R.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behav. Brain Res.**, v.175, p. 183-188, 2006.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Ann. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 155-166, 1993.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v. 62, suppl. 232, p. 1-55, 1964.

DAVIDSON, T.L.; JARRARD, L.E. The hippocampus and inhibitory learning: a 'Gray' area? (Review). **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28 (3), p. 261 – 271, 2004.

DEAKIN, J. F. W.; GUIMARÃES, F. S.; GRAEFF, F. G. Testing theories of anxiety in normal volunteers. In: PALOMO, T.; ARCHER, T. (Eds.) **Strategies for studying brain disorders: depressive, anxiety and drug abuse disorders**. Madrid: Editorial Complutense, 1994. v.1, p. 211-238.

DOS SANTOS, L.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.179, p. 733 – 741, 2005.

FILE, S. E.; DEAKIN, J. F. W. Chemical lesions of both dorsal and median raphe nuclei and changes in social and aggressive behaviour in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.12, p. 861-864, 1980.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **J. Neurosci.**, v.16, p. 4810-4815, 1996.

FUXE, K.; AGNATI, L. F.; BOLME, P.; HOKFELT, T.; LIDBRINK, P.; LJUNGDAHL, A. The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons. **Adv. Biochem. Pharmacol.**, v. 14, p. 45-61, 1975.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-chlorophenylalanine (PCPA) attenuation of "conflict" behavior. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 9, p. 319-324, 1970.

GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E.; OVERSTREET, D. H. Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT_{1A} receptor function: a link between anxiety and depression? **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 59, n. 4, p. 787-792, 1998

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 14, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 181-211, 1993.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI JR., H. The elevated T- maze, as an experimental model of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 237-246, 1998.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 173, p. 277-283, 1970.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JR., H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN, H.; BOER, J. A.; WILLNER, P. (Eds.). **Biological Psychiatric**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. 879-893.

GRAY, J. A. **Elements of a two-process theory of learning**. London: Academic Press, 1975

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRIEBEL, G. 5-hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacol. Ther.**, v. 65, p. 319-395, 1995.

GUIMARÃES, F.S. et al. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 133-139, 1993.

HAMON, M. The main feature of central 5-HT_{1A} receptors. In: BAUMGARTEN, H.G.; GOTHER, M. (Eds.) **Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, v. 129, p. 239-268, 1997.

HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 491-504, 1987.

JACOBS, B. L.; COHEN, A. Differential behavioural effects of lesions of the median or dorsal raphe nuclei in rats: open field and pain elicited aggression. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 90, p. 102-108, 1976.

JACOBS, B. L.; WISE, W. D.; TAYLOR, K. M. Differential behavioural and neurochemical effects following lesions of the dorsal or median raphe nuclei in rats. **Brain Res.**, v. 79, p. 353-361, 1974.

KENNY, P. J.; CHEETA, S.; FILE, S. E. Anxiogenic effects of nicotine in the dorsal hippocampus are mediated by 5-HT_{1A} and not by muscarinic M1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 2, p. 300-307, 2000.

KISER, R.S.; BROWN, C.A.; SANGHERA, M.K.; GERMAN, D.C. Dorsal raphenucleus stimulation reduces centrally-elicited fear-like behavior. **Brain Res.**, v. 191, p. 265–272, 1980

MARCINKIEWICZ, M.; VERGE, D.; GOZLAN, H.; PICHAT, L.; HAMON, M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain. **Brain Res.**, v. 291 (1), p.159 – 163, 1984.

McKENNA, J. T.; VERTES, R. P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n. 6, p. 619-630, 2001.

McNAUGHTON, N.; MASON, S. T. The neuropsychology and neuropharmacology of the dorsal ascending noradrenergic bundle – a review. **Prog. Neurobiol.**, v. 14, n. 2-3, p. 157-219, 1980.

MENDONÇA NETTO, S.E.; GUIMARÃES, F.S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus-maze exploration after a single restraint experience. **Behav. Brain Res.** v. 77, p. 215-218, 1996.

MENDONÇA NETTO, S.E.; GUIMARÃES, F.S., Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze. **Behav. Brain Res.**, v. 91, p. 207-211, 1998.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res.**, v. 927, n. 1, p. 87-96, 2002.

MENDONÇA NETTO, S.E.; GUIMARÃES, F.S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus-maze exploration after a single restraint experience. **Behav. Brain Res.** v. 77, p. 215-218, 1996.

PAZOS, A.; PALACIOS, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. **Brain Res.**, v. 346 (2), p. 205 – 230, 1985.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI JR., H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 147, p. 185-192, 2003.

PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol. Ther.**, v. 55, p. 149-181, 1992.

SREBRO, B.; LORENS, A. S. Behavioural effects of selective midbrain raphe lesions in the rat. **Brain Res.**, v. 89, p. 303-325, 1975.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 571-576, 2000.

TÖRK, J.; HORNUNG, J. P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: PAXINOS, G. (Eds.). **The human nervous system**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 1001-1022.

TYE, N. C.; EVRITT, B. J.; IVERSEN, S. D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. **Nature**, v. 268, p. 741-743, 1977.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 407, p. 555-582, 1999.

Vertes, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 313 (4), p. 643 – 668, 1991.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 549-554, 1994.

WIRTSHAFTER, D.; McWILLIAMS, C. Suppression of locomotor activity produced by acute injections of the kainic acid into the median raphe nucleus. **Brain Res.**, v. 408, p. 349-352, 1987.

WISE, C. D.; BERGER, B. D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. **Science**, v. 177, p. 180-183, 1972.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain. Res. Bull**, v. 44, p. 1-5, 1997.

ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C. H.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the elevated T-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 637-645, 2001.