



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>2C</sub> DO HIPOCAMPO VENTRAL  
NA MODULAÇÃO DE ESTADOS DE ANSIEDADE EM RATOS**

Marília Greidinger Carvalho

Brasília

2010



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>2C</sub> DO HIPOCAMPO VENTRAL  
NA MODULAÇÃO DE ESTADOS DE ANSIEDADE EM RATOS**

Marília Greidinger Carvalho

Brasília, fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA



DEPARTAMENTO DE PROCESSOS PSICOLÓGICOS BÁSICOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

---

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>2C</sub> DO HIPOCAMPO VENTRAL  
NA MODULAÇÃO DE ESTADOS DE ANSIEDADE EM RATOS**

MARÍLIA GREIDINGER CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pedro de Mello Cruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento do Departamento de Processos Psicológicos Básicos do Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências do Comportamento – Área de Concentração: Cognição e Neurociências do Comportamento.

Brasília, fevereiro de 2010

## Índice

Banca Examinadora .....	v
Dedicatória .....	vi
Agradecimentos .....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas.....	x
Índice de Abreviaturas .....	xi
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xiv
Introdução .....	15
Objetivo .....	22
Método .....	22
Resultados .....	27
Discussão .....	32
Referências .....	38

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Antonio Pedro Mello Cruz - Presidente

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Universidade de Brasília

Professor Dr. Sérgio Henrique Alves - Membro externo

Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

Professora Dra. Wânia Cristina de Souza – Membro interno

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Universidade de Brasília

Professor Dr. Sérgio Leme da Silva – Suplente

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Universidade de Brasília.

*Dedico este trabalho a meus pais, Sônia e Marco, pela intensa dedicação e amor incondicional ao longo dessa caminhada.*

## Agradecimentos

Ao professor **Dr. Antônio Pedro de Melo Cruz**, pela amizade, ensinamentos teóricos, paciência, respeito e confiança na minha capacidade de concluir esta dissertação.

A **Graziela Furtado Scarpelli Ferreira**, parceira incansável, mesmo diante dos grandes desafios. Sua paciência e amizade ajudaram-me a ter força para concluir esta etapa. A influência de sua alegria e de sua determinação transformou obstáculos em desafios gratificantes.

Ao **Kalliu Contou**, pelo apoio, consideração e solidariedade nos momentos que precisei. Sua colaboração foi essencial para conclusão deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de pesquisa **Ana Luiza, Marcelo, Rebeca e Serginho**, que apoiaram e ajudaram na coleta dos dados.

A professora **Dra. Wânia Cristina de Souza**, pela amizade, confiança e exemplo de pessoa e pesquisadora.

Ao professor **Dr. Gerson Janczura**, pela competência e sugestões na análise estatística de meus resultados.

Ao professores do Instituto de Psicologia, pelos ensinamentos e orientações essenciais para minha formação academia.

Aos amigos **Guilherme e Flávia** pelas sugestões e revisões das primeiras versões deste trabalho escrito.

Aos amigos **Ana Maria, Aline, Anna Victoria, Flávia e Viviane** sempre me aconselhando e incentivando com carinho.

A minha amada família, **Sônia, Marco e Natália**, pela força, compreensão e incentivo incondicional em todas as minhas escolhas. A razão de tudo que construí e sou hoje.

Ao **Diogo** pela paciência, compreensão e carinhos constantes revelados ao longo dessa etapa.

Aos colegas de pós-graduação pelos bons momentos compartilhados.

À funcionária do programa de Pós-Graduação Joyce Novaes do Rego, pela presteza de atendimento de questões burocráticas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Tese de Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na forma de bolsa.

## Índice de Figuras

Figura 1: Ilustração da localização das cânulas implantadas no HV.....	27
Figura 2: Média ( $\pm$ EPM) das porcentagens de entrada (A) e de tempo (B) de permanência nos braços abertos no LCE entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB 242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1 $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g) .....	29
Figura 3: Média ( $\pm$ EPM) do tempo gasto na categoria espreitar (A) e do tempo gasto na categoria esquadrinhar nos braços abertos (B) entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB-242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1 $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g) .....	31
Figura 4: Média ( $\pm$ EPM) do número absoluto de entradas nos braços fechados entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB 242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1 $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g).....	32

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Delineamento experimental indicando a distribuição em oito grupos de animais que receberam injeções i.p. de salina ou do agonista 5-HT <sub>2C</sub> WAY-161503 na dose de 3mg/kg e microinjeções no HV de salina (0) ou do antagonista 5-HT <sub>2C</sub> SB-242084 nas doses de 0,1 0,5 ou 1,5 µg/0.2 µl.....	25
---	----

## Índice de Abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

Ca<sup>++</sup>: íons de cálcio

AP: antero-posterior

ATV: área tegmental ventral

DV: dorso-ventral

HD: Hipocampo dorsal

HPA: eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HV: Hipocampo ventral

LCE: labirinto em cruz elevado

LM: lateral-medial

LSD: ácido lisérgico

i.p: intraperitoneal

MCPD: matéria cinzenta periaquedutal dorsal

m-CPP: [1-(3-chlorophenyl)piperazina] - agonista 5-HT<sub>2</sub>

NDR: núcleo dorsal da rafe

NMR: núcleo mediano da rafe

PCPA: para-clorofenilalanina

SB 242084: 6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-N-[6-[(2-methyl-3-pyridin yl)oxy]-3-pyridinyl]-1H-indole-1-carboxamide dihydrochloride

SNC: Sistema Nervoso Central

SIC: Sistema de Inibição Comportamental

TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada

TFMPP: [trifluoro-(methyl)phenyl]piperazina] – agonista 5-HT<sub>2</sub>

TH: triptano hidrozilase

WAY-161503: hydrochloride (8,9-Dichloro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-pyrazino[1,2-a]quin  
oxalin-5(6H)-one hidroclorido)

## Resumo

O presente estudo investigou os efeitos do bloqueio farmacológico dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> do hipocampo ventral (HV) sobre os níveis de ansiedade de ratos induzidos pela injeção sistêmica de agonistas 5-HT<sub>2C</sub>. Dez minutos após injeções intraperitoneais (i.p.) com salina (0,9%) ou com o agonista 5-HT<sub>2C</sub> WAY-161503 (3mg/kg), ratos foram microinjetados bilateralmente no HV com salina ou com o antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, SB-242084, nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,5 µg/0.2 µl.. Cinco minutos após as microinjeções, cada animal foi exposto por cinco minutos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE). As seguintes categorias comportamentais foram registradas como índice de ansiedade: porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos, tempo gasto nas categorias espreitar e esquadrihar, bem como o número de explorações da extremidade dos braços abertos. O número absoluto de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice de atividade locomotora. Os resultados indicaram efeitos ansiogênicos nos animais pré-tratados periféricamente com o agonista WAY-161503 e microinjetados com salina no HV. A microinjeção do antagonista 5-HT<sub>2C</sub> SB-242084 no HV bloqueou os efeitos ansiogênicos induzidos por injeções i.p. do WAY-161503. Tais resultados apontam para uma participação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> do HV na modulação de estados de ansiedade de ratos expostos ao LCE.

**Palavras-chave:** ansiedade, hipocampo ventral, receptores 5-HT<sub>2C</sub>, serotonina.

### Abstract

The present study investigated the effects of pharmacological blockade of 5-HT<sub>2C</sub> receptors of the ventral hippocampus (VH) on anxiety levels of rats induced by 5-HT<sub>2C</sub> agonists. Ten minutes after intraperitoneal (i.p.) injections of either saline (0.9%) or the 5-HT<sub>2C</sub> agonist WAY-161503 (3mg/kg), rats were bilaterally microinjected in the VH with saline or with the selective 5-HT<sub>2C</sub> antagonist SB-242084 at doses of 0.1, 0.5 or 1.5 µg/0.2 µl. Five minutes after the microinjections, each animal was exposed for five minutes to the Elevated Plus-Maze (EPM). The following behavioral categories were recorded as anxiety indexes: percentages of open arm entries and of time on open- arms, time spent on risk-assessment and scanning, as well as the number of visits to the extremity of the open-arms. The absolute number of closed arm entries was used locomotor activity index. Results indicated anxiogenic effects on animals peripherally pre-treated with the agonist WAY-161503 and microinjected with saline in the VH. Microinjection of the 5-HT<sub>2C</sub> antagonist SB-242084 in the VH blocked the anxiogenic effects induced by i.p. WAY-161503 injections. These outcomes point toward participation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the VH in the modulation of anxiety states in rats exposed to EPM.

**Keywords:** anxiety, ventral hippocampus, 5-HT<sub>2C</sub> receptors, serotonin.

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) está diretamente envolvida na modulação de estados de ansiedade (Griebel, 1995; Ohara, Nagai, Suzuki, Ochiai & Ohara, 1998; Graeff, 2002; Millan, 2005; Akimova, Lanzenberger & Kasper, 2009). No entanto, devido principalmente à complexidade anatômica e neuroquímica do sistema serotoninérgico, não se consegue precisar seus efeitos nos estados emocionais. É certo que a 5-HT é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, envolvido em numerosos transtornos comportamentais e fisiológicos tais como depressão, esquizofrenia, mania, autismo, obesidade e ansiedade (Cools, Roberts & Robbins, 2008). Como a disfunção na neurotransmissão central de serotonina está envolvida em diversos estados patológicos, ela é alvo de uma variedade de agentes terapêuticos.

Em 1945, a 5-HT foi identificada pelo grupo do fisiologista americano Irving Page como sendo um vasoconstritor sérico, liberado na corrente sanguínea após a ruptura de plaquetas. Essa substância, não obstante, só foi isolada e caracterizada posteriormente por Maurice Rapport em 1948 (Hannon & Hoyer, 2008). Em 1954, o pesquisador Gaddum descobriu que o potente alucinógeno dietilamida, do ácido lisérgico (LSD), antagonizava os efeitos da 5-HT. Essa descoberta levantou a possibilidade de essa substância possuir um papel central no controle do humor (Green, 2006).

A 5-HT é um dos neurotransmissores evolutivamente mais antigos. Estima-se que seus receptores tenham surgido há 700-800 milhões de anos em organismos unicelulares eucariotos (Hannon & Hoyer, 2008). Sua síntese se inicia com a hidrólise do aminoácido triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TH), seguida de uma descarboxilação formando a 5-HT. A enzima TH não é completamente saturada em condições fisiológicas, portanto uma quantidade adicional de triptofano pode gerar

um aumento de 5-HT. Após sua síntese, essa substância é encapsulada em vesículas e armazenada no interior do neurônio (Filip & Bader, 2009).

Para que a 5-HT seja liberada na fenda sináptica, é necessário o influxo de íons  $Ca^{++}$  decorrente de uma descarga elétrica neural. Quando isso ocorre, a 5-HT pode ligar-se a receptores de membrana, pré e pós-sinápticos, exercendo sua ação. Baseada em diferenças estruturais (seqüência de aminoácidos), bioquímicas (transdução de sinal pós-receptor) e farmacológicas, a classificação atual dos receptores de 5-HT os divide em sete famílias (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) e catorze subtipos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>5B</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub>). Com exceção dos receptores da família 5-HT<sub>3</sub>, ionotrópica, os receptores serotoninérgicos são metabotrópicos, isto é, transmitem seu sinal através de ligação a uma proteína G. (para revisões ver Barnes & Sharp, 1999; Hoyer, Hannon & Martin, 2002; Hannon & Hoyer, 2008; Phillip & Bader, 2009).

As projeções serotoninérgicas se diferem em organização topográfica, características eletrofisiológicas e morfologia (Hensler, 2006). As projeções relevantes para os comportamentos de medo e ansiedade são as vias ascendentes originárias dos núcleos dorsal e mediano da rafe. O núcleo dorsal da rafe (NDR) inerva o córtex préfrontal, o septo lateral, o estriato dorsal, o córtex entorinal, o hipocampo ventral, a matéria cinzenta periaquetural dorsal e o complexo amigdalóide. O núcleo mediano da rafe (NMR) se projeta principalmente para o hipocampo dorsal, o septo medial e o hipotálamo anterior. (Deakin e Graeff, 1991; McQuade & Sharp, 1997; Millan, 2003)

As primeiras evidências do envolvimento da serotonina na ansiedade advêm de estudos com modelos animais de conflito nas décadas de 1960 e 70. Nesses modelos experimentais, o comportamento operante do animal é mantido pela apresentação de recompensa, como água e alimento, e suprimido pela apresentação de estímulos

aversivos, como choques elétricos nas patas do animal. Robichaud e Sledge (1969) demonstraram que o para-clorofenilalanina (PCPA), inibidor da síntese de 5-HT, liberava comportamentos punidos por choques elétricos, suprimindo, portanto o conflito. Corroborando essa descoberta, no ano seguinte, Graeff e Schoenfeld (1970) verificaram que os antagonistas serotoninérgicos não-seletivos metisergida e bromolisérgico apresentavam efeitos similares. Pode-se constatar, por meio desses resultados farmacológicos obtidos em animais, o efeito ansiolítico e anticonflito da 5-HT.

Estudos posteriores demonstram que lesões neuroquímicas seletivas em neurônios serotoninérgicos localizados na área tegmental ventral (ATV) revertiam a supressão induzida por choques elétricos em ratos (Tye, Everitt & Iversen, 1977). De forma complementar, Graeff e Silveira Filho (1978) verificaram que, ao se estimular eletricamente o núcleo medial da rafe (NMR), o comportamento operante de pressionar a barra, mantido por intervalo variável, era inibido, bem como comportamentos de defecação, de piloereção e de exofitalmia. Verificou-se ainda que o tratamento prévio com PCPA bloqueava os efeitos da estimulação elétrica da NMR, sugerindo assim o envolvimento da 5-HT nesse processo (Guimarães, Carobraz & Graeff, 2008). Conforme esses resultados e as observações sobre a diminuição da atividade serotoninérgica pelos benzodiazepínicos, Stein formulou a teoria serotoninérgica clássica da ansiedade (Stein, Wise & Berger, 1973), a 5-HT possui efeito ansiogênico.

Dentre os receptores serotoninérgicos, a família 5-HT<sub>2</sub> desempenha um papel importante nos estados de ansiedade (Griebel, Rodgers, Perrault & Sanger, 1997; Mora, Netto & Graeff, 1997; Millan, 2003; Wood, 2003). A distribuição em regiões límbicas diretamente envolvidas em estados emocionais e corticais justifica o envolvimento destes receptores nos comportamentos de ansiedade (Bourin & Dhannchadha, 2005).

Estudos básicos e clínicos com drogas não-seletivas, preferenciais e seletivas têm apontando para o papel, em particular do subtipo 5-HT<sub>2C</sub> na mediação da ansiedade. Esse receptor está em maior expressão no plexo coróide e em menor expressão no hipocampo, amígdala, estriato ventral e dorsal e substância nigra. (Pompeiano, Palacios & Mengod, 1994; Phillip & Bader, 2009). Estudos com microinjeção de drogas diretamente em áreas cerebrais de animais evidenciaram que o efeito da 5-HT irá depender da área em que a droga irá atuar (Menard & Treit, 1999; Engin & Treit, 2008).

Na amígdala, substrato neural central no condicionamento de medo (Ledoux, 2000), a ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> apresenta uma ação ansiogênica em diferentes modelos animais (Campbell & Merchant, 2003). Em contrapartida, a microinjeção de drogas que aumentam a neurotransmissão de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) promove efeitos ansiolíticos (Nogueira & Graeff, 1995; Jacob, Cabral, Almeida, Magierek, Ramos, Zanoveli et al, 2002; Graeff, 2004). Para conciliar esses efeitos aparentemente paradoxais, Deakin e Graeff (1991) propuseram a teoria dual da 5-HT. Essa teoria postula que a via serotoninérgica originada no núcleo dorsal da rafe (NDR) que inerva a amígdala intensifica o condicionamento de medo e estaria clinicamente relacionada à ansiedade antecipatória e ao Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG). No entanto, a via que parte do NDR para a MCPD inibe comportamentos de fuga e de luta, isto é, reações de medo incondicionado. Na clínica, esta via parece estar envolvida com ataques de pânico (Graeff, 2002; Graeff, Viana & Mora, 1997; Graeff, Guimarães, Andrade & Deakin, 1996). Portanto, a teoria diz que na amígdala a 5-HT possui efeitos ansiogênicos e na MCPD efeitos ansiolíticos.

Além da amígdala e da MCPD, estruturas tradicionalmente envolvidas em estados de ansiedade, como a formação hipocampal, parecem também estar envolvidas em reações de defesa. Por exemplo, a teoria neuropsicológica da ansiedade proposta por

Gray (1982) enfatiza o hipocampo, juntamente com o septo, como substrato neural importante no Sistema de Inibição Comportamental (SIC). Estímulos inatos e condicionados de medo, novidade e sinais de frustração ativam o SIC, promovendo inibição comportamental e aumentando os níveis de alerta e atenção do sujeito para o ambiente que o cerca (Gray & McNaughton, 2000).

Estudos com lesões cerebrais sugerem que o hipocampo é funcionalmente subdividido no eixo septotemporal em duas regiões, dorsal e ventral, cada uma associada a diferentes comportamentos. A porção dorsal do hipocampo está preferencialmente envolvida no processamento de informações visuais e de funções relacionadas à memória. Já o hipocampo ventral (HV) seria responsável pelos comportamentos relacionados à ansiedade (para revisão ver Bannerman et al, 2004).

A diferença nas projeções aferentes e eferentes pode ser uma explicação para diferença funcional das porções ventral e dorsal. O hipocampo dorsal (HD) possui conexões anatômicas com áreas corticais sensoriais primárias, córtex de associação e áreas entorinais e peririnais (Moser e Moser, 1998; Bannerman et al, 2004). As conexões anatômicas para o hipocampo ventral diferem marcadamente das do HD. O HV possui conexões com o córtex pré-frontal, o assoalho da stria terminalis e a amígdala, bem como com estruturas subcorticais associadas com o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Pitkanen, Pikkarainen, Nurminen & Ylinen, 2000; Petrovich, 2001).

Essa dissociação funcional entre as porções ventral e dorsal do hipocampo pode ser vista em estudos com lesões cerebrais em animais. Lesões no HD apresentam relativamente pouco envolvimento com estados de ansiedade nos modelos de medo incondicionado quando comparado com lesões no HV, que produzem efeitos ansiolíticos acentuados (Kjelstrup, Tuvnes, Steffenach, Murison, Moser & Moser, 2002;

Degroot and Treit, 2004; McHugh, Deacon, Rawlins & Bannerman, 2004; Bertoglio, Joca, & Guimaraes, 2006; Pentkowski, Blanchard, Lever, Litvin & Blanchard, 2006). Em contrapartida, lesões no HD demonstram dados consistentes do seu envolvimento com tarefas de aprendizagem associativa e memória, resultados não encontrados no HV (Bannerman, Grubb, Deacon, Yee, Feldon, & Rawlins, 2003; McHugh et al., 2004; McNaughton e Corr, 2004; Burman, Starr & Gewirtz, 2006; Pentkowski et al., 2006).

A mesma consistência de resultados em estudos com lesões não é vista quando se utilizam técnicas de microinjeção de drogas. A microinjeção de agonistas de 5-HT<sub>1A</sub>, como a buspirona e o 8-OH-DPAT, no HD apresenta resultados com efeitos ansiolíticos (Jolas, Schreiber, Laporte, Chastanet, Devry, Glaser, et al 1995), efeitos ansiogênicos (Andrews, Hogg, Gonzalez & File, 1993) e sem efeito (Nunes-de-souza, Canto-de-Souza & Rodgers, 2002). No HV, agonistas 5-HT<sub>1A</sub> não tiveram efeitos nos testes de interação social e no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Paradoxalmente, antagonistas de 5-HT<sub>1A</sub> produziram efeitos ansiolíticos (Nunes-de-souza et al, 2002). Em estudos envolvendo os receptores 5-HT<sub>2C</sub>, foram encontrados efeitos ansiogênicos com a microinjeção do agonista m-CPP no HV e nenhum efeito no HD (Alves, Pinheiro, Motta, Landeira-Fernandez, & Cruz, 2004). Já a microinfusão dos antagonistas RO-60-0175 e RS 102221 no HV apresentou efeitos ansiolíticos (Scarpellil, Alves, Landeira-Fernandez & Cruz, 2008).

Outra justificativa para a dissociação funcional das porções do hipocampo está na diferença das projeções serotoninérgicas provenientes dos núcleos da rafe para as regiões, ventral e dorsal. O HD recebe projeções do NMR e o HV, por sua vez, é inervado pelo NDR (Azmitia & Segal, 1978). Distinguir essas projeções pode ser de grande valia para a análise das funções de cada região.

A possibilidade do HV possuir um papel especializado em comportamentos relacionados ao medo e ansiedade tem sido recentemente investigada em uma série de testes de medo incondicionado. Bannermann et al (2004) acreditam que esse substrato neural media comportamento reações incondicionada de ansiedade principalmente em situações de aproximação e evitação (por exemplo, o LCE). Modelos de ansiedade incondicionados que envolvem reações inatas de medo relacionam-se mais diretamente aos mecanismos de ansiedade do que aqueles envolvidos nos modelos associativos de ansiedade. Isto porque esses modelos possuem estímulos indutores dos estados de ansiedade que fazem parte da ecologia do animal. Esses modelos, atualmente utilizados para estudar drogas serotoninérgicas, são chamados de modelos etológicos ou etofarmacológicos de ansiedade (Lister, 1990).

Os modelos etofarmacológicos possuem a vantagem de dispensar treinamentos, o que torna mais rápido e simples os testes para seleção de drogas ansiolíticas, e não envolvem uma aprendizagem complexa. Dessa forma, os efeitos das drogas ansiolíticas não se sobrepõem aos efeitos de outros mecanismos como memória, atenção e dor (Cruz, Zangrossi, Graeff, & Landeira-Fernandez, 1997; Rodgers, Cao, Dalvi & Holmes, 1997; Carobrez & Betoglio, 2005)

O LCE, validado por Pellow (1985), é um dos modelos etofarmacológicos de ansiedade mais freqüentemente usados. O teste consiste em dois braços abertos e opostos, outros dois braços fechados e opostos do mesmo tamanho. Os braços estão elevados de 50 a 70 centímetros em relação ao chão. Quando os animais são colocados no labirinto, eles tendem a evitar os braços abertos e permanecer mais tempo nos braços fechados. Evitar os braços abertos é interpretado como resposta indicativa de ansiedade (Rodgers & Dalvi, 1997).

O índice de ansiedade é obtido nesse modelo por meio das medidas de porcentagem total de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos, chamadas de medidas clássicas. Ao se estudar drogas serotoninérgicas, porém, é necessário o uso de parâmetros etológicos, chamados de avaliação de risco, que têm como função biológica obter informações em relação a potenciais ameaças (Hogg, 1996; Griebel et al, 1997; Setem, Pinheiro, Motta, Morato & Cruz, 1998).

### Objetivos

O fato de a 5-HT exercer importante papel importante na modulação de estados de ansiedade e a sugestão de que parte de seus efeitos seja atribuída a uma ação específica no subtipo 5-HT<sub>2C</sub> de receptores serotoninérgicos distribuídos no cérebro, têm sido de grande interesse não só para o mapeamento da circuitaria neural das reações de defesa, mas também para a seleção de novos compostos com ação ansiolítica e ansiogênica. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da injeção sistêmica de um agonista 5-HT<sub>2C</sub> WAY-161503 e um possível bloqueio desses efeitos pela microinjeção de um antagonista 5-HT<sub>2C</sub> SB-242084 na porção ventral do hipocampo em um dos modelos animais mais utilizados para o estudo da ansiedade, o LCE.

### Método

#### Sujeitos

Sessenta e quatro *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos e experimentalmente ingênuos, com peso entre 180 e 260 g, foram utilizados como sujeitos do procedimento. Os animais provieram da BIOAGRI (Brasília-DF) e permaneceram no biotério por, no mínimo, sete dias antes do tratamento experimental.

Alojaram-se os animais em gaiolas-viveiro (45 x 28 x 13 cm), em grupos de 4 animais, sob um ciclo claro-escuro de 12 h (com a fase clara de 7:00 às 19:00 h) e em condições *ad libitum* de comida e água. Os experimentos aconteceram em conformidade com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), balizadas pelo *National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (revisada em 1999).

### Equipamentos

Seguindo as especificações de Pellow e cols. (1985), o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) consistiu de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), elevados a 50 cm do solo. Os braços abertos e fechados foram dispostos de forma perpendicular, cruzando-se entre si em formato de cruz, delimitada por uma arena central (10 x 10 cm). Nos braços abertos havia uma borda de acrílico transparente de 1 cm de altura, com objetivo de minimizar o número de quedas dos animais. O labirinto encontrava-se em uma sala com isolamento acústico, iluminado por uma lâmpada incandescente (60-W), colocada verticalmente a 150 cm acima do aparato. As sessões experimentais foram observadas e gravadas através de uma vídeo-câmara montada verticalmente acima do labirinto e conectada a uma TV e a um vídeo-cassete instalados em uma sala ao lado. A filmagem correspondente a cada animal foi analisada posteriormente por um observador treinado na análise das categorias comportamentais e que desconhecia o tratamento farmacológico recebido por cada animal.

### Drogas

Para as injeções periféricas utilizou-se o agonista 5-HT<sub>2C</sub> seletivo, WAY 161503 Hidroclorido (8,9-Dichloro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-pyrazino[1,2-a]quin oxalin-5(6H)-

one hydrochloride, TOCRIS Bioscience, Ballwin, Missouri, USA). Para as microinjeções (0,2 µl) no hipocampo ventral utilizou-se o antagonista seletivo 5-HT<sub>2C</sub> SB 242084 (6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-N-[6-[(2-methyl-3-pyridinyl)oxy]-3-pyridinyl]-1H-indole-1-carboxamide dihydrochloride). As drogas foram solubilizadas em solução salina estéril a 0.9% que serviu de veículo-controle.

### Cirurgia

Após anestesia com Tiopental de sódio (40 mg/Kg), os animais foram colocados no aparelho estereotáxico, onde receberam uma injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína na região cirúrgica. Um pedaço oval da pele circunscrita à região cirúrgica foi retirado a fim de se ter acesso à calota craniana. Após limpeza do campo e visualização dos pontos de referência no crânio, três orifícios foram abertos na calota craniana através de uma broca, sendo dois para colocação das cânulas e um adicional para a fixação de um parafuso que auxiliou a firmar o cimento acrílico na calota craniana do animal. Através deste procedimento, foram implantadas duas cânulas 0,5 mm acima do hipocampo ventral (AP = -4,8, LM = 5,0, DV = 6,0) e inseridos mandris nas cânulas para evitar possíveis entupimentos. Após o procedimento cirúrgico, os animais se recuperaram por sete dias.

### Microinjeção

Uma cânula interna (0,3 mm de diâmetro externo), um tubo de polietileno transparente (PE10) de 50 cm de comprimento e uma seringa de Hamilton (10 µl) foram utilizados para microinjeção. Uma extremidade do tubo de polietileno foi conectada à cânula interna e a outra extremidade do tubo à microseringa de Hamilton. A extremidade do tubo conectada à cânula interna foi preenchida com a substância

microinjetada e a outra extremidade, conectada à seringa de Hamilton, com água destilada. As duas substâncias foram separadas pela formação de uma pequena bolha de ar, cujo deslocamento serviu para o experimentador se certificar do volume da substância injetada no cérebro. Após a retirada do mandril, a cânula interna foi conectada à cânula-guia, ultrapassando 1,0 mm desta última. As microinjeções foram feitas em um volume de 0,2 µl em 30 s. Um período adicional de 2 minutos foi dado antes de a cânula interna ser retirada da cânula-guia a fim de evitar refluxo e favorecer a absorção da droga, fazendo-se o mesmo procedimento com a outra cânula-guia (do outro hemisfério cerebral).

#### Exposição ao LCE

Dez minutos após as injeções intraperitoneais do agonista 5-HT<sub>2C</sub> WAY 161503 (3mg/kg) ou de salina, os animais foram microinjetados bilateralmente no HV ou com salina ou com o antagonista seletivo 5-HT<sub>2C</sub> SB 242084 nas doses de (0,1 0,5 e 1,5 µg/0,2µl). Cinco minutos após as microinjeções, cada animal dos oito grupos correspondentes (Tabela 1) foi colocado na plataforma central do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, podendo explorar livremente os braços abertos e fechados por 5 minutos.

Tabela 1. Delineamento experimental indicando a distribuição em oito grupos de animais que receberam injeções i.p. de salina ou do agonista 5-HT<sub>2C</sub> WAY 161503 na dose de 3mg/kg e microinjeções no HV de salina (0) ou do antagonista 5-HT<sub>2C</sub> SB 242084 nas doses de 0,1 0,5 ou 1,5 µg/0,2µl.

<b>Injeção i.p.</b>	<b>Doses microinjetadas de SB-242084 no HV</b>			
<b>Salina</b>	0	0,1 µg	0,5 µg	1,5 µg
<b>WAY 161503</b>	0	0,1 µg	0,5 µg	1,5 µg

Como medidas comportamentais foram registradas o número de entradas e o tempo gasto em ambos os braços, bem como o tempo de permanência no centro do labirinto. A partir desses dados foram calculadas as porcentagens de entradas nos braços e a de permanência de tempo nestes. Além destas medidas clássicas, foram observadas e computadas as seguintes medidas etológicas descritas por Cruz e cols. (1994): esquadrihar (colocação da cabeça sobre a beirada de um braço aberto), espreitar (saída parcial de um braço fechado com as patas dianteiras e cabeça) e exploração da extremidade (alcançar com as patas dianteiras a extremidade dos braços abertos).

### Histologia

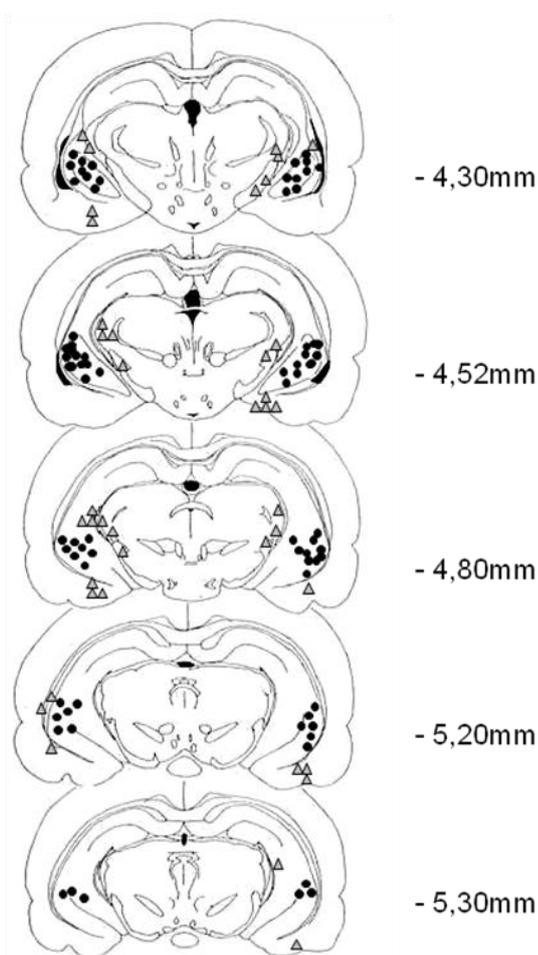
Ao término dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados com uma sobredose de tiopental de sódio, perfundidos intracardialmente com salina e, logo em seguida, com solução de formol a 10%. Os cérebros foram removidos e mantidos em formol a 10% por no mínimo sete dias. Posteriormente, os cérebros foram cortados em secções coronais de 50-60  $\mu\text{m}$  e avaliados os sítios de injeção de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1998).

### Análise estatística

Para as comparações entre o grupo injetado intraperitonealmente com o agonista WAY 161503 e microinjettato com salina no HV foi utilizado o teste T para amostras independentes. As demais comparações foram feitas com base em uma análise de variância paramétrica de uma via (ANOVA). Considerou-se o nível de  $p < 0,05$  para diferenças estatisticamente significantes.

## Resultados

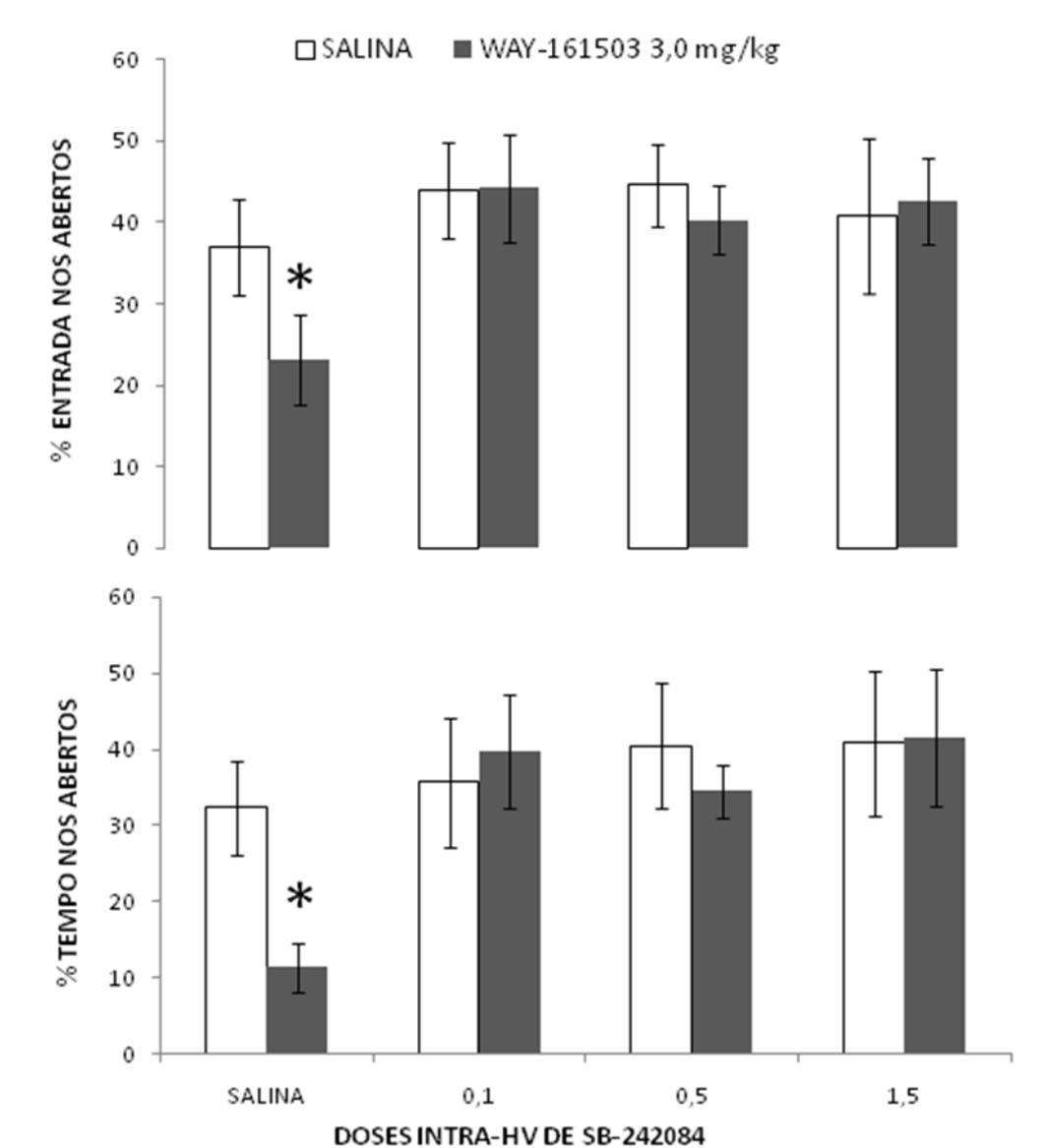
A Figura 1 ilustra os resultados da análise histológica com a composição da distribuição dos pontos de microinjeção em coordenadas posteriores ao *bregma*. A ilustração demonstra os sítios de microinjeções dos animais operados (n = 57). Aproximadamente 65% (n=37) dos animais tiveram as cânulas posicionadas nas coordenadas referentes ao HV. Os animais cuja histologia revelou sítios de microinjeção em áreas não correspondentes ao HV foram excluídos das análises estatísticas.



**Figura 1.** Ilustração com a localização das cânulas implantadas bilateralmente no HV. Os números à direita de cada plano indicam a distância em milímetros posterior ao *Bregma*, tomando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (1986). Os círculos pretos indicam os sítios que atingiram o HV e os triângulos indicam os sítios fora do HV.

Os efeitos do tratamento farmacológico sobre as medidas clássicas de ansiedade no LCE, porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos, são demonstrados na Figura 2. Conforme se pode observar, a injeção i.p. do agonista 5-HT<sub>2C</sub> WAY-161503 promoveu, nos animais microinjetados com salina no HV, uma diminuição nas porcentagens de entrada (A) e de tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE. O Teste *t* para amostras independentes indicou uma diminuição estatisticamente significativa nas porcentagens de entrada [ $t(6) = 2.19, p < 0,05$ ] e de tempo gasto nos braços abertos [ $t(6) = 2.20, p < 0.05$ ].

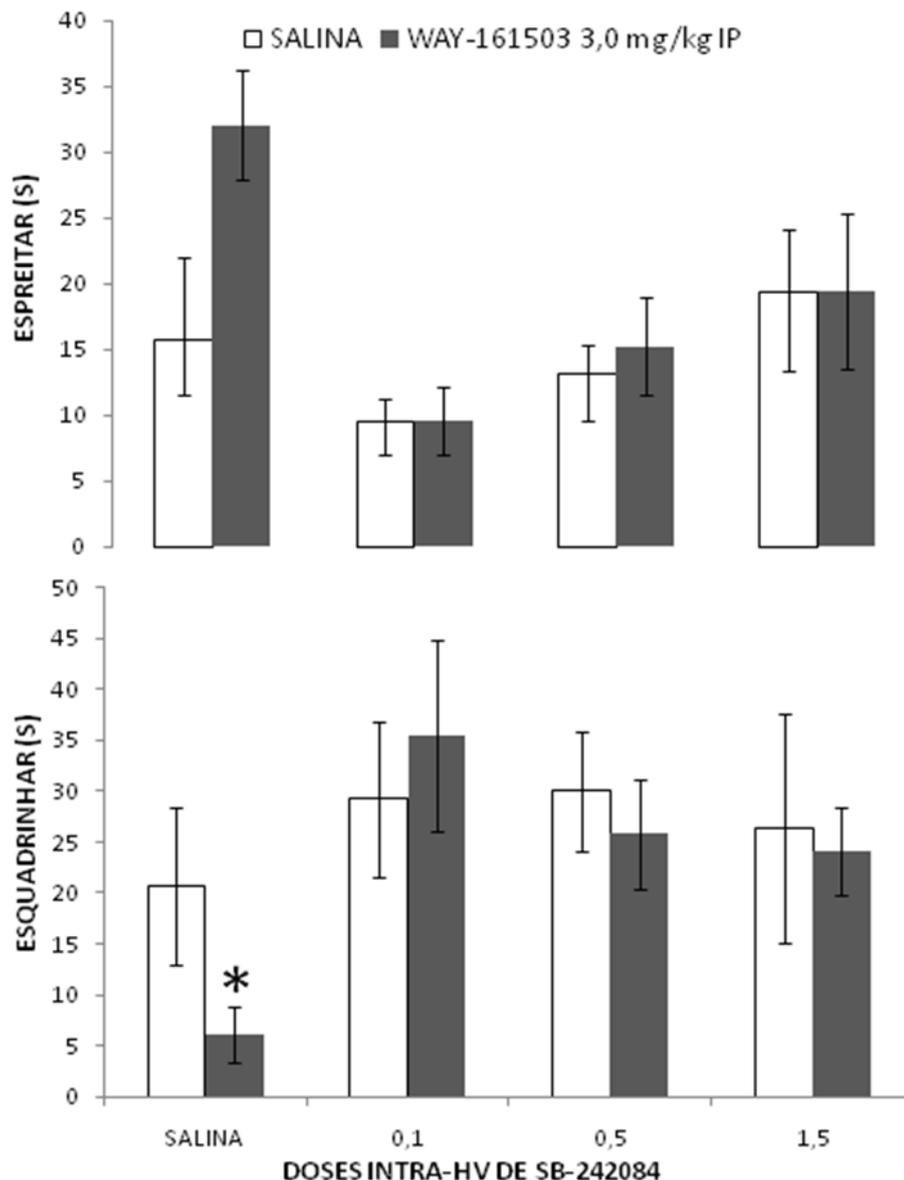
A Figura 2 também sugere que a microinjeção do antagonista SB-242084 no HV bloqueou esse efeito ansiogênico. Esta impressão foi confirmada com base na ANOVA *one-way* que não indicou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas porcentagens de entrada ( $F(2,25) = 1.38, p > 0,05$ ) e de tempo ( $F(2,25) = 1.64, p > 0,05$ ).



**Figura 2.** Média ( $\pm$ EPM) das porcentagens de entrada (A) e de tempo (B) de permanência nos braços abertos no LCE entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB 242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1  $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (salina i.p. e salina central) considerando  $p < 0,05$ .

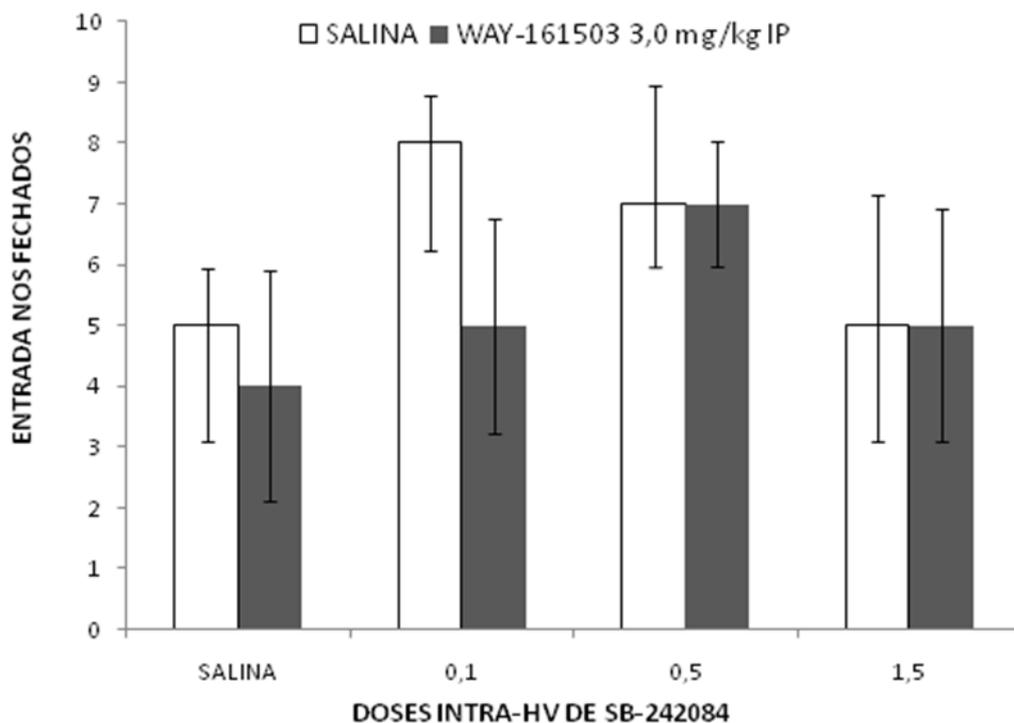
Os efeitos dos tratamentos sobre as categorias etológicas espreitar e esquadrihar são apresentados na Figura 3. Conforme ilustrado, o grupo injetado com WAY-161503 e microinjetado com salina apresentou uma diminuição do comportamento de espreitar e um aumento no comportamento de esquadrihar. O Teste  $t$  confirmou que somente as alterações no esquadrihar foram estatisticamente significantes ( $t(6) = 2.01, p < 0,05$ ).

A microinjeção de SB-242080 no HV sugere reversão dos efeitos ansiogênicos induzidos por WAY-161503 nestas categorias. O teste ANOVA, ao comparar todos os grupos, não indicou diferença estatística significativa no espreitar ( $F(2,25) = 1.98, p > 0,05$ ) nem no esquadrihar ( $F(2,25) = 1.37, p > 0,05$ ).



**Figura 3.** Média ( $\pm$ EPM) do tempo gasto na categoria espreitar (A) e do tempo gasto na categoria esquadrinhar nos braços abertos (B) entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB-242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1  $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (salina i.p. e salina central) considerando  $p < 0,05$ .

Em relação ao número absoluto de entradas nos braços fechados do LCE, ilustrado na Figura 4, os resultados da ANOVA e no Teste  $t$  não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ( $F(2,25) = 0.20$ ,  $p > 0,05$ ).



**Figura 4.** Média ( $\pm$ EPM) do número absoluto de entradas nos braços fechados entre os grupos injetados intraperitonealmente com salina ou WAY-161503 e microinjetados no HV com SB 242084 nas diferentes doses (0 $\mu$ g; 0,1  $\mu$ g; 0,5; 1,5 $\mu$ g).

### Discussão

A ativação farmacológica do receptor 5-HT<sub>2C</sub> está associada à modulação de diferentes comportamentos de ansiedade. Experimentos com a administração de agonistas desse receptor, como o m-CPP, o MK-212 e o RO-600175, têm apresentado aumento dos estados de ansiedade em diferentes modelos animais (Gibson, Barnfield & Curzon, 1994; Griebel, Moreau, Jenck, Mutel, Martin & Misslin, 1994; Fone, Shalders, Fox, Arthur & Marsden, 1996; Wallis & Lal, 1998; Setem et al, 1999; Jones, Duxon, & King, 2002; Bull, Huston & Fone, 2003; Durand, Mormèd & Chaouloff, 2003). A despeito dessas evidências, também tem sido observada ausência de efeito e até mesmo

efeito ansiolítico com drogas agonistas deste receptor (Nic Dhonnchadha, Bourin & Hascoet, 2003; Rippol, Hascoet & Bourin, 2006). Dessa forma, o envolvimento do receptor 5-HT<sub>2C</sub> na ansiedade ainda não está bem esclarecido. Isto pode ocorrer em razão da complexidade anatômica e neuroquímica do sistema serotoninérgico (Hannon & Hoyer, 2008; Barnes & Sharp, 1998), da falta de especificidade das drogas disponíveis para estudos básicos e clínicos (Glennon, Dukat & Westkaemper, 2000), das mudanças neurais adaptativas a repetida administração de drogas e da exposição a diferentes estímulos aversivos (Rodgers, Cole, Cobain, Daly, Doran, Ells et al., 1992, Nic Dhonnchadha et al., 2003).

De acordo com os resultados do presente experimento, os efeitos de diminuição das porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos do LCE, após a injeção i.p. de WAY-161503, indicaram seu perfil ansiogênico. Tal efeito se mostrou seletivo, uma vez que essa droga não alterou o número absoluto de entradas nos braços fechados, índice fidedigno de atividade locomotora neste teste (para revisão ver File, 1992; Cruz et al,1994).

O efeito ansiogênico da ativação dos receptores 5HT<sub>2C</sub> também foi confirmado pela diminuição do tempo gasto na categoria etológica esquadrihar observada nos animais injetados periféricamente com WAY-161503 e microinjetados com salina no HV. O esquadrihar parece estar mais fortemente ligado aos índices de ansiedade do que à categoria espreitar, em que não foi vista alteração decorrente dos tratamentos. Segundo Cruz et al (1994), espreitar reflete, além de comportamentos de ansiedade, atividade motora.

Sugere-se, com base nos dos resultados encontrados nas categorias clássicas e nas etológicas, que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> pelo WAY-161503 aumenta os níveis de ansiedade em ratos. Esse perfil comportamental ansiogênico do WAY-

161503, encontrado em nosso estudo, corroboram publicações anteriores em nosso e outros laboratórios (Mosher, Smith e Greenshaw, 2006; Hayes, Mosher e Greenshaw, 2008; Silva, 2009). Efeitos de supressão motora decorrentes da ativação de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, relatados em outras pesquisas (Martin, Bos, Jenck, Moreau, Mutel, Sleight, et al, 1998; Kennett, Lightowler, Trail, Bright, & Bromidge, 2000; Martin, Ballard, & Higgins, 2002), não foram encontrados neste estudo.

Muitos autores têm considerado que a ativação de receptores 5-HT<sub>2C</sub> tem propriedade ansiogênicas em animais (Rodgers et al., 1992; Griebel et al., 1994; Wallis & Lal, 1998; Setem et al, 1999; Durand et al, 2003), e que o bloqueio desses receptores por antagonistas 5-HT<sub>2C</sub> leva a efeitos ansiolíticos (Kennett, Wood, Bright, Trail, Riley, Holland, et al, 1997; Martin et al, 2002; Millan, 2005). O presente trabalho não só confirma esse efeito ansiogênico, como também sugere que parte desses efeitos seja mediada pelo subtipo 5-HT<sub>2C</sub> de receptores no HV, uma vez que o antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>2C</sub> SB-242084 bloqueou os efeitos ansiogênicos do agonista WAY-161503 injetado intraperitonealmente. No entanto, nossos resultados não confirmam a previsão de que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, por si só, promove efeitos ansiolíticos. Nosso estudo verificou, portanto, inexistência de efeitos ansiolíticos nos animais que foram microinjetados com o antagonista seletivo SB-242084 e pré-tratados com salina.

O antagonista seletivo de 5-HT<sub>2C</sub> SB-242084 preveniu os efeitos ansiogênicos induzidos pelo WAY-161503 nas medidas clássicas e nas etológicas, mas não apresentou efeitos ansiolíticos em animais microinjetados com salina. De forma semelhante aos resultados encontrados, um estudo com microinfusão de ritanserina, antagonista de 5-HT<sub>2C</sub>, na amígdala basolateral também não demonstrou efeitos ansiolíticos no LCE em níveis basais de ansiedade, mas preveniu efeitos ansiogênicos

nos animais pré-tratados com agonista 5-HT<sub>2</sub> MK-212 (Cruz, Pinheiro, Alves, Ferreira, Mendes, Faria et al, 2005). Em outro estudo, em que se injetou sistemicamente SB-242084 reverteu efeitos ansiogênicos induzidos pela administração aguda de fluoxetina (Bagdy, Graf, Anheuer, Modos & Kantor, 2001)

Em contraste, pesquisas relatam efeitos ansiolíticos em níveis basais de ansiedade (Kennett, Pittaway & Blackburn, 1994; Zangrossi & Graeff, 1994; Griebel, Perrault & Sanger 1997; Scarpelli et al, 2008). As razões para essas inconsistências não são claras, mas elas podem estar relacionadas às diferenças de estímulos aversivos aos quais os animais foram submetidos e à diferença de afinidade das drogas com os receptores serotoninérgicos.

Por um lado, em relação às diferenças de estímulos aversivos aos quais os animais são expostos em modelos de ansiedade, os testes de conflito, por exemplo, envolvem a apresentação simultânea de recompensa e choque elétrico. Em contrapartida, o LCE baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural dos animais pelos braços abertos (Pellow, 1985). O LCE não é visto como teste de conflito, pois não manipula recompensa e punição. Ele pode ser considerado um teste de exploração que envolve várias estratégias de aproximação e progressiva exploração do labirinto (Roy, Chapillon, Jeljeli, Caston & Belzung, 2009). É possível que estes modelos animais possuam sensibilidades diferentes na detecção de processos de ansiedade distintos. Desta forma, antagonistas 5-HT<sub>2C</sub> apresentaram efeitos ansiolíticos em teste de conflito, (Kennett, Wood, Bright, Trail, Riley, Holland, et al, 1997), e ausência de efeitos no LCE (Griebel, Rodgers, Ghislaine & Sanger, 1997).

Por outro lado, ao se tratar da afinidade das drogas por receptores de 5-HT, o antagonista SB-242084, utilizado neste trabalho, apresenta alta afinidade ( $pK_i=9,0$ ) pelos receptores 5-HT<sub>2C</sub>. Devido a esta alta seletividade, os efeitos encontrados neste

estudo podem ser atribuídos a atividade dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>. Drogas antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2</sub>, tais como, m-CPP, SB-206523, SB200646A e SDZ SER082 não discriminam entre os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (Kennett, Wood, Bright, Trail, Riley, Holland, et al, 1997). Portanto, seus efeitos podem ser mediados por outros receptores, que não o 5-HT<sub>2C</sub>.

Considerando essa seletividade do SB-242084, os resultados corroboram o envolvimento do receptor 5-HT<sub>2C</sub> na modulação de estados de ansiedade e apontam para o envolvimento do HV nessa regulação. É possível que a reversão dos efeitos ansiolíticos após a microinjeção de SB-242084 no HV envolva projeções serotoninérgicas predominantemente do NDR (Azmitia & Segal, 1978). Como tem sido aventada, a estimulação elétrica do NDR (McGuade & Sharp, 1997) e a exposição a situações aversivas, como o LCE, aumentam os níveis de 5-HT no HV (Voigt, Rex, Sohr & Fink, 1999). A infusão de 8-OH-DAP, agonista 5-HT<sub>1A</sub>, no NDR diminui os níveis de 5-HT nos neurônios pós-sinápticos do HV (Hutson, Sarna, O'Connel & Cursonet, 1989) e atenua estados de ansiedade em vários modelos animais, inclusive no LCE (File & Gonzales 1996; Engin & Treit, 2008).

Os efeitos na modulação de ansiedade pelo HV podem, pelo menos em parte, ocorrer por meio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, visto que estão em alta densidade nessa estrutura (Clemett, Punhani, Duxon, Blackburn & Fone, 2000; Garcia-Alcover, Segura, Garcia Pena, Martinez-Torres & Miledi, 2006). Efeitos similares apresentados nesse estudo foram encontrados ao se estimular os receptores 5-HT<sub>2C</sub> do complexo amigdalóide. A microinjeção do agonista seletivo de 5-HT<sub>2C</sub>, IL-639, e do não-seletivo, mCPP, no núcleo basolateral da amígdala resultou no aumento da vocalização ultrassônica e do tempo de latência para investigação de novos objetos no campo aberto. Esses efeitos ansiogênicos foram prevenidos nos animais pré-tratados

com SB-242084 (Campbell & Merchant, 2003). Os receptores 5-HT<sub>2C</sub> na amígdala e no HV parecem modular o comportamento de ansiedade. Atentando-se para o fato que estas duas estruturas recebem projeções do mesmo núcleo da rafe, o NDR.

Apesar da amígdala e do HV estarem envolvidos na modulação dos estados de ansiedade, diversos estudos comparando a contribuição de cada uma dessas estruturas mostram relativa independência no processamento da ansiedade. Dessa forma, lesões no HV, mas não na amígdala, produzem efeitos ansiolíticos em uma variedade de modelos animais como o LCE, o de interação social e o *successive alley test* (Kjelstrup et al, 2002; McHugh et al, 2004). Somente no teste na caixa claro/escuros os efeitos das lesões na amígdala e no HV foram similares (Bannerman et al, 2004). Esses resultados demonstram que efeitos decorrentes da lesão da amígdala são distintos das do HV. Parece que a amígdala, diferentemente do HV, não é crucial no desempenho normal de testes de ansiedade como LCE. Isto é relevante, pois demonstra que os efeitos comportamentais das lesões do HV não são simplesmente consequência de efeitos diretos ou indiretos da amígdala e indica que esta e o HV são estruturas que contribuem de forma diferenciada no processamento de estímulos aversivos.

A diferença funcional de cada estrutura pode ser melhor compreendida quando se diferencia comportamentos de medo e de ansiedade. Segundo Gray e McNaughton (2000), o medo é associado à esquiva ativa e a respostas de fuga de uma situação de perigo. A ansiedade, por outro lado, é resultado de um estímulo aversivo difuso associado a conflito e incerteza. Dessa forma, o hipocampo relaciona-se mais ao comportamento de ansiedade e a amígdala ao de medo (para revisão ver Gray, 1982).

Como foi visto no trabalho, o hipocampo ventral (HV) tem recebido destaque como sendo a porção envolvida nos comportamentos de ansiedade (Bannerman et al, 2004). Os resultados encontrados em nosso experimento corroboram o envolvimento

do HV em estados de ansiedade. Este envolvimento seria modulado, pelo menos em parte, por uma participação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, já que, os efeitos ansiogênicos induzidos pela droga WAY 161503 foram bloqueados pelo antagonista seletivo SB-242084. Além disso, nossos resultados ratificam a teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, que estabelece a 5-HT como ansiogênica (Stein et al, 1973) e a participação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> nesses comportamentos (Setem et al., 1999; Durand et al, 2003; Alves et al, 2004; Cruz et al, 2005). Estudos futuros comparando outras drogas agonistas e antagonistas de receptores 5-HT<sub>2C</sub> no HV em outros paradigmas experimentais poderão contribuir para o conhecimento sobre a circuitaria neural envolvida na ansiedade.

#### Referências

- Akimova, E., Lanzenberger, R. & Kasper, S. (2009). The Serotonin-<sub>1A</sub> Receptor in Anxiety Disorders. *Biological Psychiatry*, 66 (7), 627-635.
- Alves, S.H., Pinheiro, G., Motta, V., Landeira-Fernandez, J. & Cruz, A. P. M. (2004). Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT<sub>2C</sub> agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, 15, 37-43.
- Andrews N., Hogg S., Gonzalez L.E. & File S.E. (1994) 5-HT-1A receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. *European Journal of Pharmacology*, 264, 259–264.
- Azmitia, E.C., & Segal, M. (1978). Na autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 179 (3), 641-667.

- Bagdy, G., Graf, M., Anheuer, Z.E., Modos, E.A. & Kantor, S. (2001). Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT-sub(2C) receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT-<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100635. *International Neuropsychopharmacology*, 4(4), 399-408.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B.K., Feldon J., & Rawlins J.N. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioral Brain Research*. 139, 197-213.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Feldon, J., & Rawlins, J.N.P. (2002). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioral Brain Research*, 1-17.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., et al. (2004). Regional dissociation within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 28, 273-283.
- Barnes, N.M, & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38, 1083-1152.
- Bertoglio, L. J., Joca, S.R.L. & Guimarães, F.S. (2006). Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 175, 183-188.
- Bourin, M. & Dhonnchadha, B. A. N. (2005). 5-HT<sub>2</sub> Receptors and Anxiety. *Drug Development Research*, 65, 133–140.
- Burman M.A., Starr M.J. & Gewirtz J.C. (2006). Dissociable effects of hippocampus lesions on expression of fear and trace fear conditioning memories in rats. *Hippocampus*, 16, 103–113.

- Campbell, B.M. & Merchant, K.M. (2003). Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Research*, 993, 1-9.
- Carobrez A.P. & Bertoglio L.J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29, 1193–205.
- Clemett, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P. & Fone, K.C. (2000). Immunohistochemical localization of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology*, 39, 123-132.
- Cools, R., Roberts A.C. & Robbins T.W. (2008). Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends in cognitive sciences*, 12(1), 31-40.
- Cruz, A. P. M., Zangrossi, H., Graeff, F. G. & Landeira-Fernandez, J. (1997). Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 13 (3), 269-278.
- Cruz, A.P.M., Frei, F. & Graeff, F.G. (1994). Ethopharmacological analysis of the rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 171- 176.
- Cruz, A.P.M., Pinheiro, G., Alves, S.H., Ferreira, G., Mendes, M., Faria, L., et al. (2005). Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 182, 345-354.
- Deakin, J. F. W. & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5 (4), 305-315.

- Deakin, J. F. W. & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5 (4), 305-315.
- Degroot, A. & Treit, D. (2004). Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Research*, 1001, 60-71.
- Durand, M., Mormèd, P., & Chaouloff, F. (2003). Wistar-Kyoto rats are sensitive to the hypolocomotor and anxiogenic effects of mCPP. *Behavioural Pharmacology*, 14, 173-177.
- Engin, E. & Treit, D. (2008). The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: A systematic review. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32, 1399-1419.
- File S.E. & Gonzalez L.E. (1996) Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54, 123-128.
- File, S.E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic actions. In: Elliot, JM, Heal, D.J, Marsden, C.A *Experimental approaches to anxiety and depression*. London: John Wiley, 25-44.
- Filip, M. & Bader, M. (2009). Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*, 61, 761-777.
- Fone, K.C.F., Shalders, K., Fox, Z.D., Arthur, R. & Marsden, C.A. (1996). Increased 5-HT<sub>2C</sub> receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation. *Psychopharmacology*, 123, 346-352.
- Garcia-Alcover, G., Segura, L.C., Garcia Pena, M., Martinez-Torres, A. & Miledi, R. (2006). Ontogenetic distribution of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the rat hippocampus. *Gene Expression*, 13, 53-57.

- Gibson, E.L., Barnfield, A.M., & Curzon, G. (1994). Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT<sub>2C</sub> receptors but not by sympathomimetic effects. *Neuropharmacology*, 33, 457-465.
- Glennon, R.A., Dukat, M., & Westkaemper, R.B. (2000). Serotonin receptor subtypes and ligands. Em: Bloom, F.E., & Kupfer, D. J. (Eds.), *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress American College of Neuropsychopharmacology*. New York.
- Graeff, F. G. & Schoenfeld, R. I. (1970). Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 173, 277-283.
- Graeff, F. G. & Silveira Filho, N. G. (1978). Behavioral inhibition induced by electrical manipulation of the median raphe nucleus of the rat. *Physiology & behavior*, 21, 477-489.
- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., de Andrade, T. G. & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54 (1), 129-141.
- Graeff, F. G., Viana, M.B. & Mora, P. O. (1997). Dual Role of 5-HT in Defense and Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6), 791-799.
- Graeff, F.G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163, 467-476.
- Graeff, F.G. (2003). Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(2), 42-45.
- Graeff, F.G. (2004). Serotonin, the periaquedutal Gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 239-259.

- Gray J.A. & McNaughton N. The neuropsychology of anxiety, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- Gray, J. A. (1982). The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. New York: Oxford University Press.
- Green, A.R. (2006). Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*, 147, 145–152.
- Griebel, G. (1995). 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Psychopharmacology Therapeutics*, 65 (3), 319-395.
- Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F., Mutel, V., Martin, J.R., & Misslin, R. (1994). Evidence that tolerance to the anxiogenic-like effects of mCPP does not involve alteration in the function of 5-HT<sub>(2C)</sub> receptors in the rat choroid plexus. *Behavioural Pharmacology*, 5, 642-645.
- Griebel, G., Perrault, G., & Sanger, D.J. (1997a). A comparative study of the effects of serotonin of selective and non-selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacology*, 36, 793-802.
- Griebel, G., Rodgers, R.J., Ghislaine, P., & Sanger, D.J. (1997b). Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57, 817-827.
- Griebel, G., Rodgers, R.J., Perrault, G., & Sanger, D.J. (1997). Risk assessment behavior: evaluation of utility in the study of 5-HT- related drugs in the rat elevated plus maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57(4), 817-827.

- Guimarães, F.S., Carobrez, A. P. & Graeff, F.G. (2008). Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. Em: *Handbook of Anxiety and Fear Neuroscience*. Ed. Academic Press, Volume 17, pp. 183-194. Elsevier.
- Hannon, J., & Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195,198-213.
- Hayes, D.J., Mosher, T.M., & Greenshaw, A.J. (2008). Differential effects of 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation by WAY-161503 on nicotine-induced place conditioning and locomotor activity in rats. *Behavioural Brain Research*, 1-8.
- Hensler, J. G. (2006). *Serotonergic* modulation of the limbic system. *Neuroscience & behavioral Reviews*, 30(2), 203-214.
- Hogg S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 4, 21–30.
- Holmes, A. & Rodgers, R.J. (1999). Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 971-980.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hatin, P.R., Martin, G.R., Mylercharane, E.J., et al., (1994). VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacology Reviews*, 46, 157-203.
- Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71, 533-554.
- Hutson, P.H., Sarna, S.G., O'Connell, M.T. & Curzon, G. (1989). Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OH-DPAT into the nucleus raphé dorsalis. *Neuroscience Letters*, 100, 276-280.

- Jacob, C.A., Cabral, A.H., Almeida, L.P., Magierek, V., Ramos, P.L., Zanoveli, J.M., et. al. (2002). Chronic imipramine enhances 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors-mediated inhibition of paniclike behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72, 761-766.
- Jenck, F., Broekkamp, C.L., & Van Delf, A.M. (1989). Opposite control mediated by central 5-HT<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1B</sub> or 5-HT<sub>1C</sub>) receptors on periaqueductal gray aversion. *European Journal of Pharmacology*, 161(2-3), 219-221.
- Jolas T., Schreiber R., Laporte A.M., Chastanet M., Devry J., Glaser T., et. al. (1995). Are postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272, 920–929.
- Jones, N., Duxon M.S., & King, S.M. (2002). 5-HT<sub>2C</sub> receptor mediation of unconditioned escape behaviour in the unstable elevated exposed plus maze. *Psychopharmacology*, 164, 214-220.
- Kennett G.A., Pittaway K. & Blackburn, T.P. (1994) Evidence that 5-HT<sub>2c</sub> receptor antagonists are anxiolytic in the Geller–Seifter model of anxiety. *Psychopharmacology*, 114, 90–96.
- Kennett, G. A., Whitton, P., Shah, K., & Curzon, G. (1989) Anxiogenic-like effects of mCPP and TFMPP in animal models are opposed by 5-HT<sub>1C</sub> receptor antagonists. *European journal of pharmacology*, 164(3), 445-454.
- Kennett, G.A. & Curzon, G. (1988). Evidence that mCPP may have behavioural effects mediated by central 5-HT<sub>1C</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology*. 94, 137–147.

- Kennett, G.A., Lightowler, S., Trail, B., Bright, F., & Bromidge, S. (2000). Effects of RO 60 0175, a 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, in three animal models of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, 397, 197-204.
- Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., Trail, B., Riley, G., Holland, et al. (1997). SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 36, 609-620.
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., & Moser, M.B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 10825-10830.
- Krishnan, V., & Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455, 894-902.
- Ledoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155–184.
- Lister, R.G. (1990). Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology Therapy*, 46, 321-340.
- Martin, J.R., Ballard, T.M., & Higgins, G.A. (2002). Influence of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71, 615–625.
- Martin, J.R., Bös, M., Jenck, F., Köhler, C., Moreau, J-L., Sleight, A.J., Stacler, H. & Wichmann, J. (1995). 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists and antagonists in animal models of anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, 5(3), 209, S-17-5.
- Martin, J.R., Bös, M., Jenck, F., Moreau, J.L., Mutel, V., Sleight, A.J., Wichmann, J., Andrews, J.S., Berendsen, H.H.G., Broekkamp, C.L.E, Ruigt, G.S.F., Köhler, C., &

- van Delft, A.M.L.(1998). 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Agonists: Pharmacological Characteristics and Therapeutic Potential. *Pharmacology*, 286(2), 913-924.
- McHugh, S.B., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., & Bannermen, D.M. (2004). Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neurosciences*, 118, 63-78.
- McNaughton N. & Corr P.J. (2004). A two-dimensional psychology of defense: anxiety/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28, 285–305.
- McNaughton, N., & Gray, J.A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of affective disorders*, 61, 161-176.
- McQuade, R. & Sharp, T. (1997). Functional Mapping of Dorsal and Median Raphe 5-Hydroxytryptamine Pathways in Forebrain of the Rat Using Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 69, 791-796.
- Menard, J. & Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 23, 591-613.
- Millan, M.J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70, 83-244.
- Millan, M.J. (2005). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Thérapie*. 60(5), 441-460.
- Mora, P. O., Ferreira Neto, C. & Graeff, F. G (1997). Role of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtypes of fear generated by the elevated T maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58: 1051-1057.

- Moser, M. B. & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 608-619.
- Mosher, T.M., Smith, J.G., & Greenshaw, A.J. (2006). Aversive stimulus properties of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist WAY 161503 in rats. *Neuropharmacology*, 51, 641-650.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Bourin, M., & Hascoet, M. (2003). Anxiolytic-like effects of 5-HT<sub>2</sub> ligands on three mouse models of anxiety. *Behavioral Brain Research*, 140, 203-214.
- Nogueira, R.L., & Graeff, F.G. (1995). Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal Gray generated aversion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52(1), 1-6.
- Nunes-de-Souza, R. Canto-de Souza, A. & Rodgers, R. J. (2002). Effects of intra-hippocampal infusion of WAY- 100635 on plus-maze behavior in mice. *Brain Research*, 927, 87-96.
- Ohara, K., Nagai, M., Suzuki, Y., Ochiai, M. & Ohara, K. (1998). Association between anxiety disorders and a functional polymorphism in the serotonin transporter gene. *Psychiatry Research*, 81(2), 277-279.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>a</sup> ed. New York: Academic Press.
- Pellow, S. Chopin, P., File, S.E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24, 525-529.
- Pentkowski N.S., Blanchard D.C., Lever C., Litvin Y. & Blanchard R.J. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, 23, 2185–2196.

- Petrovich, G. D., Canteras, N. S. & Swanson, L.W. (2001). Combinatorial inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavioral systems. *Brain Research Reviews*, 38, 247-289.
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., & Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 369-391.
- Pompeiano, M., Palácios, J.M., & Mengod, G. (1994). Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Molecular Brain Research*, 23, 163-178.
- Ripoll, N., Hascoet, M. & Bourin, M. (2006) P.1.d.010 A dopaminergic mechanism recruited in the anti-punitive effect of the DOI in the four-plates test-retest paradigm. *European Neuropsychopharmacology*, 16(4), 254-255.
- Robichaud, R. C., & Sledge, K.L. (1969). The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induce conflict in the rat. *Life Science*, 8, 965-969.
- Rodgers, R. J. & Dalvi, A. (1997). Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 2(6), 801-810.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A. & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (3), 289-304.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C., Cobain, M.R., Daly, P., Doran, P.J., Eells, J.R., et. al. (1992). Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CG 12066b, TFMPP and mCPP. *Behavioural Pharmacology*, 3, 621-634.

- Roy, V., Chapillon, P., Jeljeli, M., Caston, J., & Belzung, C. (2009). Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. *Psychopharmacology*, *203*, 131-141.
- Scarpelli, G., Alves, S. H., Landeira-Fernandez, J. & Cruz, A. P. M. (2008). Effects of two selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor-acting compounds into the ventral hippocampus of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, *1*, 87-96.
- Setem, J., Pinheiro, A.P., Motta, V.A., Morato, S., & Cruz, A.P.M. (1999). Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *62*(3), 515-521.
- Stein, L., Wise, C. D. & Berger, B. D. (1973). Antianxiety actions of benzodiazepines: Decrease in activity of serotonin neurones in the punishment systems. In: S. Gratini, E. Mussini e L.O. Randell (eds.), *Benzodiazepines*. (pp. 299-326). New York: Raven Press
- Tye, N.C., Everitt, B.J. & Iversen, S.D. (1977). 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature*, *268*, 741-742.
- Voigt, J.P., Rex, A., Sohr, R., & Fink, H. (1999). Hippocampal 5-HT and NE release in the transgenic rat TGR(mREN2)27 related to behavior on the elevated plus maze. *European Neuropsychopharmacology*, *9*, 279-285.
- Wallis, C.J., & Lal, H. (1998). A discriminative stimulus produced by 1-(3-chlorophenyl)-piperazine (mCPP) as a putative animal model of anxiety. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, *22*, 547-565.
- Wood, M.D. (2003). Therapeutic potential of 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonists in the treatment of anxiety disorders. *Current Drug Targets CNS and Neurology Disorders*, *2*, 383-387.

Zangrossi H. & Graeff F.G. (1994). Behavioral effects of intraamygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal Medical Biol Res*, 27, 2453–2456.