

APARECIDA MÁRCIA LUCINDA

MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA DO NÚCLEO MEDIANO DA RAPE:
IMPLICAÇÕES SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE
RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.

Florianópolis –SC

2006

APARECIDA MÁRCIA LUCINDA

MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA DO NÚCLEO MEDIANO DA RAPE:
IMPLICAÇÕES SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE
RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof.Dr. Moacir Serralvo Faria

Florianópolis-SC

2006

AQUI VAI A FOLHA QUE DEIXEI COM OS NOMES DOS
PROFESSORES DA BANCA, PARA SCANEAR.

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenha medo dos tropeços da jornada. Não se esqueça de que você, ainda que incompleto, foi o maior aventureiro da História.

Você é Insubstituível

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Nossa Senhora Aparecida, por esta sempre ao meu lado, tanto nas horas mais feliz de minha vida quanto nas mais difíceis.

Aos animais utilizados nesta pesquisa obrigada, por ter dado a vida em benefício do conhecimento.

Aos funcionários da Fisiologia, meu agradecimento, em especial ao seu Carlos, Nivaldo, Dona Vilma e Nivaldo da secretária.

Aos professores que foram mediadores do processo de formação.

A Professora Marta, pela força nos momentos difíceis, com a frase “tudo vai dar certo, é assim mesmo”.

Ao Professor Marino pela ajuda na análise histológica.

Aos colegas, Fabio, Marcos, Marine, Simone, Eduardo, Murilo, Bruno, Lenir, Isabel, em especial a minha grande amiga Luana, que sempre alegre e prestativa, estava do meu lado ajudando em tudo.

Aos membros da Banca Examinadora, por estarem dispostos a dar sua contribuição a este trabalho.

Ao meu orientador, Moacir, agradeço por ter sido mediador do meu crescimento como pesquisadora e também por ter proporcionado a realização de deste sonho.

Ao meu marido e filhas por compartilharem comigo deste sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	ix
TABELA.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRAC.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Serotonina e Ansiedade.....	1
1.2. Núcleo Mediano da rafe.....	1
1.3. Noradrenalina e Ansiedade.....	11
1.4. Labirinto em cruz elevado.....	12
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	16
3. 1. Animais.....	16
3.2. Cânulas-guia e Cirurgia Estereotáxica.....	16
3.3. Microinjeção intracerebral.....	18
3.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	18
3.5. Procedimentos.....	19
3.6. Histologia.....	20
3.7. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	31

CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Página

1: Sistemas moduladores serotoninérgicos (grupo B) que apresentam neurônios concentrados na linha mediana do trono encefálico e mesencéfalo.....	13
2 Porcentagem de entrada e tempo nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE. Os animais receberam (via i.c.) Noradrenalina, nas doses 2, 20, nmol, ou salina 0,9%.....	23
3 Número de entrada nos braços abertos e fechados de ratos submetidos a duas exposições no LCE. Os animais receberam (via i.c.) Noradrenalina, nas doses 2, 20, nmol, ou salina 0,9%.....	24
4 Porcentagem de entrada e tempo nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE. Os animais receberam (via i.c.) Clonidina, nas doses 20, 40, nmol, ou salina 0,9%.....	26
5 Número de entrada nos braços abertos e fechados de ratos submetidos a duas exposições no LCE. Os animais receberam (via i.c.) Clonidina, nas doses 20, 40, nmol, ou salina 0,9%.....	28

LISTA DE SIGLAS

- %A: porcentagem de entradas nos braços abertos
- CLO: Clonidina
- CLO20: grupo de animais tratados com noradrenalina na dose de 20nmol
- CLO40: grupo de animais tratados com noradrenalina na dose de 40nmol
- DR: Dorsal da Rafe
- 5-HT: serotonina
- LCE: labirinto em cruz elevado
- NA: Noradrenalina
- MR: Mediano da Rafe
- NA2: grupo de animais tratados com noradrenalina na dose de 2nmol
- NA20: grupo de animais tratados com noradrenalina na dose de 20nmol
- NSL: Núcleo Supra Lemniscal
- Pn: Núcleos Potinos
- SNC: Sistema Nervoso Central
- SL: região Supra Lemniscal
- %T: porcentagem de tempo nos braços abertos
- EA: entrada nos braços abertos
- EF: entrada nos braços fechados
- PAG: Matéria Cinzenta Periaquedutal

TABELA

Página

1. Principais vias serotoninérgicas com suas projeções e implicações fisiopatológicas.....	3
--	---

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da microinjeção de noradrenalina (NA) e clonidina (CLO) na região supra-lemniscal (SL) e no núcleo mediano da rafe (MR) sobre a aquisição de memória emocional em ratos submetidos a duas exposições (E) ao labirinto em cruz elevado (LCE). Ratos wistar machos (*Rattus norvegicus*; 250-270g), com cânula guia implantada na região SL e no MR, foram microinjetados com salina (0.9%), NA (2 e 20nmol) ou CLO (20 e 40 nmol) e, após dez minutos, foram submetidos a cinco minutos de exploração no LCE (E₁). No dia seguinte os animais foram re-expostos ao LCE pelo mesmo período (E₂), sendo posteriormente submetidos à anestesia profunda (Nembutal; 40 mg/kg) e perfusão com formol 10%. Os cérebros foram removidos e submetidos à análise histológica. Animais cujos pontos de injeção estavam nos núcleos pontinos (PN) foram usados como controle.

Os resultados mostraram que a microinjeção de NA (2 e 20nmol) nos PN, na região SL e no MR não alterou o comportamento dos animais, nem durante a E₁, nem durante a E₂ no LCE. A microinjeção de CLO foi ansiogênica nos PN (20nmol) e ansiolítica no MR (20nM) e na região SL (40nmol) durante a E₁ ao LCE. Não houve alteração no comportamento dos animais durante a E₂. Na comparação E₁ x E₂, a microinjeção de NA (40nmol) na região SL e no MR, mas não de CLO, prejudicou a aquisição de memória emocional, visto que os animais exibiram o mesmo nível de ansiedade nas duas exposições ao LCE. Os resultados são discutidos considerando-se a modulação noradrenérgica de neurônios serotoninérgicos na região SL e no MR e a liberação de serotonina em áreas de projeção.

Palavras-chave: ansiedade, serotonina (5-HT), noradrenalia, clonidina, núcleo mediano da rafe região supra-lemniscal, núcleos pontinos.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of the noradrenaline (NA) and clonidine (CLO) microinjections into the supra-lemniscal region and median raphe nucleus (MR) upon the acquisition of emotional memory in rats submitted to two elevated plus maze (EPM) exposures. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing 250-270g, with guide cannula implanted in either the SL region or MR were subjected to microinjections with either saline (0.9%), NA (2 and 20nmol) or CLO (20 and 40nmol). After 10 min, the animals were submitted to 5 min EPM exploration (E_1). On the next day, the animals were re-exposed to the EPM for the same period (E_2). To assure the correct injection place, animals were deeply anesthetized (Nembutal; 40 mg/kg) and perfused with phormol 10%. The rat brains were submitted to histological analysis. Animals whose injection points localized in the pontinus nucleus (PN) were used as control.

The data showed that NA microinjection (2 and 20nmol) in the PN, SL region and MR failed to change the animal's behavior in either E_1 or E_2 EPM exposure. The microinjection of CLO (20nmol) was anxiogenic in the PN and anxiolytic in the MR (20nmol) and SL region (40nmol) during E_1 . There was no change in animal's behavior along E_2 . In addition, $E_1 \times E_2$ comparisons showed that NA microinjections (40nmol I) impaired the emotional memory acquisition, since the animals exhibited the same level of anxiety in both EPM exposures. The data are analyzed by taking into account the noradrenergic modulation of serotonergic neurons localized in SL region and MR and the serotonin release in projections areas.

Keywords: anxiety, serotonin (5-HT), noradrenaline, clonidine, median raphe nucleus, supra-lemniscal region, pontinus nucleus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serotonina x Ansiedade

O papel da 5-HT na ansiedade tem sofrido modificações ao longo do tempo. A proposta inicial foi de que um aumento da neurotransmissão serotoninérgica estaria associada a um aumento da ansiedade, enquanto uma diminuição estaria relacionada com a redução da ansiedade (Graeff, 1999). Estudos posteriores mostraram que esta hipótese seria uma simplificação inadequada, visto que a função da 5-HT na ansiedade varia de acordo com a estrutura cerebral, tipo de receptores e quadro ansioso considerado. Segundo Deakin e Graeff (1991) um aumento da neurotransmissão serotoninérgica no circuito incluindo o mediano da rafe, amígdala, mediada por receptores pós-sinápticos 5HT₂, estaria relacionado ao Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG); por outro lado, uma diminuição na neurotransmissão de 5-HT na via núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal dorsal estaria relacionada ao Transtorno do Pânico.

De todos os núcleos da rafe, o núcleo mediano (MR) e o núcleo dorsal (DR) são os que apresentam o maior número de neurônios serotoninérgicos (Tork e Hornung, 1990; Adell et al., 2002).

1.2. Núcleo Mediano da Rafe

Dahlstrom e Fuxe (1964) demonstraram que os corpos celulares de neurônios serotoninérgicos no tronco-encefálico agrupam-se de maneira a formar oito núcleos na linha mediana (B1 a B8), conhecidos genericamente por núcleos da rafe. Na rafe mesencefálica, destaca-se o núcleo supralemniscal (NSL ou B9), localizado mais lateralmente (Vertes e Crane, 1997). A figura 1 ilustra uma nomenclatura alfanumérica, adotada por estes pesquisadores. Os grupos de células B1a B4 são os mais caudais situados no bulbo, têm

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

projeções descendentes, sendo que o B4 participa da modulação endógena da dor (Graeff & Brandão, 1999). Estes grupos apresentam projeções ao prosencéfalo através de dois grandes feixes: um que se dirige para a matéria cinzenta periaquedutal central e outro para a parte ventral do tegmento (Tork e Hornung, 1990). O mais rostrais (B5 a B9) são importantes na regulação do ciclo sono-vigília e na modulação do comportamento motivacionais e emocionais (Lent, 2001).

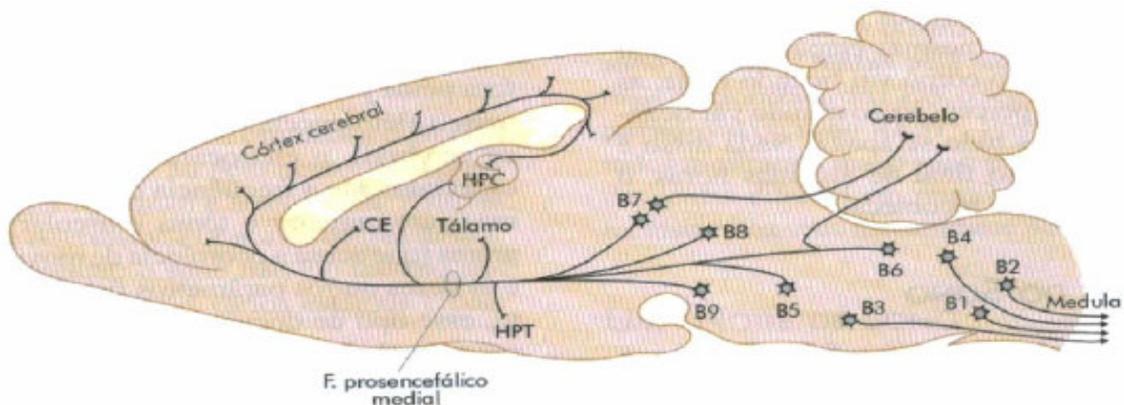


Figura 1: Sistemas moduladores serotoninérgicos (grupo B) que apresentam neurônios concentrados na linha mediana do trono encefálico e mesencéfalo. Extraído de Lent,2001.

De todos os núcleos da rafe, o MR e o DR são os que apresentam o maior número de neurônios serotoninérgicos. O DR corresponde ao grupo de células B6 e B7 e o MR ao grupo de células B8. Os demais núcleos da rafe apresentam um menor número de células serotoninérgicas (Vertes e Crane,1997).

Os núcleos DR e MR representam a fonte principal de neurônios serotoninérgicos que envia projeções por vias ascendentes (Bobillier et al.,1975; Azmitia e Segal, 1978; Molliver, 1987). As fibras que partem do DR são finas e difusas, com varicosidades pequenas ou granulares. Essas se ramificam em

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

direção as estruturas alvo. A incidência de sinapses com essas fibras é ainda controversa. Por outro lado, as fibras que partem do MR são grossas e apresentam grandes botões arredondados ou ovais, cujos terminais estabelecem sinapses com o soma e os dendritos das células alvo. Esses dois sistemas provavelmente coexistem em todas as áreas do cérebro, mas sua distribuição pode variar consideravelmente: o córtex cerebral é a região que recebe mais intensamente os dois tipos de fibras; o estriado recebe inervação exclusivamente do sistema de fibras varicosas finas, a partir do DR, enquanto o giro dentado recebe alta concentração das chamadas “fibras cestos” originadas do MR (Kosofsky e Molliver, 1987; Mamounas e Molliver, 1988; Tork, 1990).

Investigações abordando a origem mesencefálica dos axônios serotoninérgicos demonstraram que os núcleos DR e MR seriam as principais fontes de inervação serotoninérgica ascendente (Bobillier et al., 1975; Molliver, 1987; Haring, 1991). As vias serotoninérgicas ascendentes seguem um estreito paralelismo com as vias noradrenérgicas e dopaminérgicas. Podem ser distinguidas duas vias serotoninérgicas ascendentes: a dorsal e a ventral. A ventral se origina principalmente no MR e DR, com predomínio do mediano, percorre o tegmento ventral e penetra no feixe prosencefálico medial, projetando-se ao hipolátamo posterior e corpos mamilares. Ao longo de seu caminho ascendente, envia fibras para o núcleo interpeduncular, substância negra e tálamo. Um outro contingente do sistema ventral atravessa o fórnix em direção ao septo e hipocampo. A via serotoninérgica ascendente dorsal origina-se principalmente no DR e distribui-se para a matéria cinzenta periaquedutal, colículos superior e inferior e hipotálamo, onde se junta à via serotoninérgica ventral. A partir daí as duas vias projetam-se para a amígdala e neocórtex. As vias serotoninérgicas descendentes originam-se dos núcleos da rafe bulbares, entre os quais está o núcleo magno da rafe, do qual partem vias que se projetam no corno dorsal da medula. Estas vias constituem um importante

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

sistema descendente de controle da dor (Graeff e Brandão, 1999). Outras regiões cerebrais como a linha média do tálamo e os núcleos supraquiasmático do hipotálamo recebem fibras serotoninérgicas de ambos os núcleos da rafe (Azmitia e Segal, 1978).

Tabela 1: principais vias serotoninérgicas com suas projeções e implicações fisiopatológicas (extraído de Graeff e Brandão, 1999)

Origem	Projeções	Implicações Fisiológicas e Clínicas
Núcleo Mediano da Rafe	Formação reticular, tálamo e áreas inervadas pelo feixe prosencefálico medial (por exemplo, o hipocampo).	Regulação do fluxo sanguíneo cerebral, sono e enxaqueca, tolerância ao estresse persistente, inibição comportamental, impulsividade.
Núcleo Dorsal da Rafe	Colículos, matéria cinzenta periaquedutal, amígdala, gânglios da base, neocórtex, hipocampo.	Estimulação por eventos aversivos, regulação do comportamento defensivo, ansiedade.

Segundo Gray e McNaughton (2000) a ansiedade estaria relacionada com a ativação de um sistema de inibição comportamental, que levaria a um aumento nos níveis de atenção e vigilância. O sistema seria representado principalmente pelo sistema septo-hipocampal, o qual é constituído pelo hipocampo, córtices entorrinal e cingulado posterior e área septal, além de

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

suas interconexões e vias monoaminérgicas ascendentes que inervam estas estruturas prosencefálicas.

O sistema de inibição comportamental é responsável pelo controle do comportamento quando há presença de uma fonte de perigo, ou seja, quando existem dois planos conflitantes: obter a segurança e satisfazer a tendência de aproximação (Gray e McNaughton. 2000).

Segundo Gray e McNaughton. (2000) a função do sistema septo-hipocampal é promover a inibição do comportamento em curso, com o objetivo de avaliar o grau de ameaça enquanto ocorre uma exploração cautelosa do ambiente, o que exigiria de um aumento nos níveis de atenção e vigília. Essa reação de defesa seria caracterizada, principalmente, pelo comportamento de avaliação de risco (risk assessment). No entanto esse sistema é acionado apenas quando existe conflito entre as tendências de aproximação do perigo e de esquiva, e não simplesmente em resposta a presença de estímulos aversivos. Para ativar o sistema de inibição comportamental é necessários ativar, ao mesmo tempo, o sistema de congelamento/fuga/luta, e o sistema de aproximação comportamental, isto é, colocar o animal em uma situação de conflito aproximação/esquiva. Nesse caso, a supressão do comportamento em curso é substituída pela exploração do ambiente, com aumento na atenção e avaliação de risco, com a análise da informação captada com a memória. O sistema septo-hipocampal importante na resolução de conflitos e, para isso, aumentaria a valência dos estímulos e associações afetivamente negativas. A partir daí, a esquiva passa a ser preponderante no conflito aproximação/esquiva. Enfim, uma consequência da ativação do sistema é uma alteração do equilíbrio entre as tendências de aproximação e esquiva na direção da esquiva (Gray e McNaughton, 2000).

Estudos morfológicos tem mostrado que o sistema septo-hipocampal é inervado principalmente pelo MR (Azmitia e Segal, 1978; Graeff e Silveira Filho, 1978; Pires et al., 1993; McKenna e Vertes, 2001).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

O núcleo MR parece participar da inibição comportamental no rato, visto que lesões dessa estrutura induzem claros sinais de desinibição comportamental. Além disso, a estimulação elétrica desse núcleo determina inibição comportamental intensa, induzindo o congelamento, com o aumento da defecação e do nível de vigília possibilitando ao animal a avaliação de possíveis fontes de perigo (Graeff e Silveira Filho, 1978). Além disso, lesões eletrolíticas desse núcleo inibem a resposta de congelamento condicionado ao contexto (Avanzi et al., 1998).

Quanto aos receptores serotoninérgicos diversos estudos fisiológicos tem demonstrado múltiplos receptores para a 5-HT no sistema nervoso central. Com isso, a 5-HT pode apresentar diferentes funções nos diversos sistemas cerebrais, dependendo do subtipo de receptor (Pazos e Palácios, 1985; Cheetham, 1990).

Os receptores 5-HT_{1A} têm uma distribuição ampla no cérebro de varias espécies, incluindo o homem, sendo particularmente abundantes nos núcleos da rafe e em áreas límbicas, como o hipocampo, septo, amígdala e o córtex entorrinal. Uma das regiões onde os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos se concentram é a formação hipocampal. Os receptores 5HT_{1A} estão ligados pela proteína G ao seu sistema de segundo mensageiro, que envolve a inibição da adenilciclase (Pazos e Palácios, 1985; Pazos et al., 1987, Palácios, 1990).

Nos neurônios da rafe, os receptores 5-HT_{1A} estão localizados, principalmente, na região pré-sináptica, sendo autoreceptores somatodendríticos que regulam a frequência de disparos de neurônios serotoninérgicos (Hall et al., 1985; Vergé et al., 1985, 1986). Por outro lado, nas estruturas límbicas a localização dos receptores 5-HT_{1A} é principalmente pós-sináptico (Hall et al., 1985; Vergé et al., 1985, 1986). A ativação dos receptores 5-HT_{1A} com localização pré-sináptica reduz a síntese e liberação de serotonina (Invernizzi et al., 1991) enquanto a ativação dos receptores pós-sinápticos

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

resultam em inibição neural (Van den Hooff, e Galvan, 1992) Esses receptores são considerados importantes por estarem, possivelmente, envolvidos na regulação de comportamentos emocionais e afetivos e no mecanismo de ação dos agentes terapêuticos usados na ansiedade (Graeff, 1997).

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos desencadeia hiperpolarização, inibindo a atividade neuronal e possibilitando o efeito ansiolítico. Já ativação de receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃ propicia a despolarização neuronal, favorecendo processos excitatórios e, podem produzir um efeito ansiogênico (Schreiber e De Vry, 1993).

Com base nessas pesquisas, foram sugeridos que diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos, mediando diferentes mecanismos serotoninérgicos, estão envolvidos na gênese da ansiedade e outras alterações emocionais.

Levando em conta a hipótese de que o sistema nervoso central possui mais de um mecanismo de controle da ansiedade, e que estes são afetados de maneira diferentes pela 5-HT, Deakin e Graeff (1991) propuseram uma teoria levando em consideração as diferenças anatômicas e funcionais das diferentes vias serotoninérgicas e os diferentes tipos de receptores possivelmente envolvidos na funcionalidade dessas vias. Portanto projeções do DR a receptores do tipo 5-HT₂ e talvez 5-HT₃ na amígdala, estariam relacionadas à modulação de respostas frente a eventos aversivos agudos, facilitando a resposta de esquiva, ansiedade e medo condicionado. Já um aumento de 5-HT nos receptores 5-HT_{1A} hipocampais, originadas do MR modularia respostas desencadeadas por eventos aversivos continuados, promovendo tolerância ao estresse. Uma falha nesse sistema ocasionada pelo excesso de glicocorticóides, estresse crônico, dificuldades psicossociais ou excesso de ansiedade podem desencadear os sintomas de depressão (Deakin e Graeff 1991).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Os neurônios serotonérgicos na rafe mesencefálica estão submetidos a um múltiplo sistema de controle, envolvendo aferências noradrenérgicas, do locus coeruleus, glutamatérgica, do córtex pré-frontal medial e habenula lateral, além de terminais serotonérgicos dos próprios núcleos da rafe (Adell et al.,2002). Desse modo a freqüência de disparo dos neurônios serotonérgicos na rafe e conseqüentemente a liberação de 5-HT em regiões prosencefálica, depende do nível extracelular de múltiplos neurotransmissores, tais como noradrenalina, glutamato, GABA, dopamina, histamina, óxido nítrico e serotonina. Diferentes neuropeptídeos também podem influenciar a freqüência de disparo dos neurônios serotonérgicos e, por conseguinte, a liberação de 5-HT em regiões prosencefálicas (Jacobs e Azmitia, 1992; Piñeyro e Blier, 1999; Adell et al.,2002).

Quanto as aferências a literatura tem demonstrado que núcleo dorsal e mediano da rafe recebem inervação do locus coeruleus (núcleos noradrenérgicos) o qual possui uma grande quantidade de receptores adrenérgicos, estudos também comprovam a existência de enzimas sintetizadoras, degradadoras e transportadoras de noradrenalina nos núcleos da rafe, fornecendo evidências as aferências noradrenérgicas na rafe, a qual exercem uma ação facilitatória tônica na transmissão serotonérgica através de adrenoreceptores α_1 (Adell et al.,2002).

O Locus coeruleus é um importante núcleo do tronco encefálico do rato que inerva o telencéfalo e o diencefalo, incluindo o neocórtex, hipocampo, amígdala, septo, tálamo e hipotálamo (Feldman, 1997), além de influenciar outras áreas de projeções.

Quanto a autoregulação da liberação e síntese de 5-HT, os neurônios serotonérgicos apresentam uma quantidade moderada de receptores 5-HT₁ (Pazos e Palácios1985, Sotelo et al.; 1990; Kia et al.,1996; Adell e Artigas. 1998; Adell et al.,2002), que funcionam como autoreceptores que regulam a freqüência de disparo de neurônios serotonérgicos, pela

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

ativação dos receptores 5-HT₁, mediada por uma hiperpolarização da membrana através da abertura de canais de potássio, (Mongeau et al.,1997), na qual regula a síntese e liberação de serotonina nas áreas de projeção (Sprouse e Aghajanian, 1987; Sinton e Fallon, 1998; Bosker et al.,1994; Adell et al.,2002). Porém, a liberação basal de serotonina pelos núcleos da rafe não parece estar sob controle tônico desses autoreceptores (Adell et al.; 2002). Portanto, o papel fisiológico desses autoreceptores é funcionar como sensores que respondem com a redução do disparo e liberação serotoninérgica quando a concentração do transmissor endógeno no espaço extracelular se torna excessiva (Adell et al., 2002).

Os adrenoreceptores dos grupos α_1 e α_2 presentes em neurônios serotoninérgicos do MR, podem alterar a liberação de 5-HT neste núcleo por mecanismos diferentes. A administração de um antagonista α_1 no MR, tal como o prazosin reduz marcadamente a liberação de serotonina no MR, evidenciando que neste núcleo a liberação de serotonina pode ser tonicamente estimulada pela ativação dos receptores α_1 adrenérgicos. Este antagonista não afeta a concentração de 5-HIAA (ácido-5hidroxiindolacético), denotando que sua ação modula a liberação, mas não o metabolismo da 5-HT no MR (Adell & Artigas, 1999). A redução de 5HT extracelular induzida por prazosin, foi maior no hipocampo que no estriado, estruturas inervadas pelo núcleo mediano e dorsal da rafe respectivamente, sugerindo uma sensibilidade maior do MR para agentes α_1 adrenérgicos. Como no MR o receptor α_{1B} adrenérgico predomina (Day,H.E. et al.,1997; Adell et al.,2002), infere-se que ele seja o responsável pela influência facilitatória tônica adrenérgica sobre neurônios serotoninérgicos. Podendo assim dar suporte a idéia que a noradrenalina endógena pode influenciar de forma consistente e determinante a frequência de disparo destes neurônios e, por conseguinte, as respostas comportamentais evocadas pela 5-HT, conforme o tipo de receptor adrenérgico ativado (Mongeau et al.,1997).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Componentes α_2 adrenérgicos também afetam a liberação de 5-HT no MR, sendo que, *in vivo*, a liberação serotoninérgica deste núcleo diminui após a aplicação local de clonidina um agonista α_2 , (Adell et al.,2002). A administração no MR de RX821002 (antagonista α_2) e de BRL44408 (antagonista seletivo α_{2A}) aumentam a liberação de serotonina neste núcleo (Adell e Artigas, 1999; Adell et al.,2002). Porém a administração de clonidina neste núcleo diminui a concentração de 5-HIAA (Clemente et al.,1992), de acordo com alguns estudos , a síntese de 5-HT é inibida após a ativação de adrenoreceptores α_2 (Yoshiaka et al.,1992). Sendo assim uma lesão em neurônios noradrenérgicos centrais com 6-OHDA (6-hidroxidopamina) leva ao desaparecimento dos efeitos observados com drogas seletivas α_2 adrenérgicas sobre a descarga serotoninérgica do mediano da rafe, mostrando que os receptores α_2 encontram-se predominantemente em terminais noradrenérgicos (Yoshiaka et al.,1992 Haddjeri et al.,1996). Portanto sugere-se que a clonidina inibe a liberação de noradrenalina de vesículas pré-sinápticas localizadas nos terminais noradrenérgicos, removendo assim o tônus estimulatório dos receptores α_1 adrenérgicos localizados sobre os neurônios serotoninérgicos, resultando em uma liberação de 5-HT diminuída no MR (Clemente et al.,1992; Yoshiaka et al.,1992).

Dados da literatura também evidenciam a presença de receptores β adrenérgicos sobre terminais serotoninérgicos em outras regiões do SNC (Hensler JG et al.,1991), contudo, parece que eles não exercem modulação direta sobre a liberação de 5-HT. Isto é sugerido porque o efeito inibitório da noradrenalina sobre a liberação de 5-HT através de receptores α_2 adrenérgicos não é bloqueado por antagonistas β adrenérgicos (Frankhuijzen et al.,1980; Gothert, & Huth, 1980), e também porque agonistas β adrenérgicos administrados isoladamente não exercem qualquer efeito sobre a liberação de 5-HT (Baumann e Waldmeier, 1981; Frankhuijzen et al.,1988; Mendelson e McEwen, 1992). Porém, não se descarta a idéia que a estimulação de

receptores β adrenérgicos possa ter um efeito modulatório sobre uma concomitante ativação sustentada e prolongada na liberação de 5-HT, através de alguns mecanismos ainda não identificados (Mongeau et al.,1997). Também não pode ser excluída a hipótese de que a própria 5-HT regule a função dos receptores β adrenérgicos, pois dados na literatura mostram alterações, ou seja, redução no número e na função destes receptores após prejuízo ou lesão da neurotransmissão serotoninérgica (Sulser, e Snaders-Bush, 1987).

1.3. Noradrenalina x Ansiedade

De acordo com a literatura a estimulação do locus coeruleus induz comportamento de “fuga ou luta” em macacos (Kahn et al.,1988). Este comportamento estaria associado à elevação nos níveis de noradrenalina e metoxi-hidroxi-fenilglicol (MHPG) no cérebro, líquido cerebrospinal e no plasma dos animais. Além disso, como indicam Uhde et al., (1984), drogas que aumentam a atividade do locus coeruleus têm efeitos ansiogênicos, enquanto drogas que diminuem a atividade do locus coeruleus têm efeito ansiolítico. Segundo Dennis et al., (1995) o sistema noradrenérgico estaria envolvido na ansiedade e medo.

A principal via noradrenérgica estende-se do locus ceruleus até os núcleos talâmicos, mesencéfalo e áreas inervadas pelo feixe prosencefálico medial. Esta via encontra-se envolvida nas respostas de ansiedade de caráter fisiológico (reações de medo) e patológico (síndrome do pânico). Distinguem-se três tipos principais de receptores noradrenérgicos: α_1 , α_2 e β . O α_2 é um receptor pré-sináptico de função auto-reguladora que, quando estimulado, inibe a liberação de noradrenalina na fenda sináptica. Os receptores α_1 e β são receptores pós-sinápticos, envolvidos na regulação do humor e na resposta de ansiedade.

A regulação da atividade noradrenérgica é múltipla, mas a principal é feita pelo receptor α_2 adrenérgico pré-sináptico que regula a liberação da noradrenalina através de um mecanismo de retroalimentação negativa.

Há evidências de que a 5-HT e a noradrenalina agem de maneira integrada no cérebro, (Hopwood, e Stamford, 2001), por isso a importância de se estudar o sistema de modulação da noradrenalina sobre a 5-HT.

1.4. Labirinto em Cruz Elevado

Os modelos animais de ansiedade têm sido amplamente utilizados para estudar o comportamento de defesa, os diferentes sistemas de neurotransmissão e as diferentes estruturas neurais envolvidas nesse comportamento (Griebel, 1995; Walker e Davis, 1997; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Ademec, R. 2001).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos mais populares modelos de ansiedade. Este modelo segue o modelo do trabalho de Montgomery (1955) sobre a relação entre o medo e a motivação exploratória nos ratos, e baseia-se na seguinte premissa: um ambiente novo pode gerar tanto curiosidade quanto medo, criando, portanto, um típico conflito “aproximação-esquiva”. O LCE consiste de quatro braços, dois braços abertos opostos a dois braços fechados, elevados do chão. A resposta de esquiva aos braços abertos corresponde à idéia de que estas áreas evocam reação de medo maior que a provocada pelos braços fechados. Portanto, as proporções das atividades (frequência de entrada e tempo) nos braços abertos do LCE são tidas como índices tradicionais de ansiedade (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

A maioria dos experimentos desenvolvidos para o estudo do papel das estruturas límbicas no armazenamento e recuperação de informação tem usado ratos treinados em tarefas que requerem o aprendizado de respostas

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

complexas ou a privação alimentar, o que dificulta a interpretação dos resultados das lesões ou intervenções farmacológicas. Este fato tem sido contornado com o uso do labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo que demonstrou ser muito eficiente na avaliação de uma grande parte dos fármacos ansiolíticos (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; File, 1993), nos estudos dos mecanismos cerebrais que modulam a ansiedade (Pesold e Treit, 1992, 1994, 1995, 1996), nos estudos sobre aprendizagem e memória (Rodgers et al., 1996; Hlinak e Krejci, 1998).

O LCE é baseado no medo inato que roedores apresentam em espaços abertos (Montgomery, 1955); então, ratos expostos ao LCE tendem a evitar os braços abertos demonstrando preferência pela permanência nos braços fechados. Ainda que os animais sintam-se impelidos a explorar os braços abertos devido à curiosidade pelo novo ambiente, a situação de conflito entre o medo e o intuito de exploração, leva-os a optar pelos braços fechados (Montgomery, 1955), o que caracteriza a ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (Gray, 1982).

A inclusão de uma segunda exposição ao LCE possibilita o estudo de um outro processo, além da ansiedade. Treit et al., (1993) constataram que a esquia dos braços abertos aumenta na segunda exposição e File et al., (1993) propuseram que a experiência nos braços abertos durante a primeira exposição é um fator importante no processo de aquisição da esquia. Bertoglio e Carobrez (2000) apresentaram a idéia de que a existência de dois ambientes, representando diferentes níveis de aversão, ou seja, ambiente aberto e fechado, o qual representa o fator chave no processo de aprendizagem da esquia durante a primeira exposição e sugerem que esta aprendizagem possa envolver a habilidade cognitiva do animal para escolher entre deferentes situações aversivas ou seguras.

Portanto uma característica marcante do LCE seria a capacidade de evocar aversão/medo. Os principais argumentos para esse modelo são:

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

1. Aversão aos braços abertos do labirinto (Pellow et al., 1985);
2. Medo aprendido, sem habituação (Treit et al., 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000);
3. Aumento do corticosterona plasmática (Pellow et al., 1985; Rodgers, et al.,1999);
4. Analgesia bloqueada por ansiolíticos (Lee e Rodgers, 1990).

Nos últimos anos, análise dos índices tradicionais de ansiedade no LCE tem sido um instrumento útil na avaliação dos efeitos ansiogênicos e ansiolíticos de muitas drogas (File, 1992; Russo et al., 1992; Handley e MacBlane, 1993; Treit et al., 1993; Rodgers et al.,1994; De-Souza et al.,1997). A análise do efeito da experiência prévia no LCE é importante. Algumas pesquisas revelam que uma exposição ao LCE é suficiente para afetar as respostas comportamentais e farmacológicas de roedores numa segunda exposição ao mesmo labirinto (Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000), isso porque o medo ou a ansiedade gerado pela exposição inicial ao labirinto parece ser do tipo incondicionado. Enquanto na segunda exposição o medo parece ser condicionado (File e Zangrossi. 1993; File et al.,1996).

No entanto, apesar de extensa revisão bibliográfica, não se observou estudo específico sobre a modulação catecolaminérgica do MR e sua implicação no controle da aprendizagem emocional.

Assim, o estudo do papel modulatório de catecolaminas sobre o MR pode aumentar nosso conhecimento a respeito dos mecanismos fisiológicos da regulação do comportamento de ansiedade e suas implicações clínicas, fornecendo amplo substrato para pesquisa nesta área.

2. OBJETIVO

Pretendemos avaliar o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE após microinjeção com NA e CLO sobre o MR e suas implicações sobre o nível de ansiedade no LCE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 105 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, experimentalmente ingênuos, pesando entre 250 e 270g (aproximadamente três meses de idade) proveniente do biotério Central da UFSC e submetidos a pelo menos sete dias de adaptação ao biotério do Laboratório de Neurobiologia (CFS), em grupos de cinco animais por caixa de polipropileno (49x34x16cm). Todos os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (com a fase clara das 6:00h às 18:00h), com livre acesso à ração (CR-1 Nuvilab) e água. A temperatura foi mantida em torno de 25°C. Os animais foram manipulados apenas para limpeza de caixas (a cada 48 horas). Os experimentos foram realizados entre 13:00h e 16:00h.

3.2. Cânula-guia e Cirurgia Estereotáxica

A fim de possibilitar as microinjeções de drogas no Mediano da Rafe, cânulas-guia (18mm) foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 6 (Injex). Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permitia sua total introdução pelo orifício feito previamente no crânio com a broca odontológica.

Quanto à cirurgia estereotáxica cada animal foi anestesiado com uma solução combinada de xilazina (13mg/kg) e Ketamina (87mg/kg), por via intraperitoneal (I.P.). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, foi feita tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal. Em seguida, o animal foi adaptado ao aparelho estereotáxico, quando então uma assepsia foi realizada na área desejada com álcool iodado e também foi injetada uma

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

pequena quantidade de cloridrato de lidocaína subcutânea, visando a formação de uma pápula, que não só teve efeito anestésico local, bem como orientou na retirada de uma pequena área oval de pele. Em seguida foi feita uma raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Um dos parafusos foi colocado na parte superior do osso parietal esquerdo e o outro no centro do osso parietal direito. Para o implante da cânula-guia no Mediano da Rafe, as coordenadas foram as seguintes: AP: 7,8mm, posterior ao bregma, ML: 2,9mm lateral a linha média e DV: 7,0mm de profundidade a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22°. As coordenadas foram obtidas de acordo com o Atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1998).

Uma vez adaptados, os parafusos e a cânula-guia, novamente o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico autopolimerizável que ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese. Decorridos alguns minutos para secagem total desta foi retirado a caneta a qual segurava a cânula-guia e colocado um mandril introduzido no interior da cânula-guia, com o intuito de prevenir o seu entupimento. Nova camada de acrílico foi acrescentada.

Após a cirurgia cada animal foi colocado em uma caixa de polipropileno (49 X 34 X 16cm) forrada com serragem, na qual constava o número do rato, peso e data da cirurgia, com acesso a água e comida livre, onde permaneceu por uma semana, até o dia do experimento.

3.3. Microinjeção Intracerebral

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado e em seguida foi retirado o mandril. Após a retirada do mandril, uma microagulha (Mizzy-Slide-Park; 0,3mm de diâmetro) foi gentilmente conectada à cânula-guia, ultrapassando em 1,4 mm esta última, de maneira que as drogas e a salina fossem realmente microinjetadas no Mediano da Rafe. A microinjeção foi feita utilizando-se de um sistema composto por uma microseringa (Hamilton de 5ul) e tubo de polietileno transparente, com uma extremidade conectada na microseringa e a outra conectada na microagulha. As microinjeções foram feitas em um volume de 0,2 μ l, observando-se o descolamento de uma bolha que percorria o tubo de polietileno. A fim de evitar refluxo e favorecer a absorção da droga, um período de 1 minuto e meio foi dado antes da agulha ser retirada da cânula-guia. Após a microinjeção o rato foi colocado novamente na caixa a por um período de 10 minutos.

3.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é constituído de duas passarelas de madeira, dispostos perpendicularmente, formando assim uma cruz simétrica (dois braços fechados por paredes de vidro fumê (50x10x40 cm) e dois braços abertos (50x10 cm), opostos entre si, sendo que tais braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1cm de altura) para evitar a queda dos animais. Na junção entre os quatro braços delimita-se uma área central de 10cm². O labirinto como um todo, é elevado a 50cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15w cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100cm acima do labirinto são utilizadas como fonte de iluminação do experimento. O LCE foi limpo com álcool 20% após o teste de cada animal

3.5. Procedimento:

Os animais foram alojados individualmente, por no mínimo sete dias após o implante da cânula-guia. No dia do teste o animal foi transferido para a sala teste, onde foi microinjetado com uma das seguintes soluções:

- 1-salina 0,9%;
- 2-noradrenalina (2, 20 nmol)
- 3-clonidina (20, 40 nmol)

Após a microinjeção, o animal foi recolocado em sua caixa onde permaneceu por cerca de 10 minutos. A seguir, o animal foi colocado no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento registrado com uma câmera de vídeo por um período de 5 minutos. Após 24 horas, os diferentes grupos foram novamente submetidos ao LCE por 5 minutos, sem administração de drogas. Os registros em vídeos foram transcritos, com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

Os parâmetros comportamentais observados foram:

- Freqüência de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do LCE;
- Porcentagem da freqüência de entrada nos braços abertos em relação a freqüência total de entrada em qualquer um dos braços (%EA) ;
- Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação a permanência total nos braços (%TA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.

3.6. Histologia

Após os testes comportamentais, os animais receberam uma microinjeção de solução de Azul de Evans (0,2µl), e foram novamente anestesiados com Tionembutal (50mg/kg), por via intraperitoneal (I. P.) e perfundidos, via intracardíaca, com solução de salina (NaCl, 0,9%), seguida por solução de formaldeído (10%).

Após este procedimento, os ratos foram decapitados e seus cérebros foram removidos e acondicionados em solução de formaldeído (10%), por sete dias. Posteriormente, os cérebros foram fatiados em um vibrátomo em fatias de 100µ m de espessura a fim de serem avaliados os sítios de microinjeção. O sitio da microinjeção foi identificado através da comparação do corte com o diagrama do Atlas do cérebro de ratos. (Paxinos e Watson 1998).

3.7. Análise Estatística

Os dados foram analisados por análise de variância de três vias (Three-way ANOVA) utilizando-se “Droga” como fator1, “Exposição” como fator2 e “Local” como fator3, seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações. Apenas valores de probabilidades menores que 5% foram consideradas significantes.

3. RESULTADOS

3.1. Locais atingidos pelas microinjeções de Noradrenalina (2 e 20nmol) e Clonidina (20 e 40nmol).

A análise histológica mostrou que dos 105 ratos que receberam implantação de cânula-guia apresentaram pontos de microinjeções nas seguintes áreas: Pn, SL e MR.

Distribuição conforme as áreas.

- 33 animais tiveram sua cânula-guia localizada sobre o MR. Deste grupo 5 animais receberam microinjeções de salina, 8 animais receberam microinjeções de NA2, 7 animais receberam microinjeções de NA20, 5 animais receberam microinjeções de CLO20 e 8 animais receberam microinjeções de CLO40 (Anexo3,4,5).
- 36 animais tiveram sua cânula-guia localizada sobre a região Supra-lemniscal (SL). Deste grupo 5 animais receberam microinjeções de salina, 8 animais receberam microinjeções de NA2, 6 animais receberam microinjeções de NA20, 5 animais receberam microinjeções de CLO20 e 10 animais receberam microinjeções de CLO40 (Anexo3,4,5).
- 36 animais tiveram sua cânula-guia localizada sobre Os Núcleos Pontinos (Pn). Deste grupo 10 animais receberam microinjeções de salina, 8 animais receberam microinjeções de NA2, 8 animais receberam microinjeções de NA20, 5 animais receberam microinjeções de CLO20 e 5 animais receberam microinjeções de CLO40 (Anexo3,4).

3.2. O efeito da NA (2 e 20nmol) em animais submetidos por duas vezes ao LCE após administração na primeira exposição nas áreas: Núcleos Pontinos (Pn), Região Supra-Lemniscal (SL) e Núcleo Mediano da Rafe (MR) no total de cinco minutos.

A Figura 2 apresenta a percentagem de entradas nos braços abertos (%A) (Painel A) e de tempo (%T) (Painel B) onde ratos receberam NA (2, 20nmol) e salina (0,9%) na primeira exposição no LCE nas áreas: Núcleos Pontinos (Pn) (controle), Região Supra-Lemniscal (SL) e Núcleo Mediano da Rafe (MR). Os resultados gerais da ANOVA estão descritos na tabela 2 (Anexo 1).

O teste de Duncan indicou que os grupos tratados com salina sejam no Pn, SL e MR apresentam a mesma % A e %T na primeira exposição e segunda exposição (Figura 2A e 2B). Os grupos tratados com NA2 nas áreas citadas exibiram menor %T na segunda exposição quando comparadas a primeira exposição (Figura 2B), porém em relação a %A apresentou menor porcentagem apenas nas áreas SL e MR na segunda exposição quando comparadas a primeira exposição (Figura 2A). Os grupos microinjetados com NA20 no Pn apresentaram diminuição na %A e %T na segunda exposição em relação a primeira exposição (Figura 2A e 2B). Porém os grupos tratados com NA20 nas regiões SL e MR demonstraram o mesmo nível de %A e %T entre a primeira e segunda exposição (Figura 2A e 2B).

Os grupos tratados com NA (2 e 20nmol) na região SL e MR exibiram a mesma %A e % T em relação ao grupo tratado com NA (2 e 20nmol) no Pn, seja na primeira exposição seja na segunda exposição (Figura 2A e 2B).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Não houve diferenças significativas na %A %T entre os grupos tratados com salina e NA (2, 20nmol) na primeira exposição e segunda exposição em nenhuma das áreas (Figura 2A e 2B).

Na Figura 3 apresenta o número de entradas nos braços (Painel A) abertos e fechados (Painel B) onde ratos receberam NA (2, 20nmol) e salina (0.9%) na primeira exposição no LCE nas áreas: Pn, SL e MR. Os resultados da ANOVA estão descritos na tabela 2 (Anexo 1).

O teste de Duncan demonstrou que os grupos tratados com Salina, NA2 e NA20 nas áreas SL e MR apresentaram o mesmo número de entradas nos braços abertos e fechados (Figura 3A e 3B), bem como, para a região Pn no que se refere aos braços fechados (Figura 3B). Porém os grupos tratados com NA (2 e 20nmol) na região Pn apresentam menor número de entradas nos braços abertos na segunda exposição quando comparada com a primeira exposição (Figura 3A).

Os grupos tratados com NA (2 e 20nmol) nas áreas SL e MR apresentam o mesmo número de entradas nos braços abertos e fechados em relação ao grupos tratado com NA (2 e 20nmol) no Pn tanto na primeira como na segunda exposição (Figura 3A e 3B).

Não houve resultados significativos no número de entradas nos braços abertos e fechados entre os grupos tratados com salina e NA (2 e 20nmol) na primeira e segunda exposição em nenhuma das áreas (Figura 3A e 3B).

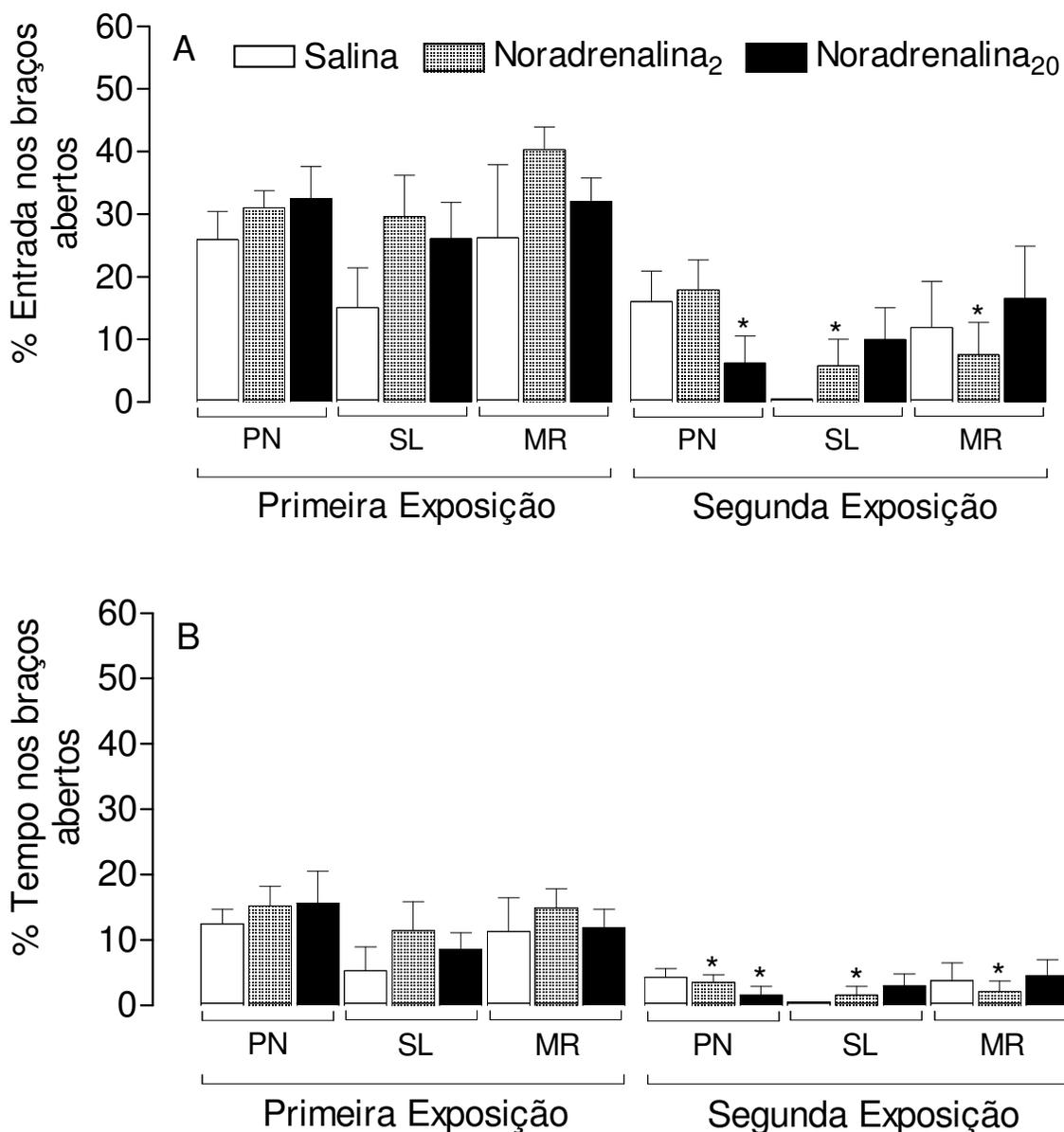


Figura 2- Porcentagem de entrada e tempo nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE – Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.c.) Noradrenalina, nas doses 2, 20, nmol, ou salina 0,9% 10 minutos antes da primeira exposição somente, nas áreas Pn (Sal. N=10, NA2 N=8, NA20, N=8) SL (Sal, N=5, NA2, N=8, NA20, N=6) e MR (Sal, N=5, NA2, N=8, NA20, N=7). *P<0,05 em a primeira exposição; #P< 0,05 em relação a salina; ^uP <0,05 em relação a região Pn. (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

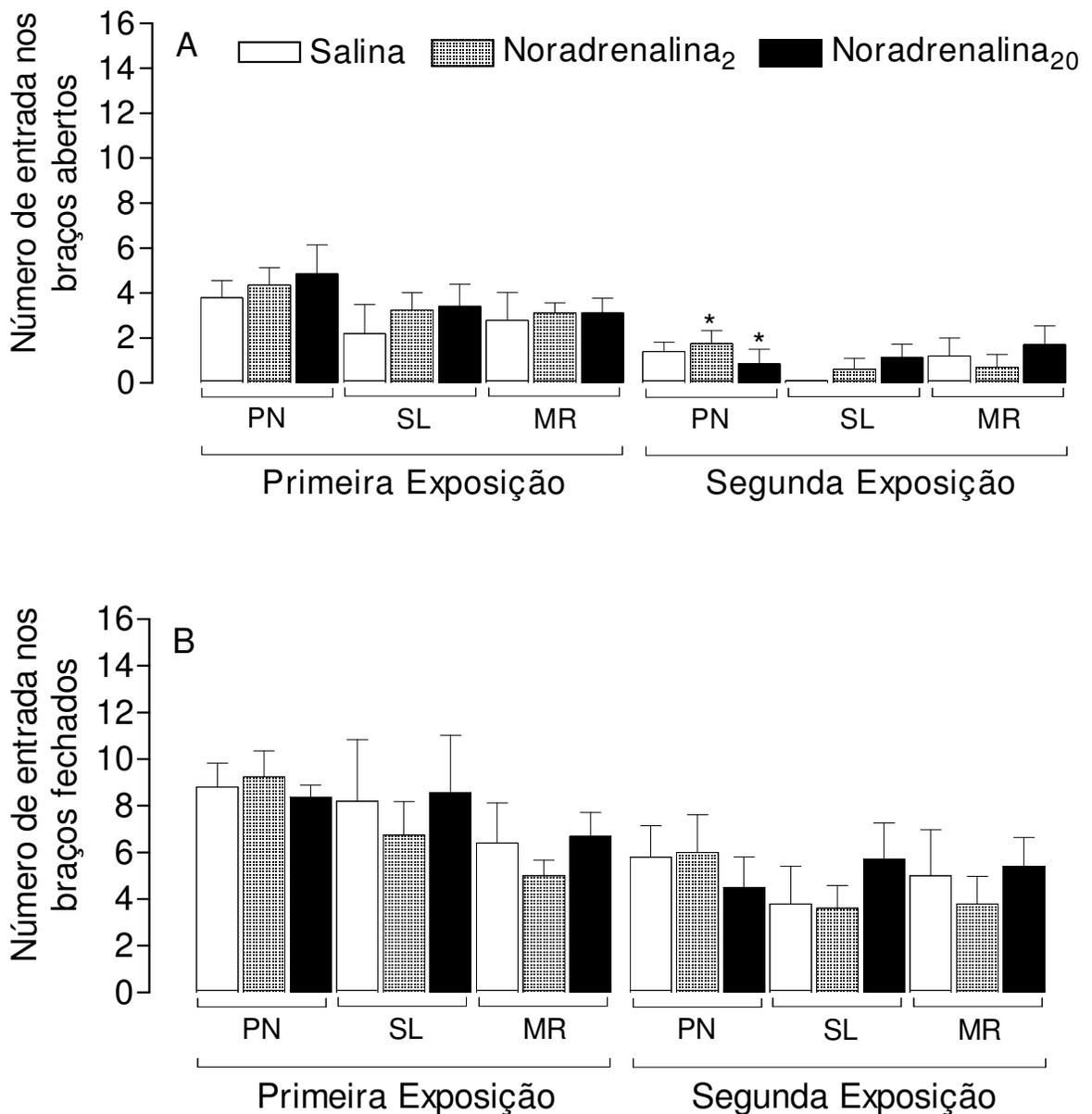


Figura 3- Número de entrada nos braços abertos e fechados de ratos submetidos a duas exposições no LCE – Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.c.) Noradrenalina, nas doses 2, 20, nmol, ou salina 0,9% 10 minutos antes da primeira exposição somente, nas áreas Pn (Sal. N=10, NA2 N=8, NA20, N=8) SL (Sal, N=5, NA2, N=8, NA20, N=6) e MR (Sal, N=5, NA2, N=8, NA20, N=7). *P<0,05 em relação a primeira exposição; #P<0,05 em relação a salina ^ψP<0,05 em relação a região Pn. (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

3.3. O efeito da CLO (20 e 40nmol) em animais submetidos por duas vezes ao LCE após administração na primeira exposição nas áreas: Núcleos Pontinos (Pn), Região Supra-Lemniscal (SL) e Núcleo Mediano da Rafe (MR) no total de cinco minutos.

A Figura 4 apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A) (Painel A) e tempo (%T) (Painel B), onde ratos recebem CLO (20, 40nmol) e salina (0.9%) na primeira exposição no LCE nas áreas: Pn, SL e MR no total de cinco minutos. Os resultados gerais da ANOVA estão descritos na tabela 3 (Anexo 2).

O teste de Duncan indicou que os grupos tratados com salina sejam no Pn, SL e MR apresentam a mesmo %A e %T na primeira e segunda exposição (Figura 4A e 4B). O grupo tratado com CLO 20nmol na região SL apresenta menor %A (Figura 4A) e na região MR menor %T (Figura 4B) na segunda exposição quando comparado com a primeira exposição ($p < 0,05$). Os grupos tratados com CLO 40nmol apresentaram em todas as áreas uma diminuição na %A e %T (Figura 4A e 4B) na segunda exposição quando comparada com primeira exposição ($p < 0,05$).

O grupo tratado com CLO 20nmol no MR houve diferença na %T em relação ao grupo tratado com CLO 20nmol no Pn na primeira exposição (Figura 4B), e nos demais grupos tratados com CLO (20 e 40nmol) apresentaram a mesma %A e %T (Figura 4A e 4B) em relação ao grupo tratado com CLO (20 e 40nmol) no Pn, seja na primeira exposição bem como na segunda exposição.

Em relação a salina houve significância na %T na região Pn nos ratos tratados com CLO 20nM na primeira exposição. Enquanto que a CLO 40nmol na região SL apresentou diferença na %A (Figura 4A) em relação a salina também na primeira exposição.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Na Figura 5 apresenta o número de entradas nos braços (Painel A) abertos e fechados (Painel B) onde ratos receberam CLO (20, 40nmol) e salina (0.9%) na primeira exposição no LCE nas áreas: Pn, SL e MR. Os resultados da ANOVA estão descritos na tabela 3 (Anexo 2).

O teste de Duncan indicou que os grupos tratados com salina sejam no Pn, SL e MR apresentam o mesmo número de entradas nos braços abertos e fechados na primeira e segunda exposição. Os grupos tratados com CLO 20nmol nas regiões SL e MR apresentam menor número de entradas nos braços abertos bem como nos fechados na segunda exposição quando comparado com a primeira ($p < 0,05$).

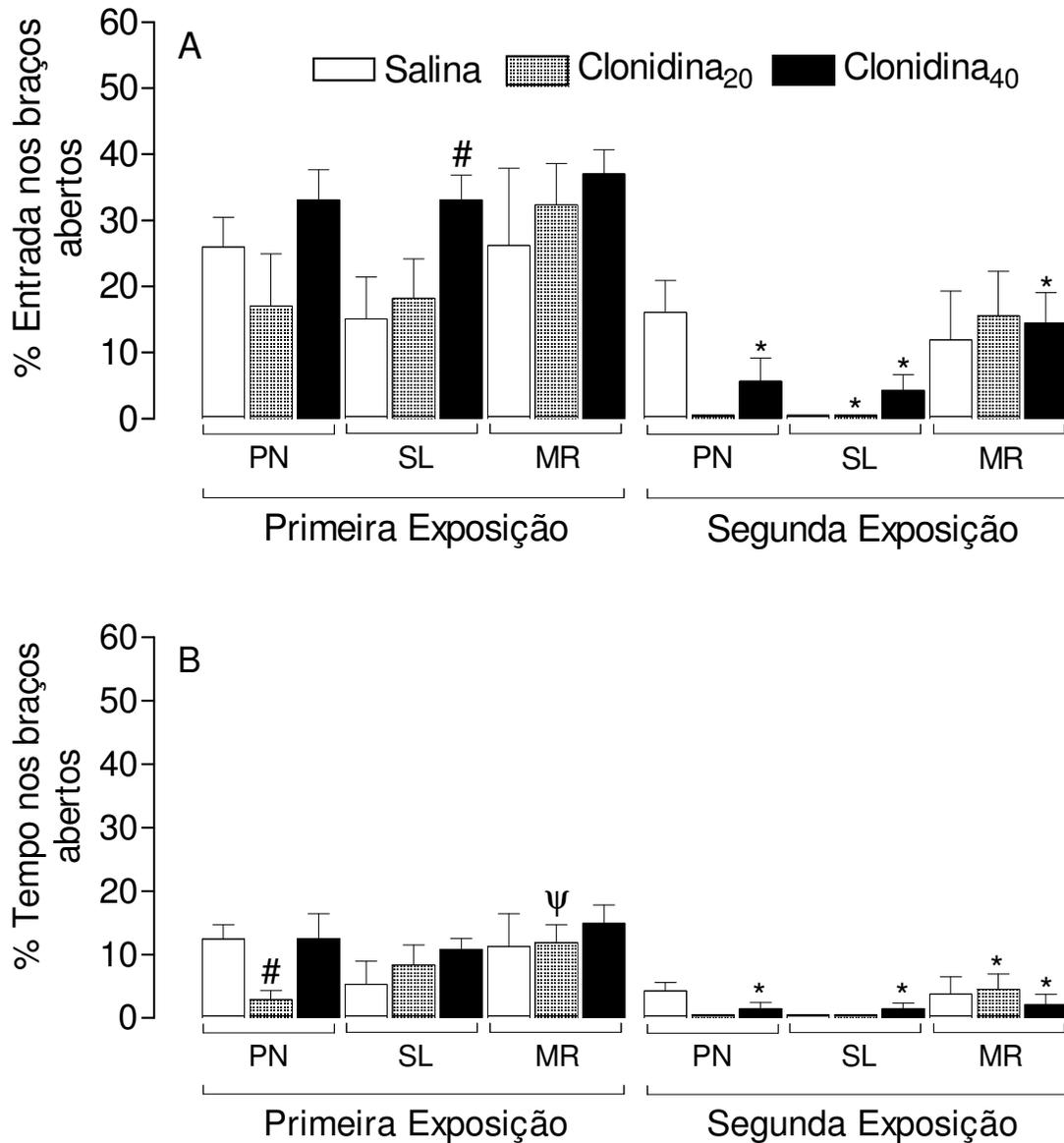


Figura 4- Porcentagem de entrada e tempo nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE – Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.c.) Clonidina, nas doses 20, 40, nmol, ou salina 0,9% 10 minutos antes da primeira exposição somente, nas áreas áreas Pn (Sal. N=10, CLO20 N=5, CLO40, N=5) SL (Sal, N=5, CLO20, N=5, CLO40, N=10) e MR (Sal, N=5, CLO20, N=5, CLO40, N=8). *P<0,05 em relação a primeira exposição; #P<0,05 em relação a salina; ^ΨP<0,05 em relação a região Pn. (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Enquanto para o grupo tratado com CLO 20nmol no Pn não houve resultado significativo. Os grupos tratados com CLO 40nmol demonstraram menor número de entradas nos braços abertos em todas as áreas na segunda exposição em relação a primeira (Figura 5A), enquanto para o número de entradas nos braços fechados não houve significância (Figura 5A).

O grupo tratado com CLO 20nmol no MR exibiu uma diferença no número de entradas nos braços abertos e fechados (Figura 5A e 5B), enquanto que a área SL apresentou esta diferença no número de entradas nos braços fechados (Figura 5A e 5B), estes resultados são em relação ao grupo tratado com CLO 20nmol no Pn, sendo que MR esta relação é exibida na primeira e segunda exposição, enquanto que na área SL apenas na segunda exposição.

Quanto a relação a salina houve resultados significativos no número de entradas nos braços abertos no grupo tratado com CLO 20nmol na primeira exposição no MR (Figura 5A). Nas demais áreas e drogas não apresentaram dados significativos.

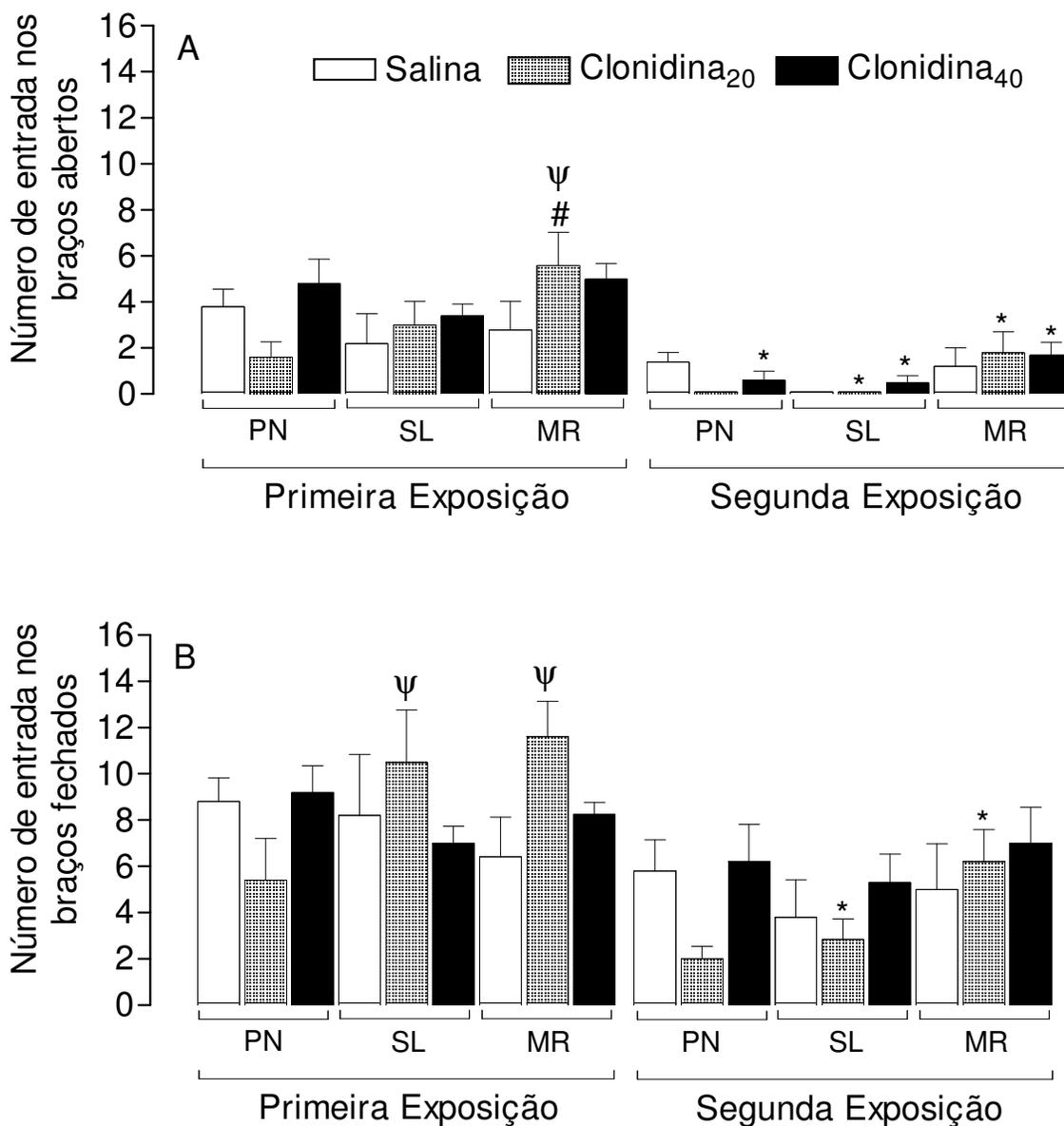


Figura 5- Número de entrada nos braços abertos e fechados de ratos submetidos a duas exposições no LCE – Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.c.) Clonidina, nas doses 20, 40, nmol, ou salina 0,9% 10 minutos antes da primeira exposição somente, nas áreas áreas Pn (Sal. N=10, CLO20 N=5, CLO40, N=5) SL (Sal, N=5, CLO20, N=5, CLO40, N=10) e MR (Sal, N=5, CLO20, N=5, CLO40, N=8). MR. *P<0,05 em relação a primeira exposição; [#]P<0,05 em relação a salina; ^ΨP<0,05 em relação a região Pn. (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

5. DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado o envolvimento do MR na regulação motora, comportamento defensivo e respostas autonômicas associadas com medo (Avanzi V. e Brandão ML, 2001). O MR é uma área do mesencéfalo que fica na união entre os dois hemisférios cerebrais sendo acionado sempre que um indivíduo recebe estímulos ambientais associados a uma situação aversiva (Graeff e Silveira Filho, 1978; Gray, 1987; Avanzi et al.,1998). O MR tem projeções para formação reticular, tálamo e áreas inervadas pelo feixe prosencefálico medial, como por exemplo, o hipocampo (Graeff e Brandão, 1999). Os neurônios serotoninérgicos na rafe mesencefálica recebem uma variedade de aferências que controlam sua frequência de disparo e, conseqüentemente, a liberação de serotonina nas áreas de projeção. Uma das principais aferências para o MR é constituída de neurônios noradrenérgicos que surgem do lócus coeruleus, sugerindo que a liberação de noradrenalina (NA) pode controlar a frequência de disparo do MR mediante a ativação de receptores adrenérgicos.

Neste estudo tivemos como proposta demonstrar o efeito de microinjeções de agonistas adrenérgicos no MR, tais como NA e Clonidina (CLO), sobre a aquisição de memória emocional no LCE. O LCE é um modelo animal largamente utilizado no estudo de ansiedade, que possibilita estudo do comportamento de esquiva motivado por medo (Handley e Mithani, 1984).

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

A aprendizagem no LCE envolve tanto a memória espacial quanto a memória emocional. A memória espacial está relacionada com a identificação dos diferentes ambientes, ou seja, braços abertos e fechados do labirinto, enquanto que a memória emocional está relacionada com a esquiva dos lugares perigosos do labirinto, os braços abertos, os quais são dotados de propriedades aversivas e indutoras de medo (Pellow et al, 1985).

No LCE a memória emocional pode ser avaliada pela re-exposição do animal ao labirinto (paradigma E1/E2), possibilitando, assim, analisar a memória emocional adquirida na primeira e evocada na segunda exposição. Assim, verifica-se na E2 a evocação de um estado emocional caracterizado pelo aumento significativo da esquiva dos braços abertos (diminuição das variáveis %EA, %TA e EA; Treit et al.,1993), decorrente da aquisição prévia da memória emocional durante a E1 (Rodgers et al.,1996; Dal-Col et al.,2003).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os grupos tratados com NA (2 e 20nmol) nos núcleos pontinos (PN) exibiram elevada esquiva dos braços abertos na segunda exposição, ou seja, redução da %A, %T e EA, em relação à primeira exposição. Esse dado indica a ocorrência de aquisição de esquiva dos braços abertos, estando de acordo com a literatura, a qual tem demonstrado que a experiência previa no labirinto altera de forma significativa a exploração subsequente do LCE, com os animais exibindo significativo aumento da esquiva dos braços abertos na segunda exposição (Espejo,1997; Rodgers et al.,1996; Treit et al.,1993; Pellow et al.,1985;

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Bertoglio e Carobrez, 2000; Pereira, O. L. et al., 2005). Portanto, a administração de NA no PN, por si só, não altera o comportamento dos animais no LCE, indicando que a região do PN pode ser utilizada como controle no presente estudo.

Por outro lado, quando a administração de NA foi realizada no MR e na região SL, observou-se aquisição de esquiva apenas no grupo tratado com NA dose de 2nmol. Os grupos tratados com NA (20nmol) no MR e na região SL apresentaram prejuízo da aquisição da esquiva dos braços abertos, visto que do ponto de vista estatístico, o nível de esquiva dos braços abertos na segunda exposição foi igual àquele demonstrado na primeira exposição. Os resultados demonstram ademais que atividade locomotora dos animais, avaliada pelo número de entrada nos braços fechados do LCE, não foi alterada pela microinjeção de NA (20nmol) no MR e na região SL, o que indica que o prejuízo de aquisição de esquiva não se deve a algum efeito inespecífico da droga, tal como sedação. Portanto, o presente estudo indica que a microinjeção de NA no MR e na região SL é ansiolítica em ratos submetidos ao LCE.

Tem sido demonstrado na literatura que os corpos celulares de neurônios serotonérgicos no MR possuem receptores α_1 e receptores α_2 , os quais possibilitam à NA, oriunda de aferências do locus coeruleus, exercer respectivamente, controle excitatório e inibitório sobre a frequência de disparo dos neurônios do MR e, conseqüentemente, da liberação de 5-HT em áreas de

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

projeção (Adell e Artigas, 1999). Acreditamos que a microinjeção de NA na dose de 20nmol possa ter provocado uma rápida dessensibilização do receptor α_1 adrenérgico no MR e na região SL, reduzindo assim o tônus excitatório desses receptores sobre os neurônios serotoninérgicos dessas regiões, e prejudicando a liberação serotoninérgica em áreas de projeção. Essa hipótese é possível, visto que estudos prévios têm proposto que a ativação intensa e simultânea de receptores adrenérgicos excitatórios e inibitórios sobre o mesmo neurônio desencadeiam um efeito inibitório, através de uma dessensibilização dos receptores excitatórios, refletindo, assim, um mecanismo compensatório para contrabalançar a excessiva produção de adenilato ciclase (Rich et al.,1984; Atkinson e Minneman,1992).

Outra hipótese que pode explicar o efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de NA no MR e na região SL é a possibilidade do tratamento com NA, na dose de 20nM, ter ativado os receptores α_1 e levado a uma liberação de 5-HT na fenda sináptica com ativação de autoreceptores inibitórios do tipo 5-HT_{1a}, os quais são abundantes nos neurônios serotoninérgicos do MR (Sotelo et al.,1990, Kia et al.,1996; Adell e Artigas, 1999; Adell et al.,2002). Por sua vez, a ativação dos receptores do tipo 5-HT_{1a} poderia inibir a liberação de 5-HT em seus terminais de projeção. Uma terceira hipótese para explicar o efeito ansiolítico induzido pela microinjeção de NA (20nmol) no MR e na região SL seria a possibilidade dos receptores α_1 serem inibitórios, e não excitatórios, sobre os neurônios serotoninérgicos (Plaznik, A. et al.,1983), de tal forma que a

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

microinjeção de NA no MR e na região SL poderia levar a uma hipofunção dos neurônios serotoninérgicos. De fato, a microinjeção de fenoxibenzamina (antagonista α_1) no MR induziu efeito depressivo sobre o comportamento e um aumento significativo no nível de serotonina no mesencéfalo e diencéfalo (Starke, K. e T. Endo, 1977 apud Plaznik, A et al.,1983).

Uma quarta possibilidade para o efeito ansiolítico da microinjeção de NA no MR e na região SL seria a existência de projeções do MR para a matéria cinzenta periaquedutal (PAG), onde a ativação serotoninérgica produz efeitos antiaversivo (Graeff F. S et al.,1996). A PAG recebe projeções do MR e possui uma população significativa de receptores 5-HT_{1A}. Tem sido demonstrado que a microinjeção de WAY-100635, um antagonista 5-HT_{1A}, no MR reduz a ansiedade em ratos. Esse efeito ansiolítico poderia ser decorrente de um aumento da liberação de 5-HT na PAG, estrutura crucial dentro da circuitaria defensiva, onde a 5-HT tem uma ação antiavversa (Canto S et al.,2002).

Portanto nossos resultados podem refletir diferentes mecanismos de regulação utilizados em condições fisiológicas distintas, bem como a interação entre diferentes subtipos de receptores sobre o mesmo local, que quando ativados simultaneamente, podem desencadear uma resposta diferente daquela freqüentemente evocada quando ativados separadamente.

Os resultados do presente estudo também evidenciaram que durante a E1, dependendo da dose empregada, a microinjeção de CLO nos PN pode

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

ser ansiogênica em ratos submetidos ao LCE. Apesar da microinjeção de CLO (40nmol) não tenha alterado o comportamento dos animais no LCE, todas as variáveis estudadas (%EA, %TA, EA e EF) foram reduzidas pela microinjeção de CLO na dose de 20nmol em relação ao grupo tratado com salina, embora apenas a %TA tenha alcançado significância estatística. Estudos neuroanatômicos em gatos mostram que os PN podem influenciar regiões límbicas, tais como o giro do cíngulo, o hipocampo e os núcleos mamilares, através de estações de retransmissão localizadas no cerebelo e tálamo (Jan-Erik Aas e Per Brodal, 1989). Por outro lado, outros estudos neuroanatômicos em ratos suportam a possibilidade do sistema límbico influenciar a atividade dos PN mediante projeções diretas do giro do cíngulo (Wyss e Sripanidkulchai, 1984). Considerando a hipótese que os receptores do tipo α_2 sejam inibitórios nos PN, semelhantemente ao que acontece na rafe, acreditamos que o efeito ansiogênico induzido pela microinjeção de CLO (20nMol) nos PN possa ser decorrente de uma inibição desses núcleos e, conseqüentemente, menor influência das projeções do mesmo sobre regiões límbicas.

Com relação à região SL e o MR o presente estudo indicou que a microinjeção de CLO na dose de 20nmol, mas não na dose de 40nmol, induz aumento na exploração não só dos braços abertos (no caso do MR), mas também dos braços fechados (tanto no SL quanto no MR) em relação ao grupo microinjetado com CLO (20nmol) nos PN, o que sugere uma ação inespecífica da droga em alterar o comportamento dos animais no LCE. Entretanto, é

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

importante ressaltar que a microinjeção da mesma dose de CLO nos PN reduziu a linha de base comportamental para várias variáveis comportamentais, especialmente a %TA. Portanto, ao contrário do grupo microinjetado com NA, o grupo microinjetado com CLO (20nmol) nos PN não parece ser um controle adequado.

Quando o grupo microinjetado com salina foi utilizado como controle, observamos que a microinjeção de CLO (20nmol) no MR, mas não na região SL, induziu um efeito do tipo ansiolítico, embora tenha havido um aumento do número de EF que não atingiu significância estatística. Efeito ansiolítico semelhante só foi obtido na região SL quando uma dose maior de CLO foi empregada (40nmol). Como discutido anteriormente, os corpos celulares de neurônios serotonérgicos no MR possuem receptores α_1 e receptores α_2 , os quais exercem, respectivamente, controle excitatório e inibitório sobre a frequência de disparo dos neurônios do MR e, conseqüentemente, da liberação de 5-HT em áreas de projeção (Adell e Artigas, 1999). Nesse sentido, o presente estudo sugere que a microinjeção de CLO induz uma inibição do MR mediante a ativação dos receptores α_2 , levando a uma hipofunção do sistema serotonérgico e, conseqüentemente, redução da ansiedade com aumento da exploração dos braços abertos do LCE.

A hipótese que a microinjeção de CLO no MR seja ansiolítica por inibição dos neurônios serotonérgicos é suportada por estudos prévios da literatura, empregando outros testes pré-clínicos de ansiedade, além do LCE.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

Por exemplo, a microinjeção de midazolam (droga que potencializa as ações inibitórias do GABA) no MR induz efeito ansiolítico no teste de interação social em ratos (Gonzalez et al, 1998). De forma similar, a inibição do MR pela microinjeção de agonistas de autoreceptores inibitórios do tipo 5-HT_{1a} para a 5-HT induz efeito ansiolítico nos testes da caixa claro/escuro (Carli et al, 1989), interação social (File et al, 1996; Andrews et al, 1994) e LCE (File et al, 1996) em ratos. Estudos envolvendo lesões também apontam para um papel ansiogênico do MR em testes pré-clínicos de ansiedade, embora os resultados sejam conflitantes. Por exemplo, lesão eletrolítica do MR se mostra ansiogênica (Andrade et al, 1999) ou ansiolítica (Andrade e Graeff, 2001) no LCE, e ansiolítica no teste da caixa claro/escuro (Andrade e Graeff, 2001; Andrade et al, 1999). Já lesões neurotóxicas se mostram, ou sem efeito (Thomas et al, 2000) ou ansiogênicas em ratos cronicamente estressados e submetidos ao no LCE (Netto et al, 2002).

Os resultados do presente estudo também demonstraram que os grupos tratados com CLO (20 e 40nmol) na região SL e no MR exibiram elevada esquiva na segunda exposição, quando comparada com primeira, ou seja, foram capazes de adquirir a memória emocional no LCE. Com relação ao grupo microinjetado com CLO (20nmol), observou-se redução da exploração dos braços abertos na E2 em relação à E1, que não atingiu significância estatística, provavelmente devido à redução da linha de base comportamental durante a E1. Já o grupo tratado com CLO (40nmol) nos PN também adquiriu a

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

esquiva dos braços abertos. A ocorrência de efeito amnésico induzido pela administração sistêmica de CLO já foi previamente descrito na literatura. A administração sistêmica de Clonidina 60 minutos antes da sessão treino induziu amnésia, em camundongos no teste de esquiva passiva, o que não ocorreu quando a clonidina foi administrada 20 minutos antes ou imediatamente após a sessão treino (Galeotti et al., 2004). Embora tanto o paradigma E1/E2 no LCE quanto o teste de esquiva passiva envolvam memória emocional, esses resultados discrepantes podem ser atribuídos a diferentes tipos de medo, com circuitaria distintas, gerados nesses dois testes. Também é possível que uma dose maior de CLO microinjetada no MR possa induzir a um efeito amnésico no paradigma E1/E2 no LCE. Novos experimentos serão realizados para responder essa questão.

6. CONCLUSÕES

- 1.A microinjeção de NA (2 e 20nmol) nos PN, na região SL e no MR não altera o comportamento de ratos, durante a primeira exposição ao LCE.
- 2.A microinjeção de NA (20nmol) na região SL e no MR é ansiolítica em ratos submetidos ao paradigma E1/E2 no LCE, porque impede a aquisição de memória emocional.
- 3.A microinjeção de CLO (20nmol) nos PN é ansiogênica em ratos durante a primeira exposição ao LCE.
- 4.O grupo microinjetado com CLO (20nmol) no MR exibiu menor nível de ansiedade durante a primeira exposição ao LCE, em relação ao grupo microinjetado com salina 0.9%.
- 5.O grupo microinjetado com CLO (40nmol) no SL exibiu menor nível de ansiedade durante a primeira exposição ao LCE, em relação ao grupo microinjetado com salina 0.9%.
- 6.A microinjeção de CLO (20 e 40nmol) na região SL e no MR não altera a aquisição de memória emocional de ratos no paradigma E1/E2 no LCE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, J. -E.; BRODAL, P. Demonstration of a Mamillo-Ponto-Cerebellar Pathway A multi-tracer Study in the cat. *European Journal of Neurosc.* Vol.1, 1989.
- ADELL, A.; ARTIGAS, F. A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 1361-1367 1998.
- ADELL, A.; ARTIGAS, F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *European Journal of Neurosc* 11: 2305-2311 1999.
- ADELL, A.; CELADA, P.; TERESA ABELLAN, M.; ARTIGAS F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res. Rev*, 39: 154-80,2002.
- ADEMEC R. Does term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? – Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. *Behav. Brain Res.*120 (2):111-135 ,2001.
- ANDRADE, T.G.; SILVA, A.M.; 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* 49: 279-89, 1999.
- ANDRADE, T.G.; GRAEFF, F.G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 1-14, 2001.
- ATKINSON, B.N.; MINNEMAN, K. Preferential desensitization of α -versus α 2-adrenergic receptors accelerates loss of response to norepinephrine in primary glial cultures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 41: 688-694, 1992.
- ANDREWS, N.; HOGG, S.; GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and Anxiogenic behaviours respectively. *Eur. J. Pharmacol.* 264: 259-64, 1994.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- AVANZI V. CASTILHO V.M., ANDRADE T.G.C., BRANDÃO M. L. Regulation of contextual conditioning by the median raphe. *Brain Res.* 790,178-184, 1998.
- AVANZI V. BRANDÃO ML. Activation of somatodendritic 5-HT(1A) autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 29;126(1-2):175-84,2001.
- AZMITIA, E.C. & SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe. *J. Comp. Neural.*, 179,641-668,1978.
- BAUMANN, P.A. AND WALDMEIER, P.C. Further evidence for negative feedback control of serotonin release in the central nervous system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 317: 36.43, 1981.
- BERTOGLIO L.J., CAROBREZ A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.*; 108:197-203, 2000.
- BOBILLIER, P., PETIJEAN, F. SALVERT, D., LIGIER, M. & SEGUIN, S. Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res.*, 85, 205-210, 1975.
- BOSKER, F.J.; WINTER, T.Y.C.E.; KLOMPMAKERS, A.A.; WESTENBERG, H.G.M. Flesinoxan dose-dependently reduces extracellular 5-hydroxytryptamine (5-HT) in rat median raphe and dorsal hippocampus through activation of 5-T1A receptors. *J. Neurochem.*, 66: 2546-2555, 1994.
- CANTO DE SOUZA, A.; SOUZA, L.N.RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain res.* 928:50-9, 2002.
- CARLI, M.; PRONTERA, C.; SAMANIN, R. Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurons are involved in the anxiolytic activity of buspirone. *Br. J. Pharmacol.* 96: 829-36, 1989.
- CHEETHAM S.C. Brain 5-HT1A binding sites in depressed suicides *Psychopharmacology* 102,544-548, 1990.
- CLEMENT, H. W., GEMSA, D., WESEMANN, W. The effect of adrenergic drugs on serotonin metabolism in the nucleus raphe dorsalis of the rat, studied by in vivo voltammetry. *Eur. J. Pharmacol.*, 217, 43 -48, 1992.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- DAHLSYRON, A.; FUXE, K.; Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons, *Acta. Physiol Scand., Suppl.232*, 62:1-55,1964.
- DAL- CÓL. M.L.C.; ORLANDI PEREIRA, L; ROSA, V.P.; CALIXTO, A.V.; CARABREZ, A.P.; FARIA, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze: trial 2 is dependent on the length of trial 1. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 74: 395-400, 2003.
- DAY, H.E.; CAMPEAU, S.; WATSON, S.J.Jr.; AKIL, H. Distribution of α_{1A} – α_{1B} and α_{1D} -adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.*, 13: 115-139, 1997.
- DEAKIN, J.W.F. & GRAEFF, F. G. 5-HT mechanisms of defense, *J. Psychopharmacol.*, 5,305-31, 1991).
- DE ALMEIDA, R.M.; GIOVENARDI, M.; CHARCHAT, H.; LUCION, A.B. OH-DPAT in the median raphe nucleus decreases while in the medial septal area it may increase anxiety in female rats. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 259-64, 1998.
- DE-SOUZA MM., SHENBERG LC. , CAROBREZ AP. NNDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxioselective drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain res.* 90:157-165,1997.
- DENNIS S. C., BREMNER,J.D.,REDMOND JR,D.E. Noradrenergic Neural Substrateas for Anxiety and Fear. *Psychopharmacology Chaper 34 New York* ,1995.
- ESPEJO, E.F.Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice.Bebav. *Brain Res.* 87 (2):233-8 1997.
- FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S.; QUENZER, L.F. Principles of neuropsychopharmacology. *Sinauer Associates*, 1997.
- FILE, SE. Behavioural detection of anxiolytic action. Em: Elliot, J.M.,Heal, D.J. &M Marsden, C.A. (orgs) Experimental approaches to anxiety and depression. *John Wiley & Snos LTDA, Shechester*, 25-44, 1992.
- FILE, SE, ZANGROSSI H JR. “One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze or the development of a phobic state? *Psychopharmacol.* 110 (1-2): 240-4, 1993.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- FILE SE, ANDREWS N, HOGG S. New developments in animal tests of anxiety. In: Westenberg HGM, Den Boer JA, Murphy DL, editors. *Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders*. Chichester, UK, Wiley. 61-79, 1996.
- 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* 16:15 4810-5, 1996.
- FRANKHUIJZEN, A.L. AND MULDER, A.H. Noradrenaline inhibits depolarization-induced 3H-5-HT release from slices of rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 63: 179.182,1980.
- FRANKHUIJZEN, A.L.; WARDEH, G.; HOGENBOOM, F.; MULDER, A.H. α_2 -Adrenoceptor mediated inhibition of the release of radiolabelled 5-hydroxytryptamine and noradrenaline from slices of the dorsal region of the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 337: 255.260, 1988.
- GALEOTTI, N.; BARTOLINI A.; GHELARDINI C. Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype. *Behav Brain Res.*, 153 (2) 409-417, 2004.
- GONZALEZ, L.E.; OUAGAZZAL, A.M.; FILE, S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur J Neurosci* 10:3673-80, 1998.
- GOTHERT, M.; HUTH, H. Alpha-Adrenoceptor-mediated modulation of 5-HT release from rat brain cortex slices, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 313: 21.26, 1980.
- GRAEFF, F.G. & SILVEIRA FILHO, G. Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe of the rat. *Physiol. Behav.*, 71, 477-489, 1978.
- GRAEFF, F.G. Serotonergic systems Em: Neuropsychiatry of the basal ganglia. *Brain Research*, 20, 723-739, 1997.
- GRAEFF, F.G.; F.S. GUIMARAES, F.S.; DE ANDRADE, T.G.C.S.; DEAKIN, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 129-141, 1996.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade, Em: GRAEFF, F.G. & BRANDÃO, M.L. Neurobiologia das doenças mentais. *Quinta Edição. São Paulo Lemos Editorial & Gráficos Ltda*, 109-144, 1999.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- GRAY, J.A , The neuropsychology of anxiety. *New York; Oxford University Press*. 1982.
- GRAY, J.A , The psychology of fear and stress. *Cambridge, University Press*, 1987.
- GRAY, J.A , Macnaughton, N. The neuropsychology de anxiety. *Secund Edition, New York, Oxford. University Press*, 2000.
- GRIEBEL G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol. Ther.* 65 (3): 319-395,1995.
- GOTHERT, M.; HUTH, H. α -Adrenoceptor-mediated modulation of 5-HT release from rat brain cortex slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 313: 21.26, 1980. 95,1995.
- HADDJERI, N., BLIER, P., DE MONTIGNY, C. Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277: 861 871, 1996.
- HALL, EL MESTIKAMY, S. ENIRIT, M. B., PICHAT, L, HAMOM,M. & GOZLAN, H. [³H] 8- hidroxy-2- (di-n- propylamno) tetralin biding to pre and pós – synaptic 5- hydroxytryptamine sites in varios regions of the brain. *J. Neurochem*, 44,1685 – 96, 1985.
- HANDLEY SL., McBLANE JW. An assessment of the elevated x-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*29: 129-138,1993.
- HANDLEY SL, MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze- exploration model of “fear”-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327:1-5,1984.
- HARING, J.H. Reorganization of the area dentata serotonergic plexus after lesions of the median raphe nucleus. *J. Comp. Neural.* , 306, 576-584, 1991.
- HENSLER, J.G., ORDWAY, G.A., GAMBARANA, C., ARESO, P. AND FRAZER, A. Serotonergic neurons do not influence the regulation of α -adrenoceptors induced by either desipramine or isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 656.664, 1991.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- HLINAK & KREICI. Concurrent administration de subeffective doses of scopolamine and Mk 801 procuces short term amnésia for the elevated plus mazeen mice. *Behavioral Brain Research* 91: 83-89,1998.
- HENSLER, J.G., ORDWAY, G.A., GAMBARANA, C., ARESO, P. AND FRAZER, A. Serotonergic neurons do not influence the regulation of α -adrenoceptors induced by either desipramine or isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 656.664, 1991.
- HOLMES A, RODGERS RJ. Responses of Swiss-webster mice to repeated plus-me experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60 (2): 473-488,1998.
- HOPWOOD, S.E., STAMFORD J.A noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via α 1 and α 2 adrenoceptors. *Neuropharmacology* 41: 433-442, 2001.
- INVERNIZZI, R.; CARLI, M., DI CLEMENTE, A.; SAMANINI, R. Administration of 8- hydroxy-2- (di-n-propylamino) tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and potency and regional sensitivity. *J. Neurochem.*, 56:243-47,1991.
- KHAN, R.S., VAN PRAAG, H.M., WETZLER, S. ASNIS, G.M. e BARR, G. Serotonin and Anxiety Revisited. *Biol. Psychiatry. Vol. 23, pp. 189-208. 1988.*
- KIA, H.K.; MIQUEL , M. C.; BRISORGUEIL, M. J.; DAVAL, G.; RIAD, M.; EL MESTIKAWY, S.; HAMON, M.; VERGE, D. Immunocytochemical localization of serotonin 1A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 365: 289-305, 1996.
- KOSOFSKY, B.E. & MOLLIVER, M.E. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*, 1, 153-168,1987.
- JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 72: 165-229, 1992.
- LEE C., RODGERS RJ. Antinociceotive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology*, 102 (4): 507-513,1990.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de Neurociências. *São Paulo: Editora Atheneu, 2001.*

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- McKENNA, J.T. & VERTES R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum on hippocampus. *Brain Res.,Bull.*,54 : 619-630, 2001.
- MAMOUNAS, L.A. & MOLLIVER, M. E. Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). *Exp. Neural.* , 102, 23-36,1988.
- MENARD J, TREIT D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23 (4): 591-623,1999.
- MENDELSON, S.D. AND MCEWEN, B.S. Autoradiographic analyses of the effects of adrenalectomy and corticosterone on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the dorsal hippocampus and cortex of the rat. *Neuroendocrinology*, 55: 444-450, 1992
- MOLLIVER, M.E. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J. Clinical Pharmacol.* , 7,3-23, 1987.
- MONGEAU, R.; BLIER, P.; MONTIGNY, C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res. Rev.*, 23 (3): 145-195, 1997.
- MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Neural.*48: 254-260,1955.
- NETTO, S.M.; SILVEIRA, R.; COIMBRA, N.C.; JOCA, S.R.; GUIMARAES, F.S. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 1135-41, 2002.
- ODEH, F.; ACKERLY, R. BJAALIE, J.; APPS, R. Pontine Maps Linking Somatosensory and Cerebellar Cortices Are in Register with Climbing Fiber Somatotopy. *J. of Neurosc.* 25(24) 5680-5690, 2005.
- OTTONI EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 2000; 32: 446-449.
- PALACIOS J.M. Distribution of serotonin receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 600:36-52, 1990.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- PLAZNIK, A.; WOJCIECH, D.; WOJCIECH, K.; BIDZIŃSKI, A.; HAUPTMANN, M. Interaction Between Noradrenergic and Serotonergic Brain Systems as Evidenced by Behavioral and Biochemical Effects of Microinjections of Adrenergic Agonists and Antagonists into the Median Raphe Nucleus. *Pharmacol. Biochem. & Behav.* Vol. 19, pp27-32, 1983.
- PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, fourth edition. *San Diego: Academic Press*, 1998.
- PAZOS, A.; PALACIOS, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. *Brain Res.*, 346: 205-230, 1985.
- PAZOS, A.; PROBST A., PALACIOS J. A. Serotonin receptors in the human brain- III Autoradiographic mapping de serotonin -1 receptors. *Neurosciência* 21,97-122, 1987.
- PELOW S, CHOPIN P., FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 149-167, 1985.
- PEREIRA, L.O.; DA CUNHA IC, NETO M.; PASCHOALINI MA, FARIA MS. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res.* 159 (1):55-61, 2005.
- PESOLD C, TREIT D. Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus maze and the shock-probe burying tests. *Physiology and Behavior* 52: 37-47, 1992.
- PESOLD C, TREIT D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research* 638:295-301, 1994.
- PESOLD C, TREIT D. The central and basolateral aygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research* 671: 213-221, 1995.
- PESOLD C, TREIT D. The neuroanatomical specificity of the anxiolytic effects of intraseptal infusions of midazolam. *Brain Research* 710: 161-168, 1996.
- PIÑEYRO, G.; BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressants drug action. *Pharmacol. Rev.*, 51(3): 533-591, 1999.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- PIRES, J.G., SILVA S. R., RAMAGE, A . G. & FUTURO-NETO, H. A . Influence of median raphe nucleus lesions on neuroleptic-induced catalepsy and on the anticataleptic effect of buspirone. *Braz. F. med. Biol.Res.* 26,323-326, 1993.
- RICH, K.; CODINA, J.; FLOYD, G.; SEKURA, R.; HILDEBRANDT, J.D.; IYENGAR, R. Glucagon-induced heterologous desensitization of the MDCK cell adenylyl cyclase. Increases in the apparent levels of the inhibitory regulator (Ni). *J Biol Chem* 259: 7893-7901,1984.
- RODGERS RJ. COLE JC. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ. *Hendrie CA. editors. Ethology and Psychopharmacology. New York: Wiley, p.9-44, 1994.*
- RODGERS, RJ. JOHNSON, NTJ, COLE, JC, DEWAR, CV, KIDD, GR, KIMPSON, PH. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* , 54; 41-50,1996.
- RODGERS, RJ HALLER J., HOLMES A., HALASZ J., WALTON TJ, BRAIN PE. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol. Behav.* 68 (1-2): 47-53,1999.
- RUSSO AS, GUIMARÕES FS, DE- AGUIAR JC, GRAEFF FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. *Psychopharmacology* 110: 198-202; 1992.
- RUSSO, AS, GUIMARÕES FS, De-AGUIAR JC, DEWAR, CV KIDD, KIMPSON, PH. Plus-maze retest profile: important of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:41-50, 1996.
- SCHREIBER, R. & DE VRY, J.D. Studies on the neural circuits involved in the discriminative stimulus effects of 5-HT_{1A} receptor agonist in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 572-579, 1993.
- SINTON, C.M.; FALLON, S.L. Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT₁ receptor. *Eur.J. Pharmacol.*, 157: 173-181, 1988.
- SPROUSE, J.S.; AGHAJANIAN, G.K. Electrical responses of serotonergic raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Sinapse*, 1: 3-9, 1987.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur. J. Neurosci.*, 2: 1144-1154 1990.
- SULSER, F. AND SANDERS BUSH, E. The serotonin-norepinephrine link hypothesis of affective disorders: receptors interactions in brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 221: 489-502, 1987.
- TEIXEIRA KV, CAROBREZ AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav. Neurosci.* 113 (1): 196-203,1999.
- TREIT D., MENARD J., ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44 (2): 463-469,1993.
- TREIT D., Animal models for the study anti-anxiolytic drug action. Em Denbeer J.A. e Ad. Sitzen J.M. (editores) Handbook of Deoresson and anxiety: A *Biológica approach. Maesel Decker New York* p.201-24, 1994.
- TÖRK, J. Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 600, 53-67,1990.
- THOMAS, H.; FINK, H.; SOHR, T.R.; VOITS, M. Lesion of the median raphe nucleus: a combined behavioral and microdialysis study in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 15-21, 2000.
- TÖRK, J. & HORNUNG, J.P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. Em: Paxinos, G. (ed). *The Human Nervous System. San Diego. C.A.Academic Press. pp 1001-1022,1990.*
- UHDE, T.W., BOULENGER, J-P. , POST, R.M., SIEVER, L.J., VITTONI, B.J., JIMERSON, D.C. e RIY-BYRNE, P.P. Fear and Anxiety: Relationship to Noradrenergic Function. *Psychopathology. Vol. 17 (suplemento 3), pp. 8-23. 1984.*
- VAN DEN HOOFF, P.; GALVAN, M. Actions of 5- hydroxytryptamine and 5HT_{1A} receptor ligands on rat dorso-lateral septal neurons in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 106: 893-99, 1992.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.

- VERGÉ D. DAVAL, G. PATEY, A ., GAZLAN. H., EL MESTIKAWY, S. & HAMOW, M. Presynaptic. 5-HT autoreceptores on seronergic cell bodies and/or dendrites but not terminal are of the 5-HT1A subtyp. *Eu. J. Pharmacol.*, 113, 463-464, 1985.
- VERGÉ D. DAVAL, G., MARCINKIEMICZ, M., PATEY A.,EL MESTIKAWY,S. GOZLAN, H. & HOMON,M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptors suptypos in the brain of control ou 5,7- dihidroxitrytomine- triated rats. *J. Neuroscience* 6, 3474 –3482, 1986.
- VERTES, R.P.; CRANE, A.M. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 378: 411-424, 1997.
- YOSHIOKA, M., MATSUMOTO, M., TOGASHI, H., SMITH, C .B., SAITO, H. alpha 2-adrenoceptor modulation of 5-HT biosynthesis in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 139: 53 56, 1992.
- WALKER DL, DAVIS M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behav. Neurosci.* 111: 692-702, 1997.
- WYSS, JM, SRIPANIDKULCHAI K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* Feb13; 293(1):1-15,1984.

ANEXOS

Anexo 1

ANOVA de três vias

Tabela 2

Resultados da ANOVA de três vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações

Fatores/interação	%entradas nos braços abertos	%tempo nos braços abertos	Entradas nos braços abertos	Entradas nos braços fechados
Local	$F_{2,113} = 3,64; p < 0,05$	$F_{2,113} = 3,01; p < 0,05$	$F_{2,113} = 63,15; p < 0,05$	$F_{2,113} = 2,29; NS$
Droga	$F_{2,113} = 1,91; NS$	$F_{2,113} = 0,70; NS$	$F_{2,113} = 0,92; NS$	$F_{2,113} = 0,53; NS$
Exposição	$F_{1,113} = 50,49; p < 0,0001$	$F_{1,113} = 46,27; p < 0,0001$	$F_{1,113} = 59,95; p < 0,0001$	$F_{1,113} = 15,76; p < 0,01$
Local x Droga	$F_{4,113} = 0,66; NS$	$F_{4,113} = 0,18; NS$	$F_{4,113} = 0,28; NS$	$F_{4,113} = 0,82; NS$
Local x Exposição	$F_{2,113} = 0,24; NS$	$F_{2,113} = 0,93; NS$	$F_{2,113} = 0,91; NS$	$F_{2,113} = 1,04; NS$
Droga x Exposição	$F_{2,113} = 1,23; NS$	$F_{2,113} = 0,90; NS$	$F_{2,113} = 0,18; NS$	$F_{2,113} = 0,32; NS$
Local x Droga x Exposição	$F_{4,113} = 1,12; NS$	$F_{4,113} = 0,33; NS$	$F_{4,113} = 0,36; NS$	$F_{4,113} = 0,90; NS$

Os ratos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (primeira exposição/segunda exposição) após administração de noradrenalina em diferentes doses nos Núcleos Potinos, Região Supra-Lemniscal e Núcleo Mediano da Rafe; NS indica não significativo.

Anexo 2

ANOVA de três vias

Tabela 3
Resultados da ANOVA de três vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações

Fatores/interação	%entradas nos braços abertos	%tempo nos braços abertos	Entradas nos braços abertos	Entradas nos braços fechados
Local	$F_{2,100} = 6,69; p < 0,01$	$F_{2,100} = 7,01; p < 0,01$	$F_{2,100} = 6,06; P < 0,01$	$F_{2,100} = 1,16; NS$
Droga	$F_{2,100} = 3,32; p < 0,05$	$F_{2,100} = 2,12; NS$	$F_{2,100} = 2,00; NS$	$F_{2,100} = 0,59; NS$
Exposição	$F_{1,100} = 57,46; P < 0,0001$	$F_{1,100} = 42,05; p < 0,0001$	$F_{11,100} = 59,95; p < 0,0001$	$F_{1,100} = 24,25; p < 0,0001$
Local x Droga	$F_{4,100} = 1,93; NS$	$F_{4,100} = 2,02; NS$	$F_{4,100} = 2,65; p < 0,05$	$F_{4,100} = 2,86; P < 0,05$
Local x Exposição	$F_{2,100} = 0,13; NS$	$F_{2,100} = 0,22; NS$	$F_{2,100} = 0,02; NS$	$F_{2,100} = 0,68; NS$
Droga x Exposição	$F_{2,100} = 2,65; NS$	$F_{2,100} = 0,51; NS$	$F_{2,100} = 1,33; NS$	$F_{2,100} = 2,13; NS$
Local x Droga x Exposição	$F_{4,100} = 0,11; NS$	$F_{4,100} = 0,60; NS$	$F_{4,100} = 0,70; NS$	$F_{4,100} = 0,50; NS$

Os ratos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (primeira exposição/ segunda exposição) após administração de clonidina em diferentes doses nos Núcleos Potinos, Região Supra-Lemniscal e Núcleo Mediano da Rafe; NS indica não significativo.

Anexo 4

Diagrama dos locais atingidos pela microinjeção de Salina (0,9%), NA (2,20nmol), CLO (20,40nmol) em ratos submetidos ao LCE.

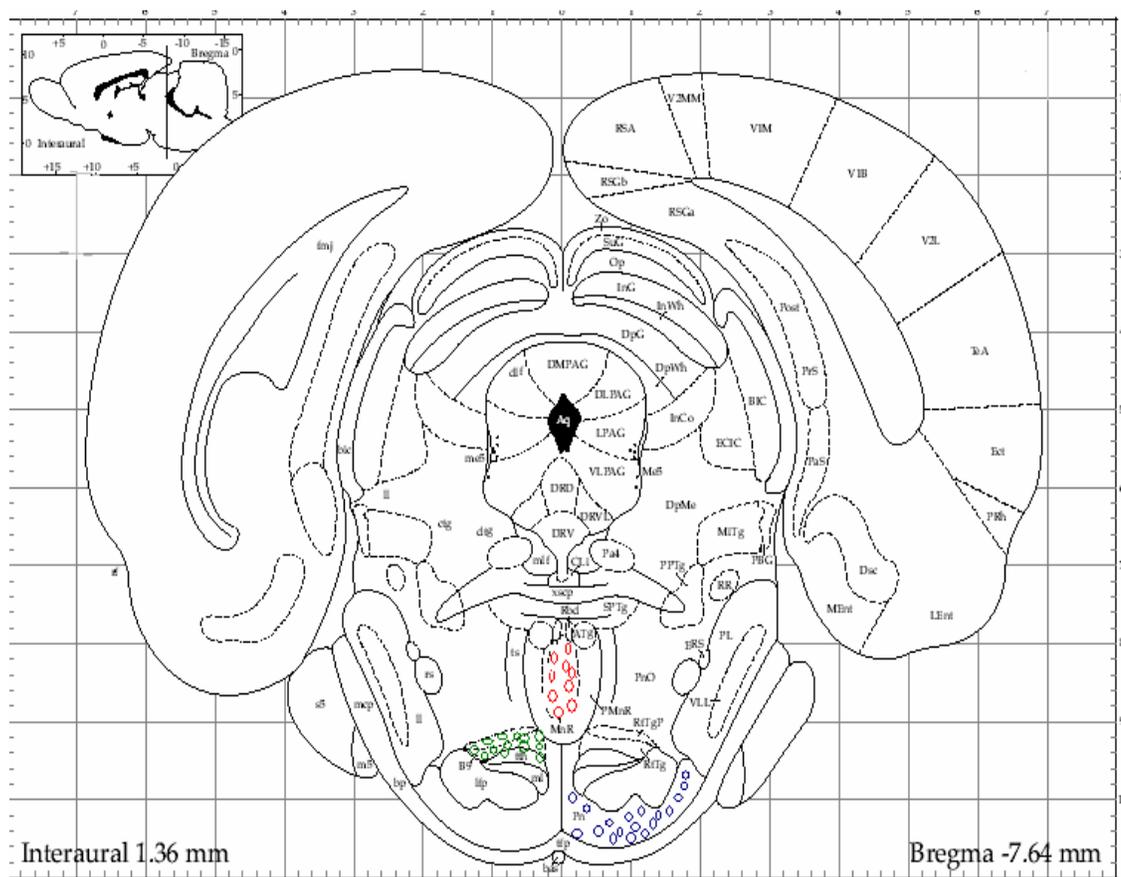


Diagrama dos locais atingidos pela microinjeção de Salina (0,9%), NA (2,20nmol), CLO (20,40nmol) em ratos submetidos ao LCE. O diagrama mostra a localização aproximada dos locais de microinjeção no MR (vermelho, N=10), SL (verde, N=13) e PN (azul, N= 18). Seções coronais do cérebro de rato obtidas do Atlas de Paxinos e Watson, 1998.

Modulação noradrenérgica do MR e da ansiedade no LCE Lucinda, A. M.