

**JOÃO VICTOR DOS SANTOS SILVA**

**INTERAÇÃO ENTRE ESTRADIOL E RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO NÚCLEO  
MEDIANO DA RAFE EM RATAS OVARIECTOMIZADAS, NA AQUISIÇÃO DA  
INFORMAÇÃO AVERSIVA E ASSOCIAÇÃO AO CONTEXTO**

**ASSIS  
2014**

**JOÃO VICTOR DOS SANTOS SILVA**

**INTERAÇÃO ENTRE ESTRADIOL E RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO NÚCLEO  
MEDIANO DA RAFE EM RATAS OVARIETOMIZADAS, NA AQUISIÇÃO DA  
INFORMAÇÃO AVERSIVA E ASSOCIAÇÃO AO CONTEXTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador(a): Prof. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Letícia Ferreira da Silva Donato CRB 8/9503

S586i Silva, João Victor dos Santos  
Interação entre estradiol e receptores 5-HT<sub>1A</sub> no Núcleo Mediano da Rafe em ratas ovariectomizadas, na aquisição da informação aversiva e associação ao contexto / João Victor dos Santos Silva. Assis, 2014  
67 f.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista.

Orientadora: Prof. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade

1. Ansiedade. 2. Condicionamento Contextual. 3. Núcleo Mediano da Rafe. 4. Estradiol. 5. WAY 100.635. I. Título.

**CDD 573.21**

## DEDICATÓRIA

*Dedico*

*Aos meus pais, Geraldo Aparecido da Silva e Maria Inês dos Santos Silva, por todo amor, apoio, força e fé em todos os momentos.*

*Amo muito vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho e mais uma etapa da minha vida*

*Agradecimentos especiais...*

*À Prof. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade minha “mãorientadora” pela confiança, orientação, alegrias, fé e por todos os ensinamentos que me foram passados, essenciais na minha vida profissional e pessoal.*

*A todos os docentes e funcionários que desde a graduação até a aqui na pós-graduação sempre e prontamente me atenderam quando precisei de qualquer tipo de ajuda ou de uma simples conversa.*

*Aos meus amigos e parceiros de laboratório, especialmente: Amarilys, Ana Beatriz (Bia), Flaviane, Lucas, Luiz (Afeto), Matheus (Bats), Rafael (Rafut), Sérgio, Vinícius e Yara.*

*A todos os amigos da pós-graduação que tive muito prazer em trocar experiências, conhecimentos, convívio, risadas.*

*Aos meus queridos amigos: Ana Flávia (Banana), Camila, João Guilherme, Myrcea, Iatan, Rafael (Bozo), William, Léo, Michele, Renato, Jéssica, Ricardo, Gabriel, Mauro, Fernando, Bruno, João Marcelo, Luiz Fernando, Alan (Nico), Bruna, Daniel, Aline, Felício, Cristina, Giovani.*

*Agradeço aos membros da banca pela contribuição no meu exame de qualificação e defesa.*

*Agradeço a toda minha família, sem exceções, por tudo o que representam em minha vida.*

*Ao meu grande amigo, companheiro fiel que nunca me deixou na mão, sempre está do meu lado nas horas boas e nas ruins e me faz ter confiança nas minhas lutas e não guardar mágoas daqueles que nos ofendem... DEUS!*

SILVA, João Victor dos Santos. **Interação entre estradiol e receptores 5-HT<sub>1A</sub> no Núcleo Mediano da Rafe em ratas ovariectomizadas, na aquisição da informação aversiva e associação ao contexto.** 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista —“Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

## RESUMO

Foram identificados receptores de estrógeno em neurônios localizados no Núcleo Mediano da Rafe (NMR). Tem sido apresentado que este esteróide no NMR é hábil para potencializar a ação da serotonina sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub>, inibindo a atividade de neurônios serotoninérgicos e causando ansiólise. Com o objetivo de avaliar a interação entre a ação estrogênica e a via serotoninérgica que se origina no NMR sobre a aquisição da informação aversiva, ratas *Wistar* foram ovariectomizadas e posteriormente receberam microinjeção direta de Benzoato de Estradiol (BE) (1200ng) diretamente no NMR, precedida pela microinjeção de salina ou de WAY 100.635 (100ng), um antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Imediatamente após as duas microinjeções, as ratas ovariectomizadas foram submetidas a sessões de choques elétricos nas patas, na caixa de Skinner. Vinte e Quatro horas depois, foram expostas ao mesmo contexto por 5 minutos para avaliação comportamental: congelamentos, levantamentos, deslocamentos, auto-limpeza e respostas autonômicas (bolos fecais e eliminação urinária). A microinjeção de BE previamente à exposição aos estímulos aversivos, (choques elétricos nas patas) não alterou o comportamento na sessão de condicionamento, mas neutralizou a associação entre a experiência aversiva ao contexto: houve um decréscimo na expressão do congelamento e aumento da atividade motora na sessão teste. Este efeito foi revertido pela microinjeção prévia de WAY 100.635. Em conclusão, o BE agiu sobre neurônios serotoninérgicos em ratas ovariectomizadas, prejudicando a associação da experiência aversiva ao contexto, por co-modular a funcionalidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Palavras-chave: Ansiedade. Condicionamento Contextual. Núcleo Mediano da Rafe. Estradiol. WAY 100.635.

SILVA, João Victor dos Santos. **Interaction between estradiol and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the Median Raphe Nucleus in acquisition of aversive information and association to context in ovariectomized rats**. 2014. 67 f. Dissertation (Master's degree in Biosciences). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista —"Júlio de Mesquita Filho", Assis, 2014.

#### ABSTRACT

Estrogen receptors were identified in neurons originated in the Median Raphe Nucleus (MRN). It is presented that estrogen, in this structure, is able to potentiate the action of serotonin on somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, inhibiting the function of serotonergic neurons and causing anxiolysis. This study was performed to evaluate interaction between estrogen action and the serotonergic pathway that originates in the MRN on the acquisition of aversive information. Female *Wistar* rats were ovariectomized and received direct microinjection of Estradiol Benzoate (EB) (1200ng) into the MRN, preceded by microinjection of saline or WAY 100.635 (100ng), a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. Immediately after the two microinjections, the ovariectomized rats were submitted to a foot shock session in the Skinner box. Twenty four hours later, they were exposed to the same context for 5 minutes for behavioural assessment: freezing, rearing, displacement, grooming and autonomic responses (faecal boluses and micturition). The EB microinjection in the MRN prior to the exposure of animals to the aversive event (foot shock) did not alter their behaviour in the aversive conditioning session, but neutralized the association of the aversive experience with the context: there was a decrease in the expression of freezing and increased motor activity in the test session. This effect was reversed by previous microinjection of WAY 100.635. In conclusion, the EB acted on serotonergic neurons in the MRN of ovariectomized rats, impairing the association of the aversive experience to the context, by co-modulating the functionality of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors.

**Keywords** – Anxiety. Contextual Conditioning. Median Raphe Nucleus. Estradiol. WAY 100.635.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>9</b>
1.1. <b>Ansiedade</b> .....	<b>10</b>
1.1.1. <b>Conceitos e epidemiologia</b> .....	<b>10</b>
1.1.2. <b>Teorias relevantes na compreensão da neurobiologia da ansiedade</b> .....	<b>12</b>
1.1.3. <b>Caracterização dos subtipos de ansiedade</b> .....	<b>17</b>
1.2. <b>Condicionamento Contextual: um teste para avaliação da ansiedade</b> .....	<b>18</b>
1.3. <b>Interações entre Ansiedade, Estrogênio e Núcleo Mediano da Rafe</b> ....	<b>19</b>
<b>2. REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>3. ARTIGO:</b> Interaction between estradiol and 5-HT <sub>1A</sub> receptors in the Median Raphe Nucleus in acquisition of aversive information and association to context in ovariectomized rats”.....	<b>35</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>62</b>
<b>5. ANEXO: Normas da revista Hormones and Behavior</b> .....	<b>64</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Nesta breve introdução serão contemplados aspectos relacionados à saúde mental da mulher, especialmente no período conhecido como climatério, ou também chamado de peri/pós - menopausa, à luz de uma abordagem neurobiológica. Todas as descrições foram direcionadas na tentativa de tecer algumas considerações sobre a forma com que as fêmeas respondem aos estímulos aversivos em períodos de baixa concentração estrogênica. O modelo utilizado foi o teste do condicionamento contextual que avalia o comportamento dos animais no ambiente em que receberam choques elétricos nas patas. Esse modelo tem sido utilizado para estudar a ansiedade em decorrência da associação entre um estímulo aversivo agudo e o contexto em que o mesmo ocorreu.

Assim, foram descritos aspectos teóricos subjacentes a essa abordagem e sua relação com o estresse. Além disso, considerando que o Núcleo Mediano da Rafe (NMR) tem sido apontado como uma das principais fontes de projeções neuronais serotoninérgica ascendente, funcionalmente atrelado aos mecanismos centrais de inibição comportamental, e, portanto, relacionado com a ansiedade e, tendo em vista que já se identificou atividade do estradiol nessa estrutura sobre a manifestação da ansiedade e sua interação com a funcionalidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos, foi realizado o estudo *“Interaction between estradiol and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in Median Raphe Nucleus in the acquisition of the aversive information and association to context in ovariectomized females”*, apresentado sequencialmente à introdução.

## **1.1. ANSIEDADE**

### **1.1.1. Conceitos e epidemiologia**

A ansiedade é um estado emocional direcionado ao futuro e faz parte do sistema de defesa presente na maioria dos vertebrados. Por possibilitar estratégias e ser útil dentro dos mecanismos de enfrentamento contra as ameaças à sobrevivência, ao bem-estar ou à integridade física, foi e continua a ser importante na história adaptativa e evolutiva dos animais (GRAEFF e HETEM, 2012). Nessa ótica, a ansiedade é considerada normal e inerente à manutenção do equilíbrio interno e externo do organismo, diante de perigos que podem ser representados por diferentes estímulos diretos ou associados, tais como, predadores, situações ambientais como altura e iluminação, alterações inesperadas do meio, por estímulos dolorosos, ou até mesmo por situações conflitivas intra-espécie (GRAEFF e HETEM, 2012). Para que ocorra a ansiedade, é fundamental, através de uma necessidade do organismo, um impulso para se aproximar ou se esquivar do estímulo que denota perigo. Muitas vezes esse estímulo perigoso vem acompanhado ou está relacionado a uma recompensa, gerando um conflito de aproximação e evitação (GRAY e MCNAUGHTON, 2000). Desse modo, de acordo com a influência de interações entre estímulos ambientais, como também dependendo das características individuais relacionadas às experiências pregressas e herança, pode ocorrer a manifestação da ansiedade patológica. Nesse caso, a resposta à ameaça é desproporcional ao estímulo desencadeador, em intensidade ou duração, interferindo no funcionamento normal do indivíduo. Além disso, pode não existir um objeto específico ao qual a resposta se direcione, ou ainda ocorrer uma inabilidade no confronto de situações específicas (CASTILLO *et al.*, 2000; BLANCHARD e BLANCHARD, 2008; GRAEFF e HETEM, 2012)

Ainda assim, a ansiedade é uma emoção que se assemelha ao medo. Enquanto este provém da ameaça real, a ansiedade deriva-se da ameaça potencial. Para Robert e Caroline Blanchard (1988), a ansiedade está intimamente ligada à capacidade de avaliação dos riscos diante de situações em que o perigo é incerto (ameaça potencial), seja por trazer à tona estímulos do perigo vivenciados alguma vez no passado, seja por um contexto novo.

Mais especificamente na espécie humana, já por algum tempo a ansiedade está no topo das principais doenças no mundo, superando doenças cardíacas e o câncer (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2006). Além do problema de saúde existe o problema econômico das desordens de ansiedade. Dados dos Estados Unidos mostraram um comprometimento de 42 a 47 bilhões de dólares na década de 90, destinados ao tratamento da ansiedade. Do custo total, cerca de 54% foi destinado a tratamentos médicos não-psiquiátricos, 31% a tratamentos psiquiátricos e 10% em custos de trabalhos indiretos. Pouco mais de 2% foi utilizado nos gastos com medicamentos (GREENBERG *et al.*, 1999).

Tem sido relatado que as mulheres apresentam uma elevada prevalência desses distúrbios, resultando também em predisposição aumentada para apresentação de quadros depressivos (BRESLAU *et al.*, 1997; HETTEMA *et al.*, 2006; PARKER e HADZI-PAVLOVIC, 2004; CIMPEAN e DRAKE, 2011). As mulheres tendem a sofrer duas vezes mais com distúrbios de ansiedade do que homens (Altemus, 2006). Além disso, estudos mostram a relação entre os níveis hormonais com a gênese desses distúrbios, principalmente em momentos na vida da mulher onde os níveis hormonais (Progesterona e Estrógenos) se encontram diminuídos: período pré-menstrual do ciclo-hormonal, pós-parto, peri-menopausa e menopausa (SEEMAN, 1997; BEKKER, 2007; SOLOMON e HERMAN, 2009).

### 1.1.2. Teorias relevantes na compreensão da neurobiologia da ansiedade

Numa perspectiva evolutiva e adaptativa, as bases neurais dos diferentes tipos de ansiedade possuem forte relação com os mecanismos inerentes aos comportamentos de defesa diante de estímulos ou situações ameaçadoras (FANSELOW, 1994). A partir dessa constatação estudos envolvendo manipulações com lesões/estimulações elétrico-químicas do sistema nervoso central, contribuíram no processo de identificação dos sistemas neurais relacionados à manifestação da ansiedade. Dois pressupostos teóricos, em especial, têm direcionado as pesquisas visando à compreensão neurobiológica da ansiedade: o Sistema de Inibição Comportamental (SIC) e o Sistema Cerebral de Defesa (SCD) (GRAY e McNAUGHTON, 2000; BLANCHARD *et al.*, 1993)

A teoria do Sistema de Inibição comportamental foi proposta pelo psicólogo britânico Jeffrey A. Gray. A primeira versão em 1960 considerava que a ansiedade ocorreria por uma ativação do SIC através de alguns níveis de estímulos ambientais: A) Estímulos neutros associados a estímulos aversivos tomariam a propriedade de indicar eventos aversivos (Sinais condicionados de punição); B) Estímulos associados a falta de uma recompensa esperada (Sinais condicionados de frustração); C) Sinais de perigo espécie –específicos, sendo inatos e não dependentes de aprendizagem; D) Sinais e estímulos em situações novas. O SIC ativado resultaria na inibição do comportamento anterior realizado pelo animal, aumento da vigilância/atenção e preparação para algum tipo de ação vigorosa (GRAY e McNAUGHTON, 2000).

Analisando o efeito de lesões e drogas ansiolíticas, em animais experimentais de laboratório, Gray identificou que algumas lesões no septo e hipocampo ou em ambas estruturas, produziam o mesmo efeito de drogas ansiolíticas, então concluiu

que o sistema septo-hipocampal seria o substrato neural do SIC, pois as drogas ansiolíticas aliviarão a ansiedade através do prejuízo do SIC. Propôs também que de maneira indireta os ansiolíticos agiriam através das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas que se projetam densamente para o septo e hipocampo (GRAY e McNAUGHTON, 2000)

A segunda versão do SIC propõe considerações adicionais. Considera uma região do hipocampo denominada subículo como agente comparador das imagens e sinais externos, formados no córtex polimodal do lobo temporal e trazidas ao hipocampo pelo passo perfurante, com as expectativas geradas pelo circuito de Papez (corpo mamilar do hipotálamo, tálamo anteroventral e córtex do giro cíngulo), adicionando também os planos gerados pelo córtex pré-frontal. Existindo coerência nessas informações, o subículo funcionaria apenas confirmando-as. Caso algo inesperado ocorresse, o subículo atuaria controlando e desencadeando a inibição comportamental, gerando a ansiedade (GRAY e McNAUGHTON, 2000).

A teoria do Sistema Cerebral de Defesa foi inspirada nas suposições apresentadas por Darwin, indicando que todo arcabouço comportamental dos animais se desenvolveu por influência de pressões evolutivas, como o que se observou em relação às características físicas do organismo (VIANA, 2010). As emoções e comportamentos de medo e pavor estariam então relacionados às reações de defesa dos animais. Em pesquisas com a implantação de eletrodos no Hipotálamo medial de gatos, Robert Hess, um neurofisiologista suíço, conseguiu por estimulação elétrica, desencadear reações de defesa acompanhadas por reações neurovegetativas (Midríase, piloereção, hiperventilação, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial), as quais Hess denominou de “reação de defesa afetiva”. Posteriormente a Hess, foram delimitadas regiões nas quais seria possível

obter a reação de defesa afetiva pela estimulação elétrica (HESS e BRUGGER, 1943). Identificaram a Matéria Cinzenta Periventricular no hipotálamo medial (substância que margeia o quarto ventrículo do diencefalo) e a Matéria Cinzenta Periaquedutal (circunda o aqueduto do mesencéfalo). Também identificou a Amígdala (situada sobre o córtex temporal e ligada ao hipotálamo medial). Então o conjunto dessas estruturas (Amígdala – Hipotálamo medial – Matéria Cinzenta Periaquedutal) foi chamado de Sistema Cerebral de Defesa (SCD) (DE MOLINA e HUNSPERGER, 1959).

O SCD é organizado da seguinte forma: a Amígdala possui conexões com estruturas do neocórtex e estruturas límbicas profundas, funcionando como uma interface sensorial emocional (aspectos positivos ou negativos das informações vindas do meio externo). Em situações de ameaça, a Amígdala avaliaria o nível da mesma, transmitindo essa informação até o Hipotálamo medial e Matéria Cinzenta Periaquedutal, apresentando, então, as reações fisiológicas e comportamentais de defesa (LeDOUX, 2003)

As duas teorias foram integradas por Gray e McNaughton (2000) com algumas mudanças nas funções de algumas estruturas. O sistema septo-hipocampal passaria a atuar na detecção de conflitos (afastamento ou aproximação) em situações de perigo. De um lado estaria o sistema cerebral de aproximação, que incentivaria a busca de fontes de satisfação (alimentar, sexual, abrigo) e do outro o sistema cerebral de defesa que atuaria na fuga ou esquiva de fontes de perigo. Se os dois sistemas fossem ativados por um mesmo estímulo ocorreria o conflito entre a aproximação e fuga, gerando a ansiedade. Para que ocorra o funcionamento integrado dos sistemas responsáveis pelas estratégias de defesa, é necessária a ação dos neurotransmissores. A participação dos neurotransmissores na ansiedade

foi e continua sendo estudada principalmente a partir do estudo da ação de drogas que diminuem ou aumentam os níveis de ansiedade. Atualmente, grande parte dos tratamentos clínicos dos transtornos de ansiedade tem sido com fármacos que interferem na neurotransmissão serotoninérgica.

De fato, a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) tem sido muito estudada nas últimas décadas e tem sido implicada na etiologia dos transtornos de ansiedade (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF, 1993; GRAEFF *et al.*, 1996; MONGEAU *et al.*, 1997). Sabe-se que os Núcleos Mediano (NMR) e Dorsal da Rafe (NDR) são considerados como as principais fontes de neurônios serotoninérgicos que se projetam para estruturas prosencefálicas (AZMITIA e SEGAL, 1978).

Baseados no conhecimento morfofuncional do sistema serotoninérgico e nas evidências experimentais e clínicas conhecidas até então, Deakin e Graeff (1991) propuseram um pressuposto teórico levando em consideração as diferenças anatômicas e funcionais das diferentes vias serotoninérgicas e os diferentes tipos de receptores possivelmente envolvidos na funcionalidade dessas vias: projeções do NDR a estruturas como a amígdala e córtex frontal, facilitariam o medo condicionado modulando respostas frente a eventos aversivos agudos e aos sintomas de ansiedade, enquanto que a via NDR-periventricular, que se projeta para a MCPD, inibiria reações de luta e fuga em situações de perigo, dor e asfixia. A função da serotonina seria apenas a de modular a defesa, facilitando padrões de comportamento de defesa passiva na amígdala e inibindo padrões de comportamento de defesa ativa no sistema periventricular, a partir do NDR. Assim, a via serotoninérgica que se origina no NDR e inerva a amígdala e o córtex pré-frontal facilitaria os comportamentos de esquiva em resposta a ameaças potenciais e distais. Evolutivamente, essa função serviria na inibição de comportamentos

repentinos e inapropriados a situação de ameaças distais ou potenciais, como comportamentos ofensivos ou de fuga, fazendo com que o animal pudesse adotar comportamentos de exploração cautelosa e/ou congelamento. Dessa maneira, a ameaça seria afastada ou retardada, dando tempo ao animal para evocar e processar memórias de situações parecidas e decidir como proceder da melhor forma. Por outro lado, projeções a receptores 5-HT<sub>1A</sub> hipocampais originadas no NMR teriam um importante papel na resistência ao estresse crônico, pois modulariam respostas desencadeadas por eventos aversivos, com um papel sobre as conseqüências comportamentais dos animais, facilitando seu processo de adaptação a essas circunstâncias. A via serotoninérgica NMR – Hipocampo Dorsal seria, então, responsável por desconectar as associações aversivas das conseqüências comportamentais delas decorrentes. Problemas nessa via ocasionariam o desenvolvimento de patologias relacionadas ao estresse, como a depressão.

No entanto, conforme já ressaltado anteriormente, o próprio Gray (GRAY e MCNAUGHTON, 2000) apontou o sistema septo-hipocampal como crucial na compreensão dos mecanismos de Inibição comportamental, portanto, relacionada com a ansiedade. Como o NMR é a principal fonte de neurônios serotoninérgicos para o Hipocampo Dorsal, várias investigações foram conduzidas nesta direção, cujos resultados foram compilados numa revisão elaborada por Andrade, Zangrossi e Graeff (2013). De fato, o conjunto de resultados sustenta o envolvimento da via NMR – Hipocampo dorsal na ansiedade.

Um aspecto a se ressaltar nesta introdução é o de no NMR e NDR estão localizados receptores 5-HT<sub>1A</sub> distribuídos nos corpo celulares e dendritos neuronais localizados nessas estruturas. São denominados receptores somatodendríticos ou



autossômicos e exercem um papel de retroalimentação sobre a atividade neuronal (ANDRADE *et al.*, 2013). Tem sido descrito que no NDR esses receptores foram identificados em neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos. No NMR, são posicionado principalmente em neurônios serotoninérgicos, o que confere uma maior especificidade nas conclusões decorrentes das manipulações experimentais farmacológicas com agonistas e antagonistas desses receptores nesse núcleo (BECK *et al.*, 2004; KIRBY *et al.*, 2003).

### **1.1.3. Caracterização dos subtipos de ansiedade**

Segundo a 5<sup>a</sup>. Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), os distúrbios de ansiedade são classificados em: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno do pânico, ataque de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por medicamento ou substância, transtorno de ansiedade atribuído a outra condição médica e transtorno de ansiedade inespecífico. Neste estudo, dar-se-á atenção à ansiedade de maneira geral e ao transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Clinicamente na espécie humana, o transtorno de ansiedade generalizada envolve preocupação e ansiedade excessivas, desproporcional às ameaças ou por motivos aparentemente injustificáveis, por pelo menos 6 meses em relação a eventos e atividades (como performance no trabalho e na escola), onde o indivíduo apresenta pelo menos três dos seguintes sintomas (exceto para crianças, onde apenas um sintoma é requerido): inquietude ou sensação de tensão ou de estar “no limite”, cansaço fácil e frequente, dificuldade de concentração ou apresentação de lapsos de memória, irritabilidade, tensão

muscular e distúrbios do sono (dificuldade de começar a dormir ou permanecer dormindo, sono agitado ou insatisfatório) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Dentre os sintomas citados acima, pode-se acrescentar também: boca seca, sudorese excessiva, diarreia, aumento da frequência urinária e enjôos. Atualmente é constatado que duas a três mulheres apresentam TAG para cada homem (DAVIS *et al.*, 1999; LEACH *et al.*, 2008; YONKERS, 2003). Observa-se também aumento com a idade, sendo mais presente em indivíduos casados, sem emprego ou em donas de casa (WELLS *et al.*, 1989).

## **1.2. CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL: UM TESTE PARA AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE**

O condicionamento contextual é um teste de avaliação comportamental que deriva do condicionamento clássico Pavloviano, onde um estímulo incondicionado (choque nas patas) elicia principalmente o comportamento de congelamento no contexto onde foram realizados os choques. Deve-se compreender que a ansiedade difere do medo em aspectos importantes. A ansiedade é eliciada quando algum evento aversivo ou ameaça menos específica ou previsível é apresentado e continua a se manifestar mesmo quando a ameaça inicial é deslocada. O medo (fobia) é eliciado por um estímulo específico que anteriormente foi associado a um evento aversivo, porém desaparece quando ocorre o deslocamento do estímulo ou ameaça (FENDT e FANSELOW, 1999; BORSINI *et al.*, 2002; LUYTEN *et al.*, 2011).

O comportamento de congelamento, exibido pelos animais no contexto em que receberam os choques nas patas, é associado ao aumento da ansiedade, e representa o principal parâmetro de avaliação da ansiedade (FENDT e FANSELOW, 1999, MAREN e HOLT, 2000).

O contexto tem como principal função a de fornecer informações do ambiente ao indivíduo, tornando possível sua adaptação ao meio. Essa adaptação ocorre através da associação de experiências do presente ou atuais com episódios iguais ou parecidos que ocorreram no passado (enquadramento da memória com a experiência presente), e a partir dessas associações, ocorrem ajustes comportamentais que atuam na manifestação de respostas ao novo evento (RUDY *et al.*, 2004).

Já foi demonstrado o envolvimento de neurônios serotoninérgicos localizados no NMR na manifestação do congelamento no condicionamento contextual (FANSELOW, 2000; MAREN *et al.*, 2013). A microinjeção do agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) no NMR, prejudicou a aquisição do condicionamento contextual em ratos machos (AVANZI *et al.*, 1998, 2003; AVANZI e BRANDÃO, 2001, BORELLI *et al.*, 2005; MELIK *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002, 2004).

Fortalecendo esses achados, sabe-se que o Hipocampo Dorsal, principal projeção dos neurônios serotoninérgicos provenientes do NMR, exerce um papel fundamental na informação cognitiva e espacial (BANNERMAN *et al.*, 2014) e está envolvido na aprendizagem de características contextuais onde o condicionamento ocorre (FANSELOW, 2000; GEWIRTZ *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2001; MAREN *et al.*, 1997; MAREN e HOLT, 2000).

### **1.3. INTERAÇÕES ENTRE ANSIEDADE, ESTROGÊNIO E NÚCLEO MEDIANO DA RAPE**

Desde a pré-história até as sociedades contemporâneas, a mulher apresentou comportamentos que lhe garantiram ajustes a diferentes demandas, visando possibilitar a vida reprodutiva e a manutenção do equilíbrio de sua família. Em certos

períodos, a ansiedade inerente à sobrevivência, deu lugar a comportamentos agressivos, visando a promoção de filhos saudáveis e proteção contra as ameaças de predadores e ambientais (MEZZACAPPA e KATLIN, 2002; PAPINCZAK e TURNER, 2000; UVNAS-MOBERG, 1998; NEUMANN, 2003).

Atualmente, a mulher vive a emancipação reivindicada no passado e apesar de ainda existir desigualdades, estas são menores e variam de acordo com o ambiente social e cultural no qual a mulher está inserida. Os direitos iguais entre os gêneros são justos, mas hoje a mulher além de atuar no mercado de trabalho, não deixou sua vida de mãe, dona de casa e esposa. Essa situação faz com que suas funções se acumulem, e na busca de exercer cada papel de maneira satisfatória, acaba desgastando-se com as pressões do cotidiano, ocasionando muitas vezes sensação de impotência ou frustração, angústia, sofrimento, quando algumas funções não são realizadas de acordo com o desejado ou diante do próprio acúmulo de atividades (COUTINHO, 2004).

Neste ambiente de muitas pressões e muitas vezes conflitivo (desejos, sociedade, cobranças), aliado à sua história de vida e, portanto, ao seu “coping”, ou seja, a forma com que enfrenta os inúmeros estímulos, muitos dos quais aversivos, presentes no seu cotidiano (KELLY, 2008), pode ocorrer a manifestação de transtornos emocionais, dentre eles, a ansiedade mórbida, prejudicando o desempenho e as relações sociais.

Além disso, tem sido relatado um aumento na manifestação da ansiedade (aliado a condições fisiológicas da mulher) em períodos nos quais se constata baixa concentração sérica de esteróides sexuais, especialmente do estrogênio, foco do presente estudo, tais como no período pré-menstrual, no puerpério, e no climatério (peri e pós-menopausa), ou em decorrência da menopausa cirúrgica pela retirada

bilateral dos ovários (PEARLSTEIN, 1995; FINK *et al.*, 1996; PETTICREW, 1997) Vários estudos têm demonstrado que a reposição estrogênica melhora esses sintomas (COLEMAN,1993; HAY *et al.*, 1994; ARPELS,1996; BLUM *et al.*, 1996; HUNTER, 1996) e também aumenta a neurotransmissão serotoninérgica (BLUM *et al.*, 1996).

Os estrogênios são hormônios esteróides de 18 carbonos, sintetizados pelos ovários e pelas glândulas adrenais. Existem 3 tipos de estrogênios, semelhantes em alguns pontos: estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e o estriol (E3)., conforme figura 1 (BILA, 2005).

Os hormônios esteróides são estruturas biologicamente ativas derivadas do colesterol, possuem em comum uma estrutura de três anéis hexagonais, e um pentagonal. Os estrogênios possuem um anel fenólico com uma hidroxila no carbono 3 e uma cetona no carbono 17 (BILA, 2005).

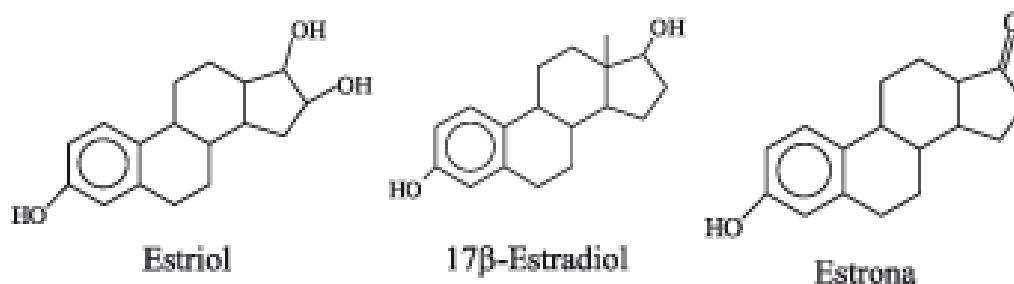


Figura 1 - Estrutura química dos estrogênios naturais. Modificado de: BILA, 2005.

A liberação dos hormônios gonadais é regulada pela ação do eixo Hipotálamo-hipófise. A hipófise secreta os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Em fêmeas, o LH estimula as células intersticiais da camada teca dos folículos ovarianos

a secretar androstenediona e testosterona (androgênios) e aumenta a recaptação de colesterol, o FSH regula a produção de estradiol e o crescimento folicular. Com a ovulação o FSH e o LH atuam sobre o corpo lúteo aumentando os níveis de estradiol e progesterona, que regula por retroalimentação negativa a secreção do GnRH, FSH e LH (IGNACIO *et al.*, 2009).

Os estrogênios agem periféricamente sobre receptores  $\alpha$  e  $\beta$  (siglas em inglês, ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ). Esses receptores também foram identificados em várias regiões encefálicas. Com base na análise da expressão de RNAm dos diferentes receptores foi demonstrada distribuição diferenciada dos mesmos em estruturas límbicas como amígdala, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (SHUGHRUE *et al.*, 1998, 2001). O ER $\beta$  está presente, principalmente, em neurônios do bulbo olfatório, supra óptico, paraventricular, supraquiasmático, glândula pineal, cerebelo, hipotálamo, tronco encefálico, córtex cingulado e pré-frontal medial. Por sua vez, o ER $\alpha$  encontra-se na amígdala e no hipotálamo, especialmente nos núcleos envolvidos com a função reprodutora. Foram identificados receptores para estrógeno (ER- $\alpha$  e ER $\beta$ ) em corpos celulares de neurônios localizados no núcleo dorsal da rafe (NDR) (ALVES *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2000) e no NMR (LERANTH *et al.*, 1999; NOMURA *et al.*, 2005).

É conhecido que existe uma co-localização de receptores estrogênicos com a enzima triptofano hidroxilase (TPH) responsável pela catalisação da síntese de serotonina. Isto sugere que o estrogênio atua, não apenas sobre os receptores serotoninérgicos, mas também na regulação da transcrição gênica desta enzima. Parece existir maior co-localização de ER $\beta$  com TPH nos núcleos da rafe (NOMURA *et al.*, 2005).

Krezel e colaboradores (2001), em estudo experimental utilizando camundongos *Knockout* para ER $\beta$ , demonstraram que esses animais apresentaram maior inibição comportamental durante a avaliação no Labirinto em Cruz Elevado, ou seja, aumento de ansiedade quando comparados com o tipo selvagem e com fêmeas *Knockout* ER $\alpha$ . Tal resultado indica que os ER $\beta$  seriam os sítios de ação do estrógeno relacionados com a modulação da ansiedade e que os ER $\alpha$  estariam mais relacionados com estruturas ou sistemas funcionalmente atrelados à reprodução e ao metabolismo geral (SOLOMON e HERMAN, 2009).

Tem sido demonstrada também uma co-funcionalidade entre a ação estrogênica e atividade de receptores 5-HT $_{1A}$ , portanto de neurônios serotoninérgicos (CLARKE e MAAYANI, 1990; ANDRADE *et al.*, 2005; ÖGREN *et al.*, 2008; ROSSI *et al.*, 2010).

Os receptores do subtipo 5-HT $_{1A}$  representam um dos principais mediadores das funções da serotonina e são distribuídos por todo sistema nervoso central, possuindo funções distintas, dependendo da estrutura cerebral. São chamados de auto-receptores 5-HT $_{1A}$  quando estão no soma e dendritos de neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe no mesencéfalo (PATEL e ZHOU, 2005).

Quando ativados, os auto-receptores 5-HT $_{1A}$  exercem atividade inibitória no disparo neuronal, assim como reduzem a liberação de serotonina pelo neurônio serotoninérgico (SPROUSE e AGHAJANIAN, 1987). O segundo tipo de receptor 5-HT $_{1A}$  é conhecido como hetero-receptor, localizados em neurônios não serotoninérgicos de várias áreas límbicas, assim como nos axônios terminais de neurônios colinérgicos e gabaérgicos (HALASY *et al.*, 1992; CASSEL e JELTSCH, 1995). Os heteroceptores 5-HT $_{1A}$  possuem a função de reduzir a atividade neuronal (POLTER e LI, 2010).

A ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> age sobre a função da proteína G nos canais de potássio causando alta hiperpolarização neuronal, diminuindo o disparo neuronal e também alteram a funcionalidade dos canais de cálcio (CHENG *et al.*, 1998; ZHONG *et al.*, 2008). Estudos mostram que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> reduz o potencial excitatório pós-sináptico, agindo sobre receptores N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) e  $\alpha$ -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) (VIGNISSE *et al.*, 2014).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> também atuam sobre a plasticidade sináptica neuronal. O agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH- DPAT (8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin) promove bloqueio na potenciação de longa duração (Long Term Potentiation ou LTP, em inglês) no córtex visual, esse fenômeno contribui na plasticidade sináptica, sendo considerado um dos principais mecanismos celulares durante o processo de aprendizagem e memória (EDAGAWA, *et al.*, 1998; COOKE e BLISS, 2006).

Tem sido observada também a ação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nos comportamentos e transtornos de ansiedade. A administração de agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) promove efeito ansiolítico nos testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e no teste de Interação Social (DUNN *et al.*, 1989). Em estudos que utilizam ratos geneticamente modificados (Knockout para o receptor 5-HT<sub>1A</sub>) observou-se aumento de ansiedade no LCE e no Teste do Campo Aberto (do inglês *Open Field Test*,) (PARKS *et al.*, 1998). A microinjeção de 8-OH-DPAT no hipocampo dorsal promoveu ansiogênese por facilitar a esquiva inibitória no LCE (DOS SANTOS *et al.*, 2008). O estrogênio modula a função dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, já que a microinjeção de Benzoato de Estradiol no Núcleo Mediano da Rafe (NMR)



promoveu efeito ansiolítico no LCE, sendo que o WAY 100.635, um antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, reverteu esse efeito (ANDRADE *et al.*, 2005).

Os receptores de serotonina do tipo <sub>1A</sub> também afetam os processos de aprendizagem e memória, pois além de influenciar a atividade de neurônios glutamatérgicos, colinérgicos e gabaérgicos em estruturas relacionadas aos processos de armazenamento de memória (Hipocampo, projeções septo-hipocampais, Córtex cerebral), atuam também nas proteínas Kinases, responsáveis por parte do processo gênico relacionado com a formação de memórias (ÖGREN *et al.*, 2008).

Estudos do nosso laboratório mostraram que a microinjeção direta de benzoato de estradiol no NMR ocasionou ansiólise tanto no LCE (ANDRADE *et al.*, 2005), como também no teste do condicionamento contextual (ANDRADE *et al.*, 2009) em fêmeas ovariectomizadas. Nos dois estudos, a antagonização prévia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> reverteu esse efeito. Como no NMR os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão localizados preponderantemente em neurônios serotoninérgicos (BECK *et al.*, 2004; KIRBY *et al.*, 2003), compreende-se que a ação do estradiol foi de modular diretamente a atividade da serotonina sobre os receptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos, ou indiretamente a atividade desses receptores (JACKSON e UPHOUSE, 1998; ANDRADE *et al.*, 2005, 2009) influenciando a manifestação do comportamento nos dois testes de ansiedade. Mais especificamente, no segundo estudo citado, a microinjeção de estradiol foi realizada antes da exposição ao contexto em que ocorreu a estimulação aversiva com choques elétricos nas patas, ou seja, esta manipulação farmacológica afetou a evocação da informação aversiva. Surge então a pergunta se o efeito do estradiol no NMR poderia também afetar a

aquisição da informação aversiva, ou seja, prejudicar a associação da informação aversiva ao contexto.

Considerando que no NMR existem receptores excitatórios (adrenérgicos e de CRH) que são acionados por sistemas relacionados com o estresse (FUNK *et al.*, 2003, OHMURA *et al.*, 2010), a estimulação dos neurônios serotonérgicos nessa estrutura ocasionaria liberação de serotonina nos terminais, principalmente no Hipocampo Dorsal, ocasionando uma aprendizagem associativa entre o estímulo aversivo e o contexto espacial em que ocorreu a exposição. Por outro lado, o estradiol no NMR potencializaria a inibição da atividade de neurônios serotonérgicos impedindo a associação do estímulo aversivo ao contexto, um prejuízo na aquisição da informação aversiva.

Assim, foi desenvolvido o estudo apresentado sequencialmente com o objetivo de verificar esta hipótese, ou seja, de avaliar o efeito da microinjeção do benzoato de estradiol no NMR sobre a manifestação da ansiedade no condicionamento contextual. Desta forma, pretendeu-se verificar se ocorreria um prejuízo na aquisição da informação aversiva quando associada ao contexto, alterando a resposta comportamental de fêmeas ovariectomizadas (diminuindo a manifestação de congelamentos e aumentando a atividade exploratória no mesmo contexto em que receberam a estimulação aversiva). Este estudo tem como foco testar e confirmar o papel do NMR na inibição comportamental, como também na resistência ao estresse, conforme mencionado nesta introdução.

## 2. REFERÊNCIAS GERAIS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5.ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013. 991 p.
- ANDRADE, T.G.C.S.; NAKAMUTA, J.S.; AVANZI, V.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 163, p. 18–25, 2005.
- ANDRADE, T.G.C.S.; AVANZI, V.; GRAEFF, F.G. Effect of estradiol benzoate microinjection into the median raphe nucleus on contextual conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 204, p. 112–116, 2009.
- ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1107-1115, dez. 2013.
- ARPELS, J.C. The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. **Journal Reproductive Medicine**, v. 41, n. 9, p. 633-639, 1996.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V.M.; DE ANDRADE, T.G.C.S.; BRANDÃO, M.L. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. **Brain Research**, v. 790, n. 1-2, p. 178–184, abr. 1998.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, n. 1-2, p. 175–184, nov. 2001.
- AVANZI, V.; SILVA, R.C.B.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiology and Behavior**, v. 78, n. 3, p. 471-477, mar. 2003.
- AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–667, jun. 1978.
- BANNERMAN, D.M.; SPRENGEL, R.; SANDERSON, D.J.; McHUGH, S. B.; NICHOLAS, J.; RAWLINS, P.; MONYER, H.; SEEBURG, P.H. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, p. 181-192, fev. 2014.
- BECK, S.G.; PAN, Y.Z.; AKANWA, A.C.; Kirby, L.G. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, n. 2, p. 994-1005, 2004.
- BILA, D.M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização**. 2005. 281p. Tese de Doutorado Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, fev. 1988.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavior Brain Research**, v. 58, p. 155-165, 1993.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 17, p. 63-79, 2008.

BLUM, I.; VERED, Y.; LIFSHITZ, A.; HAREL, D.; BLUM, M.; NORDENBERG, Y.; HARSAT, A.; SULKES, J.; GABBAY, U.; GRAFF, E. The effect of estrogen replacement therapy on plasma serotonin and catecholamines of postmenopausal women. **Israel Journal Medical Science**, v. 32, n. 12, p. 1158-1162, 1996.

BORELLI, K.G.; GÁRGARO, A.C.; SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the Median Raphe Nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v. 387, n. 2, p. 105-110, out. 2005.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, n. 2, p. 121-141, set. 2002.

BRESLAU, N.; CHILCOAT, H.D.; KESSLER, R.C.; DAVIS, G.C. Previous exposure to trauma and PTSD effects of subsequent trauma: results from the Detroit Area Survey of Trauma. **The American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 6, p. 902-907, jun. 1999.

CASSEL, J.C.; JELTSCH, H. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: Cognitive implications. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 1-41, nov. 1995.

CASTILLO, A.R.G.L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F.R.; MANFRO, G.G. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 2, dez. 2000.

CHENG, L.L.; WANG, S.J.; GEAN, P.W. Serotonin depresses excitatory synaptic transmission and depolarization-evoked  $Ca_{2+}$  influx in rat basolateral amygdala via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 2163-2172, jun. 1998.

CLARK, W.P.; MAAYANI, S. Estrogen effects on 5-HT<sub>1A</sub> receptors in hippocampal membranes from ovariectomized rats: functional and binding studies. **Brain Research**, v. 518, n. 1-2, p. 287-291, jun. 1990.

CIMPEAN, D.; DRAKE, R.E. Treating co-morbid chronic medical conditions and anxiety/depression. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 20, n. 2, p. 141-150, jun. 2011.

COLEMAN, P. Depression during female climacteric period. **Journal of Advanced Nursing**, v. 18, n. 10, p. 1540-1546, out. 1993.

COOKE, S.F.; BLISS, T.V.P. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v. 129, p. 1659-1673, 2006.

COUTINHO, M.L.R. Novas opções, antigos dilemas: mulher, família, carreira e relacionamento no Brasil. **Temas em Psicologia**, v. 12, n. 1, p. 2-7, 2004.

DAVIS, M. C.; MATTHEWS, K. A.; TWAMLEY, E. W. Is life more difficult on Mars or Venus? A meta-analytic review of sex differences in major and minor life events. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 21, n. 1, p. 83–97, mar. 1999.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305-315, 1991.

DE MOLINA, A.F.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **The Journal of physiology**, v. 145, n. 2, p. 251-265, 1959.

DOS SANTOS, L.; DE ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI JUNIOR, H. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 286–294, 2008.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 1, p. 1-10, 1989.

EDAGAWA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 2–3, p. 221-224, maio 1998.

FANSELOW, M.S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin and Review**, v. 1, n. 4, p. 429-438, 1994.

FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 73–81, jun. 2000.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743-760, 1999.

FINK, G.; SUMNER, B.; ROSIE, R.; GRACE, O.; QUINN, J.P. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state and memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 325-344, 1996.

FUNK, D.; LI, Z.; SHAHAM, Y.; LÊ, A.D. Effect of blockade of corticotropin-releasing factor receptors in the median raphe nucleus on stress-induced *c-fos* mRNA in the rat brain. **Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 1-4, nov. 2003.

GEWIRTZ, J.C.; MCNISH, K.A.; DAVIS, M. Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 83-95, jun. 2000.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behaviour and anxiety. **Reviews in the Neurosciences**, v. 4, p. 181-211, 1993.

GRAEFF, F.G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 21-24, 2003.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; ANDRADE, T.G.C.S.; DEAKIN, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de Ansiedade**. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 2012.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 161-176, 2000.

GREENBERG, P.E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R.C.; FINKELSTEIN, S.N.; BERNDT, E.R.; DAVIDSON, J.R.; BALLENGER, J.C.; FYER, A.J. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. **Journal Clinic of Psychiatry**, v. 60, n. 7, p. 427-435, jul. 1999.

GUPTA, R.R.; SEN, S.; DIEPENHORST, L.L.; RUDICK, C.N.; MAREN, S. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. **Brain Research**, v. 888, n. 2, p. 356-365, jan. 2001.

HALASY, K.; MIETTINEN, R.; SZABAT, E.; FREUND, T.F. GABAergic Interneurons are the Major Postsynaptic Targets of Median Raphe Afferents in the Rat Dentate Gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 144-153, 1992.

HAY, A.G.; BANCROFT, J.; JOHNSTONE, E.C. Affective symptoms in Women attending a menopause clinic. **British Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 4, p. 513-516, 1994.

HESS, W.R.; BRUGGER, M. Das subkortikale Zentrum den affektiven Abwehrreaktion. **Acta Helv Physiol**, v. 1, p. 33-52, 1943.

HETTEMA, J.M.; KUHN, J.W.; PRESCOTT, C.A.; KENDLER, K.S. The impact of generalized anxiety disorder and stressful life events on risk for major depressive episodes. **Psychological Medicine**, v. 36, n. 6, p. 789-795, mar. 2006.

HUNTER, M. S. Depression and the menopause. **British Medical Journal**, v. 313, p.1217-1218, 1996.

IGNACIO, D. L.; FRANKENFELD, T. G.; FORTUNATO, R. S.; VAISMAN, M.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S.; CARVALHO, D. P. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia**, v. 53, n. 3, p. 310–317, 2009.

JACKSON, A.; UPHOUSE, L. Dose-dependent effects of Estradiol Benzoate on 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist action. **Brain Research**, v. 796, n. 1-2, p. 299-302, jun. 1998.

KELLY, M.M.; TYRKA, A.R.; ANDERSON, G.M.; PRICE, L.H.; CARPENTER, L.L. Sex differences in emotional and physiological responses to the Trier Social Stress Test. **Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 87–98, mar. 2008.

KIRBY, L.G.; PERNAR, L.; VALENTINO, R.J.; BECK, S.G. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 669-683, fev. 2003.

KREZEL, W.; DUPONT, S.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; CHAPMAN, P. F. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor  $\beta$ -deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 12278-12282, out. 2001.

LEACH, L.S.; CHRISTENSEN, H.; MACKINNON, A.J.; WINDSOR, T.D.; BUTTERWORTH, P. Gender differences in depression and anxiety across the adult lifespan: the role of psychosocial mediators. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 43, n. 12, p. 983–998, dez. 2008.

LeDOUX, J.E. The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 727-738, out. 2003.

LERANTH, C.; SHANABROUGH, M.; HORVATH, T.L. Estrogen receptor- $\alpha$  in the serotonergic and supramammillary area calretinin-containing neurons of the female rat. **Experimental Brain Research**, v. 128, p. 417-420, 1999.

LUYTEN, L.; VANSTEENWEGEN, D.; VAN KUYCK, K.; GABRIËLS, L.; NUTTIN, B. Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. **Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 228–244, jun. 2011.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 88, n. 2, p. 261–274, nov. 1997.

MAREN, S.; HOLT, W. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 97–108, 2000.

MAREN, S.; PHAN, K.L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 417-428, maio 2013.

McEWEN, B.S.; PARSONS, B. Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. **Annual Reviews Pharmacology Toxicology**, v. 22, p. 555-598, 1982.

MELIK, E.; BABAR-MELIK, E.; OZGÜNEN, T.; BINOKAY, S. Median raphe nucleus mediates forming long-term but not short-term contextual fear conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 112, n. 1-2, p. 145-150, jul. 2000.

MEZZACAPPA, E.S.; KATLIN, E.S. Breast-feeding is associated with reduced perceived stress and negative mood in mothers. **Health Psychology**, v. 21, n. 2, p. 187-193, mar. 2002.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH (NIMH). **Total expenditures for the five most costly medical conditions (1996 vs. 2006)**. Disponível em: [http://www.nimh.nih.gov/statistics/4TOT\\_MC9606.shtml](http://www.nimh.nih.gov/statistics/4TOT_MC9606.shtml). Acesso em: 21/01/2014.

NEUMANN, I.D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. **Depression and Anxiety**, v. 17, n. 3, p. 111-121, maio 2003.

NOMURA, M.; AKAMA, K.T.; ALVES, S.E.; KORACH, K.S.; GUSTAFSSON, J.A.; PFAFF, D.W.; OGAWA, S. Differential distribution of estrogen receptor (ER)- $\alpha$  and ER- $\beta$  in the midbrain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: Predominant role of ER- $\beta$  in midbrain serotonergic systems. **Neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 445-456, 2005.

ÖGREN, S.O.; ERIKSSON, T.M.; ELVANDER-TOTTIE, E.; D'ADDARIO, C.; EKSTRÖM, J.C.; SVENNINGSSON, P.; MEISTER, B.; KEHR, J.; STIEDL, O. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, n. 195, n. 1, p. 54-77, dez. 2008.

OHMURA, Y.; IZUMI, T.; YAMAGUCHI, T.; TSUTSUI-KIMURA, I.; YOSHIDA, T.; YOSHIDA, M. The Serotonergic Projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus is involved in the retrieval of fear memory through the corticotropin-releasing factor type 2 receptor. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1271-1278, 2010.

PAPINCZAK, T.A.; TURNER, C.T. An analysis of personal and social factors influencing initiation and duration of breastfeeding in a large Queensland maternity hospital. **Breastfeeding Review**, v. 8, n. 1, p. 25-33, mar. 2000.

PARKER, G.; HADZI-PAVLOVIC, D. Is the female preponderance in major depression secondary to a gender difference in specific anxiety disorders? **Psychological Medicine**, v. 34, n. 3, p. 461-470, abr. 2004.



PARKS, C.L.; ROBINSON, P.S.; SIBILLE, E.; SHENK, T.; TOTH, M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 10734-10739, set. 1998.

PATEL, T.D; ZHOU, F.C. Ontogeny of 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in the developing hippocampus, *Developmental Brain Research*, v. 157, n. 1, p. 42-57, jun. 2005.

PEARLSTEIN, T. Hormones and depression: what are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, n. 2, p. 646-653, 1995.

PETTICREW, M. Causality, the menopause, and depression. **British Medical Journal**, v. 314, p. 608, 1997.

POLTER, A.M.; LI, X. 5-HT<sub>1A</sub> receptor-regulated signal transduction pathways in brain. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 10, p. 1406-1412, out. 2010.

ROSSI, D.V.; DAI, Y.; THOMAS, P.; CARRASCO, G.A.; DONCARLOS, L.L.; MUMA, N.A.; LI, Q. Estradiol-induced desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor-beta. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 7, p. 1023-1033, ago. 2010.

RUDY, J.W.; HUFF, N.C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neuroscience behavioural Reviews**, v. 28, n. 7, p. 675-685, 2004.

SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V.; SCRIMO, P.J.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. **Steroids**, v. 63, n. 10, p. 498-505, out. 1998.

SHUGHRUE, P.J.; MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 436, n. 1, p. 64-81, jul. 2001.

SILVA, R.C.B.; CRUZ, A.P.M.; AVANZI, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Distinct Contributions of Media raphe Nucleus to Contextual Fear Conditioning and Fear-Potentiated Startle. **Neural Plasticity**, v. 9, n. 4, p. 233-248, 2002.

SILVA, R.C.B.; GÁRGARO, A.C.; BRANDÃO, M.L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 151, n. 1-2, p. 93-101, maio 2004.

SOLOMON, M.B.; HERMAN, J.P. Sex differences in psychopathology: Of gonads, adrenals and mental illness. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 250-258, maio 2009.

SPROUSE, J. S.; AGHAJANIAN, G. K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> agonists. **Synapse**, v. 1, n. 1, p. 3–9, 1987.

UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 819–835, nov. 1998.

VIANA, M.B. Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. **Natureza Humana**, v. 12, n. 1, jun. 2010.

VIGNISSE, J.; STEINBUSCH, H.W.M.; GRIGORIEV, V.; BOLKUNOV, A.; PROSHIN, A.; BETTENDORFF, L.; BACHURIN, S.; STREKALOVA, T. Concomitant manipulation of murine NMDA- and AMPA-receptors to produce pro-cognitive drug effects in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 309-320, fev.2014.

ZHONG, P.; YUEN, E.Y.; YAN, Z. Modulation of Neuronal Excitability by Serotonin-NMDA Interactions in Prefrontal Cortex. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 290-299, jun. 2008.

YONKERS, K.A.; BRUCE, S.E.; DYCK, I.R.; KELLER, M.B. Chronicity, relapse, and illness—course of panic disorder, social phobia, and generalized anxiety disorder: findings in men and women from 8 years of follow-up. **Depression and Anxiety**, v. 17, n. 3, p. 173–179, maio 2003.

WELLS, J.E.; BUSHNELL, J.A.; HORNBLOW, A.R.; JOYCE, P.R.; OAKLEY-BROWNE, M.A. Christchurch Psychiatric Epidemiology Study, Part I: Methodology and lifetime prevalence for specific psychiatric disorders. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 315-326, 1989.

**3. ARTIGO:** "Interação entre estradiol e receptores 5-HT<sub>1A</sub> no Núcleo Mediano da Rafe em fêmeas ovariectomizadas, na aquisição da informação aversiva e associação ao contexto"

Interaction between estradiol and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the Median Raphe Nucleus in acquisition of aversive information and association to context in ovariectomized rats

O artigo sequencialmente descrito será submetido à revista **Hormones and Behavior**. Foram atendidas as normas da revista, exceto a disposição das Figuras, Legendas e Tabelas, que foram incorporadas ao texto para facilitar a leitura.

## Research Report

Interaction between estradiol and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the Median Raphe Nucleus in acquisition of aversive information and association to context in ovariectomized rats

Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade<sup>a\*</sup>, João Victor dos Santos Silva<sup>b</sup>,  
Fernando Frei<sup>a</sup>, Matheus Fitipaldi Batistela<sup>b</sup>, Ana Beatriz Sant'Ana do Nascimento<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *UNESP – Univ Estadual Paulista, FCL, Department of Biological Science - Avenida Dom Antonio, 2100 – 19.806-900 – Assis – São Paulo – Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratory of Physiology – UNESP – Assis – São Paulo – Brazil*

*\*Corresponding author: same address as above.*

*Fax number: (55) 18 3302-5849*

*E-mail address: [raica@assis.unesp.br](mailto:raica@assis.unesp.br)*

Running title – Median Raphe Nucleus and anxiety in female rats

Total number pages – 23 (with title page and references)

Total figures – 4

Total Tables – 1

Total number words – Manuscript (3860), Abstract (246) and Introduction (558, with citations)

## Abstract

Estrogen receptors were identified in neurons originated in the Median Raphe Nucleus (MRN). It is presented that estrogen, in this structure, is able to potentiate the action of the serotonin on somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, inhibiting the function of serotonergic neurons and causing anxiolysis. Aiming the evaluation of the interaction between estrogen action and the serotonergic pathway that originates in the MRN on the acquisition of aversive information, female *Wistar* rats were ovariectomized and, twenty one days after received direct microinjection of Estradiol Benzoate (EB) (1200ng) into the MRN, preceded by microinjection of saline or WAY 100.635 (100ng), a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. Immediately after the two microinjections, the ovariectomized rats were submitted to a foot shock session in the Skinner box. Twenty four hours later, they were exposed to the same context for 5 minutes for behavioural assessment: freezing, rearing, displacement, grooming and autonomic responses (faecal boluses and micturition). The EB microinjection in the MRN prior to the exposure of animals to the aversive event (foot shock) did not alter their behaviour in the aversive conditioning session, but neutralized the association of the aversive experience with the context: there was a decrease in the expression of freezing and increased motor activity in the test session. This effect was reversed by previous microinjection of WAY 100.635. In conclusion, the EB acted on serotonergic neurons in the MRN of the ovariectomized rats, impairing the association of the aversive experience to the context, by co-modulating the functionality of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub>.

*Keywords* – Anxiety, Contextual Conditioning, Median Raphe Nucleus, Estradiol Benzoate, WAY 100.635, 5-HT<sub>1A</sub> receptors

## Introduction

Compelling evidence indicates that women are more susceptible to anxiety than men (Leach et al., 2008; McLean and Anderson, 2009; NIMH, 2012), mainly in phases of the hormonal cycle, when seric levels of estrogen are low, such as during the pre-menstrual and the peri-menopausal periods, or after bilateral oophorectomy (Altemus, 2006; Bekker and Van Mens-Verhulst, 2007; McHenry et al., 2014; Rocca et al., 2008; Seeman, 1997). During these periods, it appears to occur an increase in the sensibility to stressors (Andreano and Cahill, 2010; Kask et al., 2008; Mihm et al., 2011; Ossewaarde et al., 2010). Studies have demonstrated that estrogen replacement treatment minimizes the effect of stressors, decreases anxiety (Walf and Frye, 2010; Walf, Paris and Frye, 2009; Wharton et al., 2013) and affects the functionality of the serotonergic system (Amin et al., 2005; Borrow and Cameron, 2014; Genazzani et al., 2007; Lasiuk and Hegadoren, 2007; McEwen, 2002).

The Median Raphe Nucleus (MRN) is considered a crucial source of serotonergic neurons that projects to prosencephalic structures related to stress and anxiety, such as the dorsal hippocampus (Azmitia and Segal, 1978; McKenna and Vertes, 2001). These anatomic analyses strengthen theoretical assumptions which suggest that the pathway MRN-Dorsal Hippocampus is a critical component in stress resistance (Deakin and Graeff, 1991) and also in the genesis of anxiety (Andrade et al., 2013) by integrating Gray's —behavioural inhibition system” (Gray and McNaughton, 2000).

In fact, several studies have demonstrated the effects of the stimulation or inactivation of the MRN on anxiety (Andrade et al., 2013 for review). More specifically, it was demonstrated that serotonergic neurons from the MRN are involved in freezing manifestation in contextual conditioning (Andrade et al., 2005;

Avanzi and Brandão, 2001; Avanzi et al., 1998; Fendt and Fanselow, 1999; Luyten et al., 2011; Silva et al., 2002, 2004), an anxiety test which involves aversive conditioning and spatial context (Fanselow, 2000; Orsini et al., 2013). In addition, it is known a wealth of experimental analysis indicating that the dorsal hippocampus, the main projection of the MRN, is involved in learning the contextual characteristics in which the conditioning occurred (Fanselow, 2000; Gewirtz et al., 2000; Gupta et al., 2001; Maren et al., 1997; Maren and Holt, 2000).

Estrogen receptors were identified in neurons located in the MRN (Leranth et al., 1999; Alves et al., 2000). A possible role of estrogen in this structure would be to potentiate the action of serotonin on somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, inhibiting the function of serotonergic neurons (McEwen, 2002; Inoue et al., 2014) and causing anxiolysis (Andrade et al., 2005, 2009). In one of these studies (Andrade et al., 2009), the microinjection of Estradiol Benzoate (EB) into the MRN of ovariectomized rats decreased the manifestation of freezing in the same context in which the animals received foot shocks. This effect was reversed by previous injection of WAY 100.635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, confirming the close interaction between estrogenic activity and the serotonergic MRN. In this case however, the pharmacological manipulations were conducted twenty-four hours after the aversive conditioning session, immediately before the exposure to the context. In this situation EB blocked the evocation of the association between aversive experience and context.

Thus, this study aimed to evaluate whether EB, microinjected into the MRN before the exposition to aversive stimulus, would impair the acquisition of the aversive information and association to context, and if the 5-HT<sub>1A</sub> receptors would be involved in this effect.

## Materials and Methods

### Animals

Normal cycling female *Wistar* rats, weighting 200g, with at least 2 months old were housed, five animals per cage, in polypropylene cages with wood shavings on the floor, for 7 days until ovariectomy. After stereotaxic surgery, the animals were housed in pairs. The rats were maintained on a 12 h light - dark cycle (lights on at 7:00 a.m., 50 lux) in a temperature-controlled room ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and given free access to food and water throughout the experiment, except during testing. The animals were handled three times a week to clean the cages.

The procedures were approved by research ethics committee of the São Paulo State University (Process 553/2009; CEP 015/2009), and they were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behaviour Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals, which are in compliance with international laws and policies. All efforts were made to minimize animal suffering.

### Drugs

Estradiol benzoate ( $\beta$ -estradiol 3 benzoate – Sigma, USA) was dissolved in sesame oil (Sigma, USA) (1200 ng) and WAY 100.635 (N-[2-methoxyphenyl]-1-piperazinyl-ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamine – Sigma, USA), a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, dissolved in saline (100 ng). Control animals received the same volume of the respective vehicle (saline or sesame oil).

### Surgeries

All female rats were bilaterally ovariectomized under tribromoethanol anesthesia (Aldrich, USA - 250 mg/kg, IP). Fourteen days after, a guide cannula of



15 mm was implanted into the brain of the animals at a 20-degree angle, with its tip remaining 1.5 mm above the injection site. This procedure was made in rats under the same anesthetic described above, associated with local 2% xylocaine anesthesia and fastened to a stereotaxic instrument (David-Kopf, USA). The following coordinates of the atlas by Paxinos and Watson (2007) were used: anteroposterior = -7.8 mm; lateral = + 2.9 mm; depth = - 7.5 mm, taking the bregma as reference. The cannula was fixed to the skull with acrylic resin and a stainless steel screw.

At the end of the surgery, all animals were injected (i.m.) with 0.2 ml of antibiotic preparation (benzylpenicillin and streptomycin, Pentabiotico Veterinário Pequeno Porte; Fort Dodge, Brazil) to prevent possible infections.

### **Microinjection of drugs into the Median Raphe Nucleus**

The microinjection was performed with a micro syringe (Hamilton, USA), connected to the needle through a polyethylene tube. The micro syringe was driven by a motor pump (Fisher Scientific Company). A 16.5 mm stainless steel needle (0.3 mm of external diameter) was introduced through the guide cannula into the MRN and a volume of 0.2 µl of the solution was injected during one minute. The needle was held in place for another minute to avoid reflux. The two microinjections were conducted, with a five-minute interval between them.

The dose of EB used was chosen on the basis of previously reported results (Andrade et al., 2005, 2009). In the first microinjection, the animals were given either saline or WAY 100635. Five minutes later, the animals received a second microinjection of sesame oil or EB. The rats were divided into 4 groups: Group 1 (G1) - Saline + Oil (n=10); Group 2 (G2) - Saline + EB (n=11); Group 3 (G3) - WAY

100.635 + Oil (n=10); Group 4 (G4) - WAY 100.635 + EB (n=10). The rats were tested immediately after the second microinjection.

#### Contextual conditioning test

Seven days after the stereotaxic surgery, immediately after the microinjections, the animals were submitted to the aversive conditioning session in a box (30x20x25 cm) with the ceiling, side and back walls made of stainless steel and the front door of transparent Plexiglas. The grid floor of this chamber consisted of stainless steel rods 1.2 cm apart from one another. Ten inescapable foot shocks (0.7 mA, 1s, the inter trial interval varied randomly between 20 and 50 s) were delivered through the test cage floor by a constant current generator (Insight, Brazil). Contextual conditioning was evaluated in the same box for 5 min, 24 h after the aversive conditioning session, called test session.

The frequency and duration of freezing were recorded. Freezing was operationally defined as the total absence of movement of the body and vibrissae for a minimal period of 6 s, accompanied by at least two of the following responses: arched back, retraction of the ears, piloerection or exophthalmos. Additional measures recorded were the number and duration of rearing and grooming behaviors, frequency of displacements and the number of faecal boluses and bouts of micturition. Rearing and grooming were defined as standing with raised forelegs placed either in the air or against the walls of the cage and as licking the fur, beginning by the muzzle, going to the ears and down to the rest of the body, respectively (Avanzi *et al.*, 1998; Avanzi & Brandão, 2001).

Both the training and the test sessions were conducted from 14:00 to 17:00 h. The brightness level on the conditioning box was 50 lux. Before positioning the next

rat, the apparatus was cleaned with 20% ethanol. The experimenter stayed outside the room, and the behaviour of the rat was recorded on videotape, which was later analysed using the standardized software Etholog 2.25 (Othoni, 2000).

### Experimental design

The procedures were developed in the sequence shown in Figure 1.

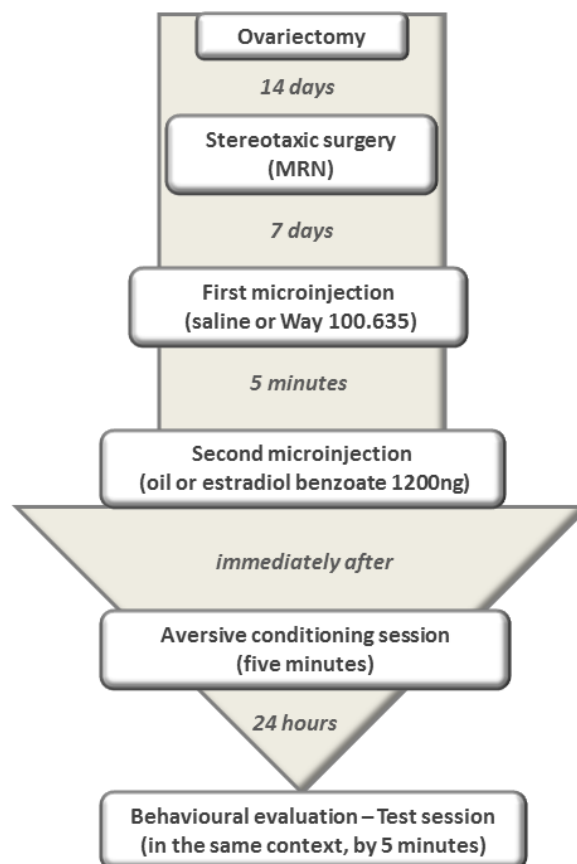


Figure 1 – Experimental Design

### Identification of microinjection sites

Immediately after behavioural assessment, the animals were anesthetized with a lethal dose of sodium pentobarbital (IP). The brain was perfused intracardially with saline solution (0.9%) followed by 10% formalin solution before being removed and fixed in a 10% formalin solution at a temperature of 0 to 4°C for three days, for

subsequent evaluation of microinjection sites. Only animals with microinjection sites located exactly inside the MRN were included in the study.

#### Data analysis

The results were analysed through two-factor analysis of variance (ANOVA), the first factor being the expositions (aversive conditioning and test session) and the second one the treatment received. Post-hoc comparisons were made through the Duncan's test. Significant values were established at  $p < 0.05$ .

#### Results

A representative position of the needle tip in the MRN can be seen in Figure 2.

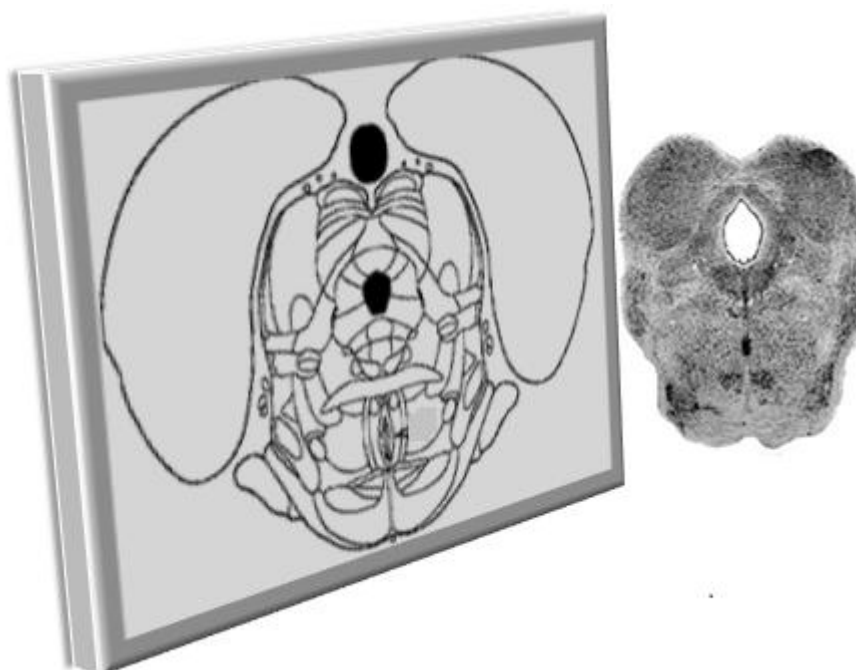


Figure 2 – Diagrammatic representation of coronal section (-7,8mm posterior to bregma) through the rat brain showing the sites of injection (Paxinos and Watson, 2007) and photomicrograph of typical injection site (indicated by arrow) in the MRN.

Analysing the freezing behaviour (Figure 3), the ANOVA showed that, in regarding to frequency, no effect of exposition [ $F(1,74)=0.00$ ;  $p=0.952$ ], but a treatment effect [ $F(3,74)=7.35$ ;  $p<0.001$ ]. There was no interaction between the two factors mentioned [ $F(3,74)=1.60$ ;  $p=0.197$ ]. The *post hoc* Duncan's test indicated that there was no difference between episodes of freezing shown by rats of the control group (G1) in the conditioning and in the test sessions, although there was an increase in this direction focused in the test session. In the test session, the EB diminished the manifestation of freezing numbers ( $p<0.01$ ). Previous microinjection of WAY 100.635 counteracted this effect ( $p<0.01$ ). When analysed the duration of this behaviour was observed effect of exposure [ $F(1,74)=5.00$ ;  $p=0.028$ ] and treatment [ $F(3,74)=7.28$ ;  $p<0.001$ ], but not the interaction between factors [ $F(3,74)=2.58$ ;  $p=0.060$ ]. Females of the control group (G1) remained more time freezing in the test session ( $p<0.05$ ), demonstrating that there was a conditioning. The EB decreased the duration of this behaviour ( $p<0.001$ ), and the WAY 100.635 reversed this effect in the test session ( $p<0.05$ ).

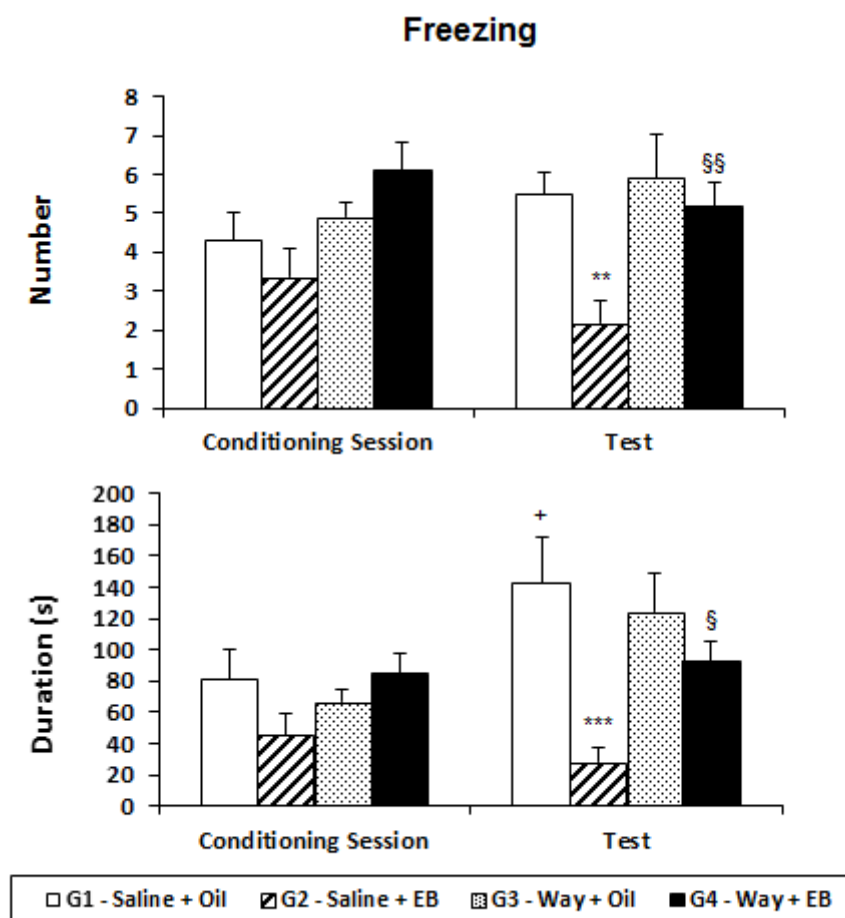


Figure 3 – Frequency and duration (seconds) of the freezing (Mean + S.E.M.), presented in conditioning and test session, by ovariectomized rats submitted to microinjections into MRN of the saline+oil (G1-Group 1), saline+EB (G2-Group 2), WAY 100.635+oil (G3-Group 3) or WAY 100.635+EB (G4-Group 4) previously to conditioning aversive session. N=10-11. Columns represent mean and bars the S.E.M. ANOVA followed by Duncan *post-hoc* test: <sup>+</sup>p<0.05, represent differences between conditioning session and test; <sup>\*\*</sup>p<0.01, p<0.001, differences between G1 and G2 in the test session; § p<0.05, §§ p<0.01, differences between G2 and G4 in the test session.

Regarding to rearing (Figure 4), the variable being the vertical exploratory locomotor activity, the two-way ANOVA revealed exposition effect in relation to the number of times this behaviour was presented [F(1,74)=32.83; p<0.001], and also the treatment effect [F(3,74)=3.58; p=0.018]. It was also possible to identify interaction between the factors [F(3,74)=3.47; p=0.020]. The control females (G1) moved less in the test session than in the conditioning session (p<0.01). The EB

increased the number of rearings ( $p < 0.01$ ), and the previous microinjection of the WAY 100.635 abolished this effect ( $p < 0.05$ ). With respect to the duration of the rearings, the results were in the same direction: there was an effect of the exposition [ $F(1,74) = 11.41$ ;  $p = 0.001$ ], of the treatment [ $F(3,74) = 5.50$ ;  $p = 0.002$ ], but there was not an interaction between the factors [ $F(3,74) = 0.47$ ;  $p = 0.701$ ]. The Duncan's test showed similar differences between groups observed in the analysis of rearing numbers.

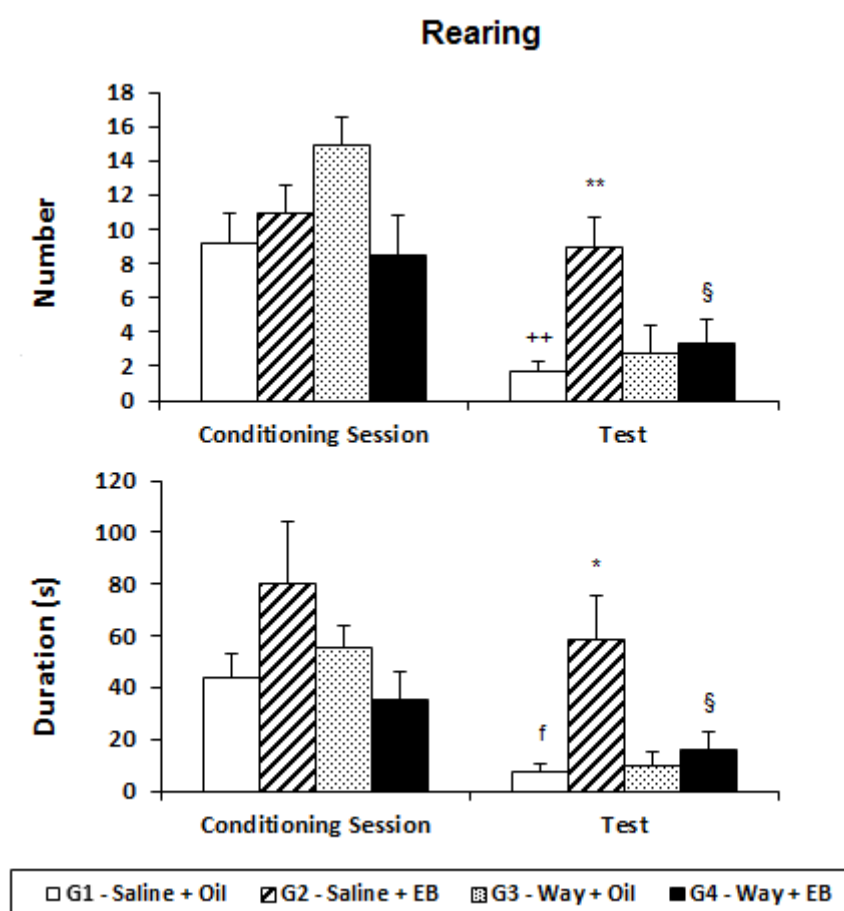


Figure 4 – Frequency and duration (seconds) of the rearing (Mean + S.E.M.), presented in conditioning and test session, by ovariectomized rats submitted to microinjections into MRN of the saline+oil (G1-Group 1), saline+EB (G2-Group 2), WAY 100.635+oil (G3-Group 3) or WAY 100.635+EB (G4-Group 4) previously to conditioning aversive session. N=10-11. Columns represent mean and bars the S.E.M. ANOVA followed by Duncan *post-hoc* test: ++ $p < 0.01$ , f (borderline), represent differences between conditioning session and test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , differences between G1 and G2 in the test session; §  $p < 0.05$ , differences between G2 and G4 in the test session.

Concerning the number of displacements in the Skinner Box (horizontal exploratory locomotor activity – Table 1), there was an effect of the exposition [ $F(1,78)=40.18$ ;  $p<0.001$ ], but neither the treatment effect [ $F(3,78)=1.87$ ;  $p=0.142$ ], nor the interaction between these factors [ $F(3,78)=1.89$ ;  $p=0.138$ ] were identified. Control rats moved less in the test session than in the aversive conditioning session ( $p<0.01$ ). This effect was counteracted by the EB action into the MRN, which increased the displacements in the test session ( $p<0.05$ ). Previous microinjection of WAY 100.635 did not modify this effect (Duncan's test).

The ovariectomized rats presented grooming only in the test session (Table 1). Analysing the number of grooming, it was possible to identify an effect of exposition [ $F(1,74)=28.28$ ;  $p<0.001$ ], but not the effect of the treatment [ $F(3,74)=0.50$ ;  $p=0.682$ ], neither interaction between the factors [ $F(3,74)=1.00$ ;  $p=0.396$ ]. The analysis of the duration of grooming showed similar results. There was a significant effect of exposition [ $F(1,74)=32.06$ ;  $p<0.001$ ], but not a treatment effect [ $F(3,74)=0.22$   $p=0.883$ ] and no interaction between the two factors [ $F(3,74)=0.89$ ;  $p=0.449$ ].

Regarding the autonomic responses analysed in this study, there was a significant effect of expositions on the number of faecal boli [ $F(1,74)=19.94$ ;  $p<0.001$ ] and bouts of micturition [ $F(1,74)=5.10$ ;  $p=0.027$ ]. Even so, these autonomic variables were not affected by treatment [faecal boluses  $F(3,74)=2.24$ ;  $p=0.091$ ; micturition  $F(3,74)=0.16$ ;  $p=0.921$ ], and no interaction between these two factors was observed [faecal boluses  $F(3,74)=1.38$ ;  $p=0.257$ ; micturition  $F(3,74)=0.50$ ;  $p=0.686$ ] (Table 1).



Table 1 – Displacements, grooming and autonomic responses shown by ovariectomized rats in the conditioning and test session, by ovariectomized rats submitted to microinjections into MRN of the saline+oil (G1-Group 1), saline+EB (G2-Group 2), WAY 100.635+oil (G3-Group 3) or WAY 100.635+EB (G4-Group 4) previously to conditioning aversive session.

Contextual conditioning test	Groups	Displacements	Grooming		Faecal boluses	Micturition
		Number	Number	Duration(s)	Number	Number
Conditioning Session	G1 Saline+Oil	17.80±2.23	0.30±0.21	1.97±1.59	6.70±1.27	1.40±0.75
	G2 Saline+EB	18.73±1.47	0	0	3.45±0.92 #	1.27±0.60
	G3 Way+Oil	23.70±1.52	0	0	6.90±0.85	2.10±0.75
	G4 Way+EB	20.30±2.03	0	0	6.80±0.81	1.60±0.62
Test Session	G1 Saline+Oil	10.50±1.56 ++	1.00±0.42	7.58±3.60	3.10±0.96 +	1.10±0.67
	G2 Saline+EB	15.73±1.54 *	1.64±0.51	12.54±3.04	2.73±0.91	0.64±0.24
	G3 Way+Oil	12.70±1.61	1.40±0.43	12.35±4.50	3.60±0.86	0.50±0.22
	G4 Way+EB	12.20±1.40 §	0.90±0.28	13.99±4.23	2.70±0.76	0.60±0.22

Mean + S.E.M. N=10-11. Duncan's test after ANOVA: #p<0.05, represent differences between G1 and G2 in conditioning session; +p<0.05, ++p<0.01, differences between conditioning session and test; \*p<0.05, differences between G1 and G2 in the test session; § p<0.05, differences between G2 and G4 in the test session.

## Discussion

The contextual conditioning is a form of Pavlovian conditioning where there is the pairing between the unconditioned stimulus (U.S., a footshock) and the context in which the shock was released. It has been a way of assessing anxiety when the animals are subsequently replaced in the same context in which they received the aversive stimuli. At this time, there is a potential danger, which characterizes the state of anxiety. In this condition, it is common that animals freeze, an immobility

behavior, constituting the main behavioral parameter associated with aversive context conditioning (Fanselow, 2000). It has been reported that anxiolytics and antidepressants (acute treatment) minimize the manifestation of this behavior in this test (Borsini et al., 2002; Miyamoto et al., 2000).

In the present study, ovariectomized females showed an increase in the expression of freezing and grooming, as well a decrease of the locomotor activity (both horizontal and vertical) and elimination of the faecal boluses and micturition in the same context in which they were exposed to aversive conditioning with electric shocks in the test session. These findings confirm previous reports that showed similar results in control male rats (Avanzi et al., 1998, 2003; Avanzi and Brandão, 2001; Cruz et al., 1993; Fanselow, 1991; Melik et al., 2000; Rudy et al., 2004; Silva et al., 2002, 2004; Vianna et al., 2001) and in ovariectomized rats (Andrade et al., 2009). Previous studies also showed that the removal of the contextual signals associated with shock, when the rats were placed in a box in which the foot shocks were not given, in a different place, these behavioral responses were absent (Avanzi and Brandão, 2001; Avanzi et al., 1998, 2003; Fanselow, 2000).

A wealth of studies has demonstrated the involvement of the MRN in the manifestation of freezing during contextual conditioning (Avanzi and Brandão, 2001; Avanzi et al., 1998, 2003; Borelli et al., 2005; Melik et al., 2000; Silva et al., 2002, 2004). McKenna and Vertes (2001) showed that the MRN projects heavily to septo-medial and hippocampal regions, in which a large amount of serotonergic neurons participate of these projections. For Gray (Gray and McNaughton, 2000), the septo-hippocampal system has a pivotal role in the behavioral inhibition process. It is known that, especially the dorsal hippocampus, main MRN projection, exerts a role in cognitive and spacial information. Therefore, this pathway would be recruited in

aversive situations associated with a context, leading to behavioral inhibition. For Deakin and Graeff (1991), this activation would occur as a result of conditioned and unconditioned chronic stimuli, promoting resilience to stress by strengthening the "coping" (Paul and Lowry, 2013).

As the MRN receives afferences from regions related to perception or processing of aversive stimuli, such as the *Locus coeruleus* and the hypothalamus (medial and lateral pre-optic areas, anterior and lateral hypothalamus, hypothalamic dorso-medial and arcuate nuclei) (Harsing, 2006; Hensler, 2006; Marcinkiewicz et al., 1984), serotonergic neurons in the MRN would be activated especially by stimulation of nor-adrenaline and/or CRH receptors in this region (Funk et al., 2003; Ohmura et al., 2010). That is, the acute stress related to the exposition to electric shocks would activate the median raphe nucleus-dorsal hippocampus pathway, promoting the storage of spacial information, since the dorsal hippocampus exerts this function, as previously mentioned.

Besides, there are intra-raphe modulatory mechanisms dependent of the local gabaergic circuitry, which is characterized by interneurons that exert inhibition of ascending 5-HT transmission (Li et al., 2006; Varga et al., 2002) or of the indolaminergic negative feedback (Hensler, 2006). There is a mutual local control through the bilateral interconnection of serotonergic neurons between the Dorsal Raphe Nucleus (DRN) and MRN (Hensler, 2006). The endogenous serotonin activates 5-HT<sub>1A</sub> receptors located in the dendrites or the cell body of neurons, also called somatodendritic receptors, reducing neuronal firing and consequently, the release of 5-HT in terminal areas projection (Harsing, 2006; Kusljic and Van Den Buuse, 2006; Ögren et al., 2008). There is a higher density of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in

MRN serotonergic neurons, unlike the DRN, where these receptors are also identified in non-serotonergic neurons (Beck et al., 2004; Kirby et al., 2003).

It has been known that inactivation of MRN neurons by 5-HT<sub>1A</sub> agonists of receptors caused anxiolysis in different tests of anxiety similar to what was observed as a result of lesion of this structure (Andrade et al., 2013). The microinjection of 8-OH-DPAT in the MRN impaired the acquisition of contextual fear in male rats (Avanzi et al., 1998, 2003; Avanzi and Brandão, 2001; Borelli et al., 2005; Melik et al., 2000; Silva et al., 2002, 2004). On the other hand, the previous injection of a silent dose of WAY 100.635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist into MRN, reversed the anxiolytic effect of 8-OH-DPAT in the elevated T-maze (Dos Santos et al., 2005, 2008; Vicente et al., 2008) and in the dark-light transition test (Vicente et al., 2008).

These aspects strengthen the supposition of the involvement of MRN serotonergic neurons in anxiety both in innate situations as well as in experiments involving conditioning. However, the main focus of the present study is the comprehension of female behavior, especially those with loss of ovarian function (transitional or surgical post menopause), in situations related to aversive conditioning. It is well established that the ovariectomy increases the manifestation of freezing in contextual conditioning test (Gupta et al., 2001), and that treatment with estradiol improves it (Barha et al., 2010), by disinhibiting the behavior similarly to what is observed in the proestrus in some anxiety tests (Frye et al., 2000; Markus and Zecevic, 1997), a period when the levels of sexual steroids are elevated (Freeman, 1994). It has been reported that estradiol increases serotonergic activity decreasing the expression of monoamine oxidases, increasing activity of tryptophan hydroxylase, and also potentiating local 5-HT activity by regulate the expression of the serotonin reuptake transporter (SERT). In addition, this hormone also affects the

distribution and state of 5-HT receptors (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>) (Amin et al., 2005; Genazzani et al., 2007). In this direction, Le Saux and Di Paolo (2005) showed that ovariectomy increased the binding of a 5-HT<sub>1A</sub> agonist ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT) in rat DRN neurons. The treatment with estradiol reversed this effect and restored the binding levels to those of intact animals. In the present study, it is possible that ovariectomy has caused an increase in the expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the MRN. As estradiol potentiates local 5-HT activity on 5-HT<sub>1A</sub> receptors, the acute effect of EB in the MRN in ovariectomized rats may also have potentiated the inhibitory role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on the activity of MRN serotonergic neurons. Therefore, if estradiol chronically desensitizes 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Bethea et al., 2002), the loss of estrogen, mainly in the menopause (transitional and surgical), could cause an increase in 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the MRN (Amin et al., 2005; Biegon and McEwen, 1982). However, at this stage in the life of females, there would not be the potentiation of the endogenous estrogen on the activity of serotonin over 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritic receptors. Consequently, it could promote anxiogenesis to the acute aversive stimuli.

In fact, previous studies in our laboratory, based on the identification of estrogen receptors in cell bodies of neurons located in the MRN (Leranth et al., 1999; Alves et al., 2000), demonstrated that the microinjection of EB in this structure minimizes the anxiety in ovariectomized rats in the elevated plus-maze and in the contextual conditioning. Besides, this effect was reversed by prior injection of WAY 100.635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, in this same structure (Andrade et al., 2005, 2009).

The results of the present investigation confirm these facts. But in this study, the microinjection of EB into the MRN was performed before the exposure of animals to the aversive events. This experimental procedure did not affect the behavior of

ovariectomized rats in the conditioning session, but impaired the freezing manifestation in the test session, twenty-four hours after the aversive conditioning. It is supposed that the effect of the EB in the MRN may have compromised the learning of the association among aversive experience (foot shocks) and context without modifying the form of how to deal with the stressor. The previous antagonization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors in MRN counteracted the EB effect in this structure.

In a more detailed analysis of the behaviors, freezing and locomotor activity were affected by the treatments used. The autonomic responses were potentiated only in the conditioning session, when animals received unpredictable and inescapable foot shocks. Grooming, an innate behavior that can generally be increased in two situations, high or low levels of stress (Kalueff and Tuohimma, 2004), was increased only during the test session, which is similar to what was seen as a result of the restraint in male rats (Andrade and Graeff, 2001), and was not modified by any treatment. The electrolytic lesion to the MRN diminished the presentation of grooming in the elevated plus-maze, but specific lesions with 5,7-DHT did not affect this behavior (Andrade and Graeff, 2001). Taken together, these results suggest that grooming could be affected by the function of non-serotonergic neurons originated in the MRN.

In conclusion, the microinjection of EB into the MRN, previously to the exposure of the animals to aversive events (foot shocks), did not alter the behavior of the animals in the conditioning session, but neutralized the association of the aversive experience to the context. It is possible that this steroid has damaged the acquisition of the aforementioned association due to the serotonergic activity blockage in the MRN, since this effect was reversed by previous microinjecting WAY 100.635, in the analysis of freezing and exploratory locomotor activity. Hence, among

the effects of EB, there is the possibility that this steroid exerts a function on serotonergic neurons originated in the MRN, minimizing the impact of acute stressor stimuli on behavior by impairing the acquisition of aversive information. Its deficiency could contribute to the perception increase of these stimuli, promoting an increase in anxiety in female rats, in periods of low estrogen concentration. Making an analogy to human experiences, anxiety in women is augmented in moments when there is a low concentration of estrogen, and potentiated in environments where aversive experiences happened, or that remember the place where undesirable or aversive stimuli occurred. That is, among the effects of EB, there is the possibility of acting as an inhibitor of the medial raphe nucleus-dorsal hippocampus pathway, minimizing the effects of acute stress, attenuating the association of the aversive experience to the context, or preventing the acquisition of this aversive information.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grant #[2010/06414-3](#) from São Paulo Research Foundation (FAPESP).

### **References**

- Altemus, M., 2006. Sex differences in depression and anxiety disorders: potential biological determinants. *Horm. Behav.* 50, 534–538.
- Alves, S.E., McEwen, B.S., Hayashi, S., Korach, K.S., Pfaff, D.W., Ogawa, S. 2000. Estrogen –regulated progesterin receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ) gene-disrupted mice. *J. Comp. Neurol.* 427, 185-195.
- Amin, Z., Canli, T., Epperson, C.N., 2005. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 4, 43–58.
- Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Jr, H., Graeff, F.G., 2013. The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J. Psychopharmacol.* 27, 1107–1115.

- Andrade, T.G.C.S., Avanzi, V., Graeff, F.G., 2009. Effect of estradiol benzoate microinjection into the median raphe nucleus on contextual conditioning. *Behav. Brain Res.* 204, 112–116.
- Andrade, T.G.C.S., Nakamuta, J.S., Avanzi, V., Graeff, F.G., 2005. Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behav. Brain Res.* 163, 18–25.
- Andrade, T.G.C.S., Graeff, F.G., 2001. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the Median Raphe Nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 70, 1-14.
- Andreano, J.M., Cahill, L., 2010. Menstrual cycle modulation of medial temporal activity evoked by negative emotion. *Neuroimage* 53, 1286–1293.
- Avanzi, V., Brandão, M.L., 2001. Activation of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 126, 175–184.
- Avanzi, V., Castilho, V.M., Andrade, T.G.C.S., Brandão, M.L., 1998. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. *Brain Res.* 790, 178–184.
- Avanzi, V., Silva, R.C., Macedo, C.E., Brandão, M.L., 2003. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. *Physiol. Behav.* 78, 471-477.
- Azmitia, E.C., Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 179, 641-667.
- Barha, C.K., Dalton, G.L., Galea, L.A.M., 2010. Low doses of 17 $\alpha$ -estradiol and 17 $\beta$ -estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17 $\alpha$ - and 17 $\beta$ -estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. *Neuropsychopharmacol.* 35, 547–559.
- Beck, S.G., Pan, Y.Z., Akanwa, A.C., Kirby, L.G., 2004. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J. Neurophysiol.* 91, 994-1005.
- Bekker, M.H.J., van Mens-Verhulst, J., 2007. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. *Gend. Med.* 4 Suppl B, 178–193.
- Bethea, C.L., Lu, N.Z., Gundlah, C., Streicher, J.M., 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 41–100.
- Biegon, A., McEwen, B.S., 1982. Modulation by estradiol of serotonin receptors in brain. *J. Neurosci.* 2, 199–205.



- Borelli, K.G., Gárgaro, A.C., Santos, J.M., Brandão, M.L., 2005. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the Median Raphe Nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neurosci. Lett.* 387, 105-110.
- Borrow, A.P., Cameron, N.M., 2014. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: Implications for female mood disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 54, 13-25.
- Borsini, F., Podhorna, J., Marazziti, D., 2002. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl).* 163, 121–141.
- Cruz, A.P.M., Bueno, J.L.O., Graeff, F.G., 1993. Influence of stimulus preexposure and of context familiarity on conditioned freezing behaviour. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 615-621.
- Deakin, J.F.W., Graeff, F.G., 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.* 5, 339-341.
- Dos Santos, L., de Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Junior, H., 2005. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology* 179, 733-741.
- Dos Santos, L., de Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Junior, H Jr., 2008. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18, 286–294.
- Fanselow, M.S., 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 110, 73–81.
- Fanselow, M.S., 1991. The midbrain periaqueductal gray as coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A., Bandler, R. (Eds.), *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization.* Plenum, London, pp. 151-173.
- Fendt, M., Fanselow, M.S., 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 743–60.
- Freeman, M.E., 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat, in: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction.* Raven Press, New York, pp. 613-658.
- Frye, C.A., Petralia, S.M., Rhodes, M.E., 2000. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 587–596.

- Funk, D., Li, Z., Shaham, Y., Lê, A.D., 2003. Effect of blockade of corticotropin-releasing factor receptors in the median raphe nucleus on stress-induced c-fos mRNA in the rat brain. *Neuroscience* 122, 1-4.
- Genazzani, A.R., Pluchino, N., Luisi, S., Luisi, M., 2007. Estrogen, cognition and female ageing. *Hum. Reprod. Update* 13, 175–187.
- Gewirtz, J.C., McNish, K.A., Davis, M., 2000. Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? *Behav. Brain Res.* 110, 83–95.
- Gray, J.A., McNaughton, N., 2000. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J. Affect. Disord.* 61, 161–176.
- Gupta, R.R., Sen, S., Diepenhorst, L.L., Rudick, C.N., Maren, S., 2001. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain Res.* 888, 356–365.
- Harsing, L.G., 2006. The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 313–339.
- Hensler, J.G., 2006. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 203–214.
- Inoue, S., Shikanai, H., Matsumoto, M., Hiraide, S., Saito, Y., Yanagawa, Y., Yoshioka, M., Shimamura, K., Togashi, H., 2014. Metaplastic Regulation of the Median Raphe Nucleus via Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> Receptor on Hippocampal Synaptic Plasticity Is Associated With Gender-Specific Emotional Expression in Rats. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 394–407.
- Kalueff, A.V., Touhima, P., 2004. Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta. Neurobiol. Exp. (Wars).* 64, 439-448.
- Kask, K., Gulinello, M., Bäckström, T., Geyer, M.A., Sundström-Poromaa, I., 2008. Patients with premenstrual dysphoric disorder have increased startle response across both cycle phases and lower levels of prepulse inhibition during the late luteal phase of the menstrual cycle. *Neuropsychopharmacology* 33, 2283–2290.
- Kirby, L.G., Pernar, L., Valentino, R.J., Beck, S.G., 2003. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116, 669-683.
- Kusljic, S., van den Buuse, M., 2006. Differential involvement of 5-HT projections within the amygdala in prepulse inhibition but not in psychotomimetic drug-induced hyperlocomotion. *Behav. Brain Res.* 168, 74–82.
- Lasiuk, G.C., Hegadoren, K.M., 2007. The effects of estradiol on central serotonergic systems and its relationship to mood in women. *Biol. Res. Nurs.* 9, 147–160.

- Leach, L.S., Christensen, H., Mackinnon, A.J., Windsor, T.D., Butterworth, P., 2008. Gender differences in depression and anxiety across the adult lifespan: the role of psychosocial mediators. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* 43, 983–998.
- Leranth, C., Shanabrough, M., Horvath, T.L., 1999. Estrogen receptor-alpha in the raphe serotonergic and supramammillary area calretinin-containing neurons of the female rat. *Exp. Brain Res.* 128, 417–420.
- Le Saux, M., Di Paolo, T., 2005. Changes in 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding and G-protein activation in the rat brain after estrogen treatment: comparison with tamoxifen and raloxifene. *Rev. Psychiatr. Neurosci.* 30, 110–117.
- Li, S.; Varga, V.; Sik, A., Kocsis, B., 2006. Gabaergic control of the ascending input from the median raphe nucleus to the limbic system. *J. Neurophysiol.* 94, 2561–2574.
- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Gabriëls, L., Nuttin, B., 2011. Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 11, 228–244.
- Marcinkiewicz, M., Vergé, D., Gozlan, H., Pichat, L., Hamon, M., 1984. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res.* 291, 159–163.
- Maren, S., Aharonov, G., Fanselow, M.S., 1997. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 88, 261–274.
- Maren, S., Holt, W., 2000. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav. Brain Res.* 110, 97–108.
- Markus, E.J., Zecevic, M., 1997. Sex differences and estrous cycle changes in hippocampus-dependent fear conditioning. *Psychobiology* 25, 246–252.
- McEwen, B., 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 357–384.
- McHenry, J., Carrier, N., Hull, E., Kabbaj, M., 2014. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 42–57.
- McKenna, J.T., Vertes, R.P., 2001. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res. Bull.* 54, 619–630.
- McLean, C.P., Anderson, E.R., 2009. Brave men and timid women? A review of the gender differences in fear and anxiety. *Clinical Psychology Review* 29, 496–505.
- Melik, E., Babar-Melik, E., Ozgüven, T., Binokay, S., 2000. Median raphe nucleus mediates forming long-term but not short-term contextual fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 112, 145–150.

- Miyamoto, J., Tsuji, M., Takeda, H., Nawa, H., Matsumiya, T., 2000. Pretreatment with diazepam suppresses the reduction in defensive freezing behavior induced by fluvoxamine in the conditioned fear stress paradigm in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 409, 81–84.
- NIMH, National Institute of Mental Health, 2012. Any anxiety disorder among adults. Available at [http://www.nimh.nih.gov/statistics/1ANYANX\\_ADULT.shtml](http://www.nimh.nih.gov/statistics/1ANYANX_ADULT.shtml)
- Ögren, S.O., Eriksson, T.M., Elvander-Tottie, E., D’Addario, C., Ekström, J.C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., Stiedl, O., 2008. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 195, 54–77.
- Ohmura, Y., Izumi, T., Yamaguchi, T., Tsutsui-Kimura, I., Yoshida, T., Yoshida, M., 2010. The Serotonergic Projection from the Median Raphe Nucleus to the Ventral Hippocampus is Involved in the Retrieval of Fear Memory Through the Corticotropin-Releasing Factor Type 2 Receptor. *Neuropsychopharmacology* 35, 1271-1278.
- Orsini, C.A, Yan, C., Maren, S., 2013. Ensemble coding of context-dependent fear memory in the amygdala. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 199.
- Ossewaarde, L., Hermans, E.J., van Wingen, G.A., Kooijman, S.C., Johansson, I-M., Bäckström, T., Fernández, G., 2010. Neural mechanisms underlying changes in stress-sensitivity across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 35, 47–55.
- Othoni, E.B., 2000. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav. Res. Meth. Instrum. Comput.* 32, 446-449.
- Paul, E.D., Lowry, C.A., 2013. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J. Psychopharmacol.* 27, 1090–1106.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Rocca, W.A., Grossardt, B.R., Geda, Y.E., Gostout, B.S., Bower, J.H., Maraganore, D.M., de Andrade, M., Melton, L.J., 2008. Long-term risk of depressive and anxiety symptoms after early bilateral oophorectomy. *Menopause.* 15, 1050–1059.
- Rudy, J.W., Huff, N.C., Matus-Amat, P., 2004. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 675-685.
- Seeman, M.V., 1997. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am. J. Psychiatry* 154, 1641–1647.

- Silva, R.C.B.; Cruz, A. P.M.; Avanzi, V.; Landeira-Fernandez, J.; Brandão, M.L., 2002. Distinct Contributions of Median raphe Nucleus to Contextual Fear Conditioning and Fear-Potentiated Startle. *Neural Plast.* 9, 233–248.
- Silva, R.C.B., Gárgaro, A.C., Brandão, M.L., 2004. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav. Brain Res.* 151, 93–101.
- Varga, V., Sik, A., Freund, T.F., Kocsis, B., 2002. GABA(B) receptors in the median raphe nucleus: distribution and role in the serotonergic control of hippocampal activity. *Neuroscience* 109, 119–132.
- Vianna, D.M.L., Graeff, F.G., Landeira-Fernandez, J., Brandão, M.L., 2001. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn. Mem.* 8, 164-169.
- Vicente, M.A., Zangrossi, H Jr., dos Santos L., Macedo, C.E., Andrade, T.G.C.S., 2008. Involvement of median raphe nucleus 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. *Neurosci. Lett.* 445, 204–208.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2010. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol. Behav.* 99, 169–174.
- Walf, A.A., Paris, J.J., Frye, C.A., 2009. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology* 34, 909–916.
- Wharton, W., Gleason, C.E., Olson, S.R.M.S., Carlsson, C.M., Asthama, S., 2013. Neurobiological underpinnings of the estrogen – mood relationship. *Curr Psychiatry Rev.* 8, 247–256.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Concluindo, a microinjeção do Benzoato de Estradiol (BE) no Núcleo Mediano da Rafe (NMR) antes da sessão de condicionamento prejudicou a associação entre o estímulo aversivo e o contexto em que o mesmo ocorreu. Essa manipulação experimental não afetou o comportamento de fêmeas ovariectomizadas na sessão de condicionamento, ou seja, ao serem submetidas a esse tratamento agudo central apresentaram os comportamentos esperados em relação à emissão dos choques elétricos nas patas, mas quando recolocadas no mesmo contexto em que os mesmos foram dados, houve minimização dos congelamentos e aumento da atividade motora: o BE minimizou a ansiedade. Esse quadro foi revertido pela antagonização prévia de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, indicando o efeito co-modulatório do estradiol sobre a atividade de neurônios serotoninérgicos localizados no NMR, já que nessa estrutura esses receptores são localizados em neurônios serotoninérgicos.

Assim, o estradiol, na via serotoninérgica que parte do NMR e se projeta principalmente para o hipocampo dorsal, ocasionou efeito inibitório, possivelmente por co-modular a atividade da serotonina sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub> ou agindo diretamente sobre os mesmos ou sobre os eventos em cascata que se sucedem à sua estimulação. Outra possibilidade é que o estradiol exerça ação direta sobre seu receptor específico ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), já identificados no NMR, potencializando a atividade da serotonina sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos. Este último aspecto está sendo investigado paralelamente a este estudo.

Esses resultados em conjunto mostram que neurônios serotoninérgicos localizados no NMR são modulados pela atividade estrogênica minimizando a associação entre estímulos aversivos e contexto. A ausência desse esteroide implica em potencialização do efeito do estímulo aversivo e sua associação ao espaço físico

em que o mesmo ocorreu, ou seja, aumentando a apresentação dos comportamentos que caracterizam a ansiedade no teste do condicionamento contextual.

Se generalizados, tais achados poderiam explicar o motivo pelo qual as mulheres, em períodos de baixa concentração estrogênica, apresentam maior ansiedade diante de estímulos aversivos. Provavelmente, nas fases do ciclo hormonal onde as concentrações séricas hormonais são maiores, fora do período pré-menstrual ou menopausa, as situações aversivas e suas contingências teriam menor impacto, ou seja, seriam percebidas com uma conotação menos aversiva, e/ou a associação aos sinais ambientais em que ocorreram os estímulos aversivos seria da mesma forma enfraquecida.

## 5. ANEXO: NORMAS DA REVISTA HORMONES AND BEHAVIOR

### Preparation

#### Article Structure

##### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

##### Article structure

###### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

###### **Material and Methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. The types of statistical tests used to analyze the data should be clearly specified.

###### **Results**

Results of statistical tests should be clearly presented.

###### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

###### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.



## Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

## Artwork

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic

artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

**Cover artwork.**

Authors are encouraged to submit artwork associated with their article for possible use on the cover of the issue of *Hormones and Behavior* in which the article appears. The author whose artwork is chosen for the cover will receive a PDF file of the cover as a memento.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

**Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

**References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

**Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

**Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a

preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.