

VINÍCIUS DIAS KÜMPEL

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT_{1A} NO HIPOCAMPO
VENTRAL NA REGULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS
RELACIONADOS COM A ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O
PÂNICO**

ASSIS

2016

VINÍCIUS DIAS KÜMPEL

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT_{1A} NO HIPOCAMPO
VENTRAL NA REGULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS
RELACIONADOS COM A ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O
PÂNICO**

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 da
Diversidade Biológica)

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

ASSIS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

K96e Kümpel, Vinícius Dias
Envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico / Vinícius Dias Kümpel. Assis, 2016.
99 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientadora: Profa. Dra. Telma G. C. Spera de Andrade

1. Hipocampo (Cérebro). 2. Labirinto em T Elevado. 3. Midazolam. 4. 8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina. 5. Transtornos da ansiedade. 6. Síndrome do pânico. I. Título.

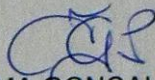
VINÍCIUS DIAS KUMPEL

ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT_{1A} NO HIPOCAMPO
VENTRAL NA REGULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS
DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO

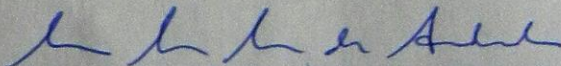
Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP para a obtenção
do título de Mestrado Acadêmico em
Biociências (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 17/03/2016

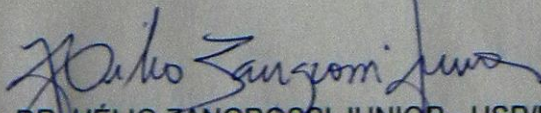
COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROFA. DRA. TELMA GONÇALVES CARNEIRO SPERA DE ANDRADE -
UNESP/Assis



Membros: PROFA. DRA. MIRIAM MENDONÇA MORATO ANDRADE - UNESP/Assis



PROF. DR. HÉLIO ZANGROSSI JUNIOR - USP/Ribeirão Preto

Agradecimentos

Em primeiro lugar ao meu Deus, companheiro e auxiliador, maior responsável por minha existência, saúde e sucesso.

Aos meus pais, mais que qualquer outra pessoa, pela educação e incentivos pessoais e materiais. Por representarem com excelência papel fundamental em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora e grande amiga Prof^a Dr.^a Telma, pelas palavras e ações de orientação, instrução, apoio, aconselhamento, ânimo e reconhecimento, dentro e fora do ambiente universitário, sem as quais não seria possível conquistar a atual etapa de minha formação acadêmica.

Ao Dr. Hélio Zangrossi Jr, pela parceria nesta linha de pesquisa.

Aos meus colegas pesquisadores, Matheus, Amaryllis e Sérgio, amigos valorosos que somaram esforços para a realização desta pesquisa.

Aos demais amigos do Laboratório de Fisiologia, companheiros, auxiliares e torcedores, sua amizade realmente é uma das minhas maiores gratificações.

Aos meus amigos também de fora do ambiente acadêmico, que mesmo sem compreender direito o que faço nesta área de atuação, me consideram muito inteligente, demonstrando toda sua gentileza. Suas amizades e companheirismo são para mim de valor imensurável.

Aos pesquisadores membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite, tornando este momento ainda mais caro e significativo.

Muito obrigado!

*“Cast all your anxiety on God,
because he cares for you”*

Holy Bible, 1 Peter 5:7
(New International Version)

KÜMPEL, Vinícius Dias. **Envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico**. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

RESUMO

Ainda pouco se conhece a respeito da atividade serotoninérgica sobre receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de diferentes tipos de ansiedade. O Labirinto em T elevado (LTE) é um teste que avalia separadamente dois subtipos de ansiedade: a ansiedade generalizada e o pânico, respectivamente através da avaliação dos comportamentos defensivos de esquivas inibitórias e das fugas. Assim, este estudo teve por objetivo investigar o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no HV sobre a manifestação dos transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e pânico (TP) no LTE, tendo como parâmetro a ativação de receptores gabaérgicos (GABA_A) nessa área do hipocampo. Foram conduzidos dois experimentos em ratos *Wistar*: o Experimento 1, visando avaliar o efeito do midazolam (10, 20 ou 40nmol) - um benzodiazepínico que potencializa a ação do GABA em receptores GABA_A; e o Experimento 2, para avaliar o efeito de 8-OH-DPAT (0,6, 3 ou 15nmol) – um agonista de receptores 5-HT_{1A}. Animais dos grupos controles nos dois experimentos foram tratados com salina. Dez minutos após as microinjeções foram submetidos ao LTE para avaliação das latências (em segundos) para esquivas e fugas. Imediatamente após, os animais foram colocados no centro da arena para avaliação da atividade motora (número de quadrados percorridos). Os resultados apontaram que a maior dose de midazolam microinjetada no hipocampo ventral causou ansiólise, comprovada pela diminuição na latência das esquivas em relação aos animais controles e àqueles tratados com 10nmol do mesmo fármaco. Resultado semelhante foi constatado nas três doses de 8-OH-DPAT. Não se observou qualquer alteração nas fugas, e nem na atividade motora dos animais tratados com qualquer um dos fármacos testados. Essas evidências comportamentais indicam que a ativação de receptores 5-HT_{1A} no HV diminuiu o comportamento de esquiva dos animais, sem afetar as respostas de fugas, semelhantemente ao que se observou em decorrência da ação do midazolam sobre receptores GABA_A. Esses resultados indicam um envolvimento desses receptores na regulação do TAG, mas não do TP.

Palavras-chave: Hipocampo Ventral. Labirinto em T Elevado. Midazolam. 8-OH-DPAT. Transtorno de Ansiedade Generalizada. Transtorno do Pânico. GABA_A. 5-HT_{1A}.

KÜMPEL, Vinícius Dias. **Involvement of the 5-HT_{1A} receptors in ventral hippocampus on anxiety- and panic- related defensive behaviors.** 2016. 99 f. Dissertation (Masters in Bioscience). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

ABSTRACT

The little is known about the serotonergic activity on 5-HT_{1A} receptors in the ventral hippocampus in the regulation of different types of anxiety. The Elevated T Maze (ETM) is a test that evaluates separately two subtypes of anxiety: generalized anxiety and panic, respectively by evaluating the defensive behaviors of inhibitory avoidance and escapes. Therefore this study aimed to investigate the involvement of 5-HT_{1A} receptors in VH on the manifestation of generalized anxiety disorder (GAD) and Panic (PD) in ETM, having as parameter the activation of gabaergic receptors (GABA_A) in that area of the hippocampus. Two experiments were conducted in rats: Experiment 1, to evaluate the effect of midazolam (10, 20 or 40nmol) – a benzodiazepine that potentiates the action of the GABA on GABA_A receptors; and Experiment 2 to evaluate the effect of 8-OH-DPAT (0.6, 3 or 15nmol) - an agonist of 5-HT_{1A} receptors. Animal control groups in both experiments were treated with saline. Ten minutes after microinjection, the animals were submitted for evaluation to the ETM latencies (in seconds) for avoidances and escapes. Immediately after, the animals were placed in the center of the arena to evaluation of motor activity (number of covered squares). The results showed that the highest dose of midazolam microinjected in the ventral hippocampus caused anxiolysis, evidenced by the decrease in latency of avoidances compared to controls and those treated animals 10nmol of the same drug. A similar result was observed at all three doses of 8-OH-DPAT. There was no change in the escapes, nor the motor activity of animals treated with any of the drugs tested. These behavioral evidence indicates that activation of 5-HT_{1A} receptors in VH decreases the behavior of avoidance of the animals without affecting the escape response, similar to what was observed due to the action of midazolam on the GABA_A receptors. These results indicate an involvement of these receptors in the regulation of GAD, but not of PD.

Keywords: Ventral Hippocampus, Elevated T Maze, Midazolam, 8-OH-DPAT, Generalized Anxiety Disorder, Panic Disorder, GABA_A, 5-HT_{1A}.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: Amígdala baso-lateral

Ami: Amígdala

ANOVA: Análise de variância

BNDF: Brain-derived neurotrophic factor, ou fator neurotrófico derivado do cérebro

CA: *Cornus Ammonus*

cAMP: Adenilato monofosfato cíclico

CAPES: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior

CC: Condicionamento contextual

CE: Teste claro-escuro

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CPF: Córtex pré-frontal

CPFm: Córtex pré-frontal medial

CRF: Fator de liberação de corticotropina

DA: Ratos Dark Agouti

EAC: Teste de estímulo aversivo de choque

EP: Teste de esquiva passiva

ETM: Elevated T maze

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GAD: Generalized anxiety disorder

GD: Giro denteado

HD: Hipocampo dorsal

HM: Hipotálamo medial

HV: Hipocampo ventral

IAF: Inibidor de acetilcolinesterase fisostigmina

IS: Teste de interação social

LCE: Labirinto em cruz elevado

LE: Ratos Long Evans

LH: Ratos Lister Hooded

LTE: Labirinto em T elevado

MCPD: Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MK-212: 6-chloro-2(1-piperaziny)pyrazine

NDR: Núcleo dorsal da rafe

NLET: Núcleo leito da estria terminal
NMDA: N-methyl-D-aspartate
NMR: Núcleo mediano da rafe
PD: Panic disorder
PVPI: Polivinilpirrolidona-iodo, 1%
SD: Rato Spragle-Dawley
S-Hip: Sistema septo-hipocampal
SNC: Sistema nervoso central
SW: Camundongos Swiss-Webster
TAG: Transtorno de ansiedade generalizada
TERSC: Teste de enterramento em reação à sonda de choque
TFMPP: Trifluoromethyl-phenylpiperazine
TP: Transtorno do pânico
VH: Ventral hippocampus
VU: Teste de vocalização ultrassônica
Way 100635: N-[2-methoxyphenyl]-1-piperazinyl-ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamine
5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-MeODMT: 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine
8-OH-DPAT: 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERÊNCIAS	26
RESEARCH REPORT.....	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1. Introdução	42
2. Métodos	45
2.1. Animais	46
2.2. Equipamentos	46
2.2.1. Labirinto em T Elevado (LTE)	46
2.2.2. Arena	47
2.2.3. Caixa de transporte individual	47
2.2.4. Cânulas-guia e agulhas para microinjeção	47
2.3. Drogas	48
2.3.1. Midazolam	48
2.3.2. 8-OH-DPAT	48
2.4. Procedimentos	48
2.4.1. Cirurgia estereotáxica	48
2.4.2. Habituação dos animais ao pesquisador	49
2.4.3. Exposição prévia ao braço aberto do LTE (confinamento prévio) ..	49
2.4.4. Microinjeção de drogas no hipocampo ventral	50
2.5. Testes comportamentais	50
2.5.1. Avaliação no LTE	51
2.5.2. Avaliação na arena	51
2.6. Perfusão e identificação dos sítios de microinjeção	51
2.7. Análise dos dados	52
3. Resultados	53
3.1. Experimento 1 – Análise do efeito do midazolam microinjetado no HV ...	54
3.2. Experimento 2 – Análise do efeito do 8-OH-DPAT microinjetado no HV .	57
4. Discussão	60
5. Conclusões	68

6. Agradecimentos	68
7. Referências	68
8. Anexo I	83
9. Anexo II	97

1. INTRODUÇÃO

Diante da marcante explosão tecnológica a necessidade de agilidade e de alto desempenho implicam em grande competitividade e aumentam a pressão psicológica sobre os indivíduos. Como consequência, os transtornos psiquiátricos, que afligem aproximadamente 450 milhões de pessoas mundialmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001), passam a ter destaque, causando grande preocupação no que tange à promoção da saúde. Dentre eles, a ansiedade merece destaque, pois além de afetar a qualidade de vida dos indivíduos no seu cotidiano, também os predispõe à manifestação da depressão e de outras afecções orgânicas. A prevalência de ansiedade alcança 31,2% da população geral, considerando todo o período de vida das pessoas, mas principalmente entre 30 e 44 anos, quando chega a 37% (NATIONAL COMORBIDITY SURVEY REPLICATION – NCR-S, 2007). Ademais, os transtornos relacionados à ansiedade afetam mais mulheres que homens (ANGST; DOBLER-MIKOLA, 1985; BRUCE et al., 2005; DONNER; LOWRY, 2013; REGIER; NARROW; ERA, 1990).

Sabe-se que a ansiedade é imprescindível para a sobrevivência (GRAEFF, 2012, 2014). No entanto, a ansiedade patológica, prejudica o desempenho e afeta a qualidade de vida, culminando no elevado consumo de drogas ansiolíticas. A ansiedade pode ser compreendida como um estado emocional que envolve subjetividade, dificultando sua compreensão teórica. Segundo Graeff (2012, 2014), é uma emoção que apresenta similaridades com o medo. Entretanto, este está mais atrelado a ameaças reais, enquanto que a ansiedade, a sinalizadores potenciais do perigo. 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, seja por trazer à tona estímulos do perigo vivenciados alguma vez no passado ou por um contexto novo. Para o seu desencadeamento, é necessário um impulso que se aproxima do estímulo do perigo, gerando um conflito de aproximação e evasão (ZANGROSSI; GRAEFF, 2012). Assim, a ansiedade é considerada patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um motivo específico ou real para o seu aparecimento, ou ainda, quando se trata de uma resposta inadequada à determinada ameaça, em virtude de sua intensidade ou duração (CORREIA; LINHARES, 2007).

Dentre os vários subtipos descritos de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013), de particular interesse no presente estudo são os transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e do pânico (TP). O TAG é caracterizado por preocupação e tensão contínuas sobre eventos cotidianos, de maneira incontrolável e com longa duração, tendo sua incidência e intensidade ocorrendo desproporcionalmente à probabilidade atual ou ao impacto da experiência. É frequentemente acompanhada por sintomas psíquicos como irritabilidade, déficit de atenção e concentração, ou somáticos como fadiga, tensão muscular e sono debilitado, o que torna difícil um diagnóstico preciso (BERGER et al., 2011; HETEM, 2012; KESSLER; KELLER; WITTCHEN, 2001; SANDERSON; BARLOW, 1990; WITTCHEN, 2002). Por outro lado, o TP caracteriza-se pela recorrência de ataques inesperados de pânico, nos quais o indivíduo se sente persistentemente preocupado, podendo ou não ser acompanhado de agorafobia, que é a ansiedade ou esquiva a locais ou situações em que poderia ser difícil ou embaraçoso escapar, ou para as quais pode não estar disponível um auxílio, no caso de ter um ataque de pânico. É caracterizado na ocorrência de ao menos quatro dentre os seguintes sintomas: taquicardia, sudorese, tremores, sensação de sufocamento, dores no peito, náuseas, tontura, calafrios, formigamentos ou coceiras na pele, medo de “perder o controle” e medo de morrer (adaptado de: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION'S - DSM-V, 2013). Os ataques costumam ser repetidos, intensos, com repentina ativação do sistema nervoso simpático, provocando sudorese, taquicardia e tremores (DEL-BEM; UCHIDA, 2012).

Dentre as várias abordagens de estudo sobre a ansiedade, a neurobiologia, um campo da neurociência, procura conhecer quais substratos neurais estão envolvidos na gênese desses transtornos, obviamente visando a proposição de medidas profiláticas e terapêuticas eficazes, já que a ansiedade ainda se constitui em grande desafio para a humanidade, conforme já mencionado. Em 1991, Deakin e Graeff propuseram uma hipótese na qual sugeriram que o sistema nervoso central possui mais de um mecanismo de controle sobre a ansiedade, e que estes são diferentemente modulados pela neurotransmissão serotoninérgica. De acordo com esses autores, a via prosencefálica que se origina no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) e se projeta para a amígdala, córtex frontal e hipocampo ventral, facilitaria os comportamentos defensivos expressos em resposta aos perigos potencial ou distal, por exemplo, a esquiva inibitória. Por outro lado, a via NDR-periventricular, com

projeções para a Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPD), inibiria reações de fuga e luta em resposta ao perigo proximal. A Figura 1 ilustra essa hipótese. Outros autores também descreveram que a liberação de serotonina (5-HT) no hipocampo é proveniente dos núcleos da rafe (SCHIMITZ et al., 1998; SEGAL, 1990).

O mau funcionamento dos sistemas serotoninérgicos nessas vias levaria a distúrbios específicos de ansiedade. Assim, a disfunção da via NDR/amígdala/córtex/hipocampo ventral ocasionaria a manifestação do TAG e a disfunção da via NDR/MCPD ocasionaria a manifestação do TP. Subtipos celulares em regiões distintas do NDR seriam as responsáveis por essa dupla atuação (HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; PAUL; LOWRY, 2013; SPIACCI, 2012; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). De acordo com Spiacci (2012), corroborando estudos anteriores e evidenciando novos achados (GRAHN et al., 1999; PAUL et al., 2011; STAUB; EVANS; LOWRY, 2006), neurônios serotoninérgicos nos subnúcleos caudal, dorsal e interfascicular do NDR estariam envolvidos com comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto que células não serotoninérgicas das asas laterais do NDR e da região ventro-lateral da MCPD estariam ligadas a comportamentos de pânico, já que esta região é a principal fonte de projeção serotoninérgica inibitória a estruturas relacionadas ao pânico (HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012), e neurônios do subnúcleo dorsomedial do NDR participaria da regulação de comportamentos defensivos relacionados a ambos os transtornos (SPIACCI et al., 2015).

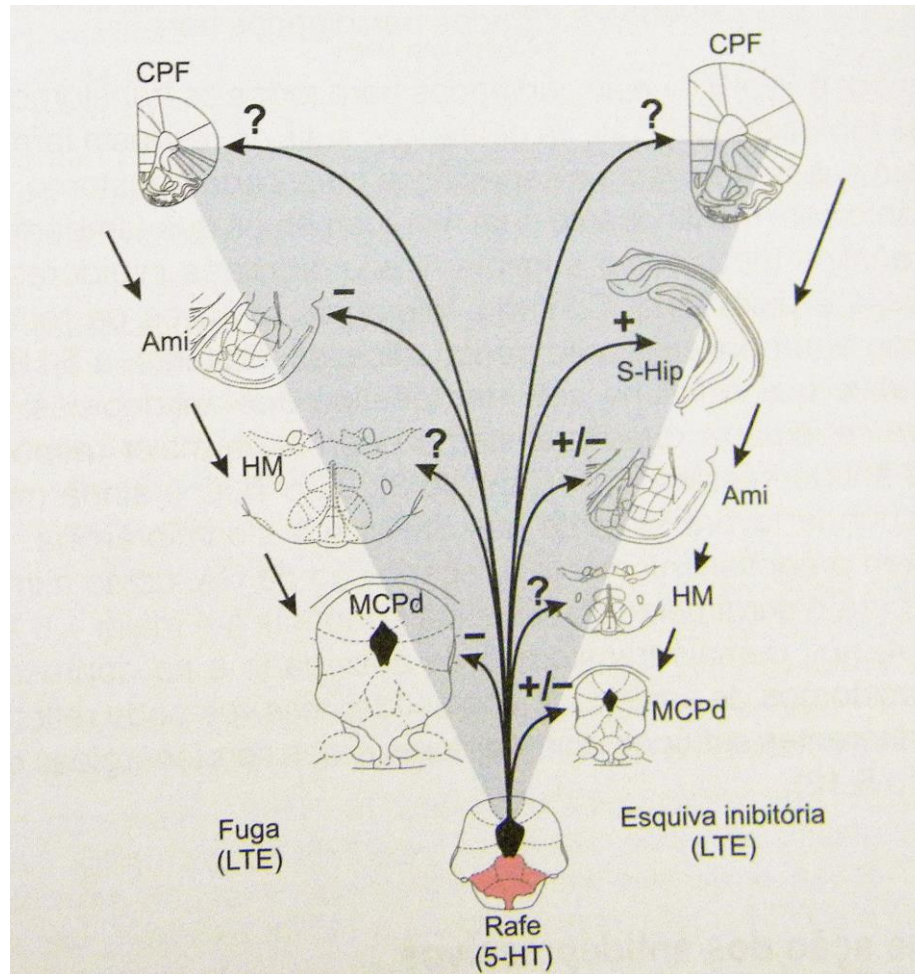


Figura 1: Hipótese proposta por Deakin e Graeff (1991) ressaltando as duas vias de controle do Sistema Nervoso Central sobre a ansiedade (adaptado de BRANDÃO; GRAEFF, 2014). TAG: transtorno de ansiedade generalizada; CPF: córtex pré-frontal; Ami: amígdala; S-Hip: sistema septo-hipocampal; HM: hipotálamo medial; MCPd: matéria cinzenta periaquedutal dorsal; LTE: labirinto em T elevado; 5-HT: serotonina.

Alguns estudos têm buscado testar estas duas possibilidades, no entanto, em grande parte deles os modelos experimentais utilizados não permitem a discriminação entre os dois subtipos de ansiedade. Avaliações realizadas através do Labirinto em T Elevado (LTE) possibilitam esta análise separadamente, pois as esquivas inibitórias e as fugas têm sido associadas, respectivamente, aos comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico (GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI, 1998; GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

Recentemente, muitas investigações utilizando esse modelo tem sido mais direcionadas à compreensão da via que se projeta para a MCPd (Graeff, 2004). Não

obstante existam pesquisas que já demonstraram o papel do Hipocampo Ventral na ansiedade (BALLESTEROS et al., 2014; BANNERMAN et al., 2002, 2003; CHUDASAMA; WRIGHT; MURRAY, 2008; FILE; GONZALEZ, 1996; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2002; KJELSTRUP et al., 2002; MCHUGH et al., 2004; PENTKOWSKI et al., 2006; TRENT; MENARD, 2010; TRIVEDI; COOVER, 2004; TU et al., 2014; ZHANG et al., 2014), ainda não foram identificados estudos que tenham utilizado o LTE com o objetivo de avaliar o papel funcional desta sub-região do Hipocampo na manifestação do TAG e do TP. Para uma revisão, efeitos de manipulações experimentais no HV sobre comportamentos de defesa associados à ansiedade são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Intervenções no Hipocampo Ventral e análise da manifestação da ansiedade em diferentes testes de comportamento animal

Intervenção Experimental	Teste	Espécie/linhagem	Ansiedade	Referências
Inativação do HV				
Lesão eletrolítica	Cond contextual	SD	-	TRIVEDI; COOVER, 2004
	LTE	SD	-	TRIVEDI; COOVER, 2004
	Odor de gato	SD	-	TRIVEDI; COOVER, 2004
	Presença do gato	SD	0	TRIVEDI; COOVER, 2004
Lesão neurotóxica (Ác. Ibotênico) (NMDA)	LCE	LE	-	KJELSTRUP et al., 2002;
		LE	-	PENTKOWSKI et al., 2006
	Claro-escuro	DA	-	BANNERMAN et al., 2003;
		LH	-	MCHUGH et al., 2004
	Interação-social	LH	-	MCHUGH et al., 2004
	Cond contextual	LE	-	PENTKOWSKI et al., 2006
	LCE	LE	-	TRENT; MENARD, 2010;
				NASCIMENTO HÄCKL;
				CAROBREZ, 2007
IAF	LCE	SP	-	DEGROOT; TREIT, 2002
Muscimol	Cond contextual	Wistar	-	ZHANG et al., 2014
	LCE	Wistar	-	ZHANG et al., 2014
Lidocaína	LCE	Wistar	-	BERTOGLIO; JOCA; GUIMARAES, 2006
Tetrotoxina	LCE	SP	-	DEGROOT; TREIT, 2004
Tertatolol WAY 100635	LCE	LH	-	FILE; GONZALEZ, 1996
	LCE	SW	-	NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002
Ativação do HV				
Estimulação Elétrica	LCE	LE	0	DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008
CRF	LCE	SD	+	KAGAMIISHI; YAMAMOTO; WATANABE, 2003

+ aumento; - diminuição; 0 inalterado

LCE (Labirinto em Cruz Elevado); NMDA (N-methyl-D-aspartate); 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina); CRF (Fator de Liberação de Corticotropina); IAF (Inibidor de Acetilcolinesterase Fisostigmina); SP (Ratos Sprague-Dawley); LE (Ratos Long Evans); DA (Ratos Dark Agouti); LH (Ratos Lister Hooded), SW (Camundongos Swiss-Webster).

Anatomicamente, o hipocampo humano pode ser descrito como uma pequena estrutura alongada e curva, bilateral e situada em profundidade no centro do cérebro, na base do lobo temporal medial, junto a diversas associações nervosas (BRANDÃO et al., 2001). As duas massas hipocampais são conectadas pelas comissuras hipocampais ventral e dorsal, na linha mediana (O'KEEFE; NADEL, 1978). A composição estrutural do hipocampo possui considerável semelhança entre as diversas espécies de mamíferos, desde os mais basais até os mais complexos (WEST, 1990). Em roedores, o hipocampo pode, para fins descritivos, ser dividido em uma porção dorsal, localizada logo posteriormente ao septo, e uma porção ventral, situada na região temporal do cérebro (O'KEEFE; NADEL, 1978). A localização do hipocampo no encéfalo humano está ilustrada na Figura 2 e a localização da mesma estrutura no rato está ilustrada na Figura 3.

O hipocampo é subdividido em quatro sub-regiões. Três são denominadas CA1, CA2 e CA3 devido ao seu nome em latim, *cornus Ammonus*, e são compostas principalmente por corpos celulares de neurônios piramidais. A quarta sub-região é denominada Giro Denteado (ou Giro Dentado, GD). CA3 é adjacente ao GD, enquanto que CA1 é adjacente ao subiculum (FINK, 2007). Neurônios de CA1 do HV tem projeções para o subiculum e córtex entorrinal, estruturas adjacentes ao hipocampo, mas também possuem projeções adicionais para amígdala, nucleus accumbens e córtex pré-frontal medial (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010 e 2011; CENQUIZCA; SWANSON, 2007; TYE et al., 2011).

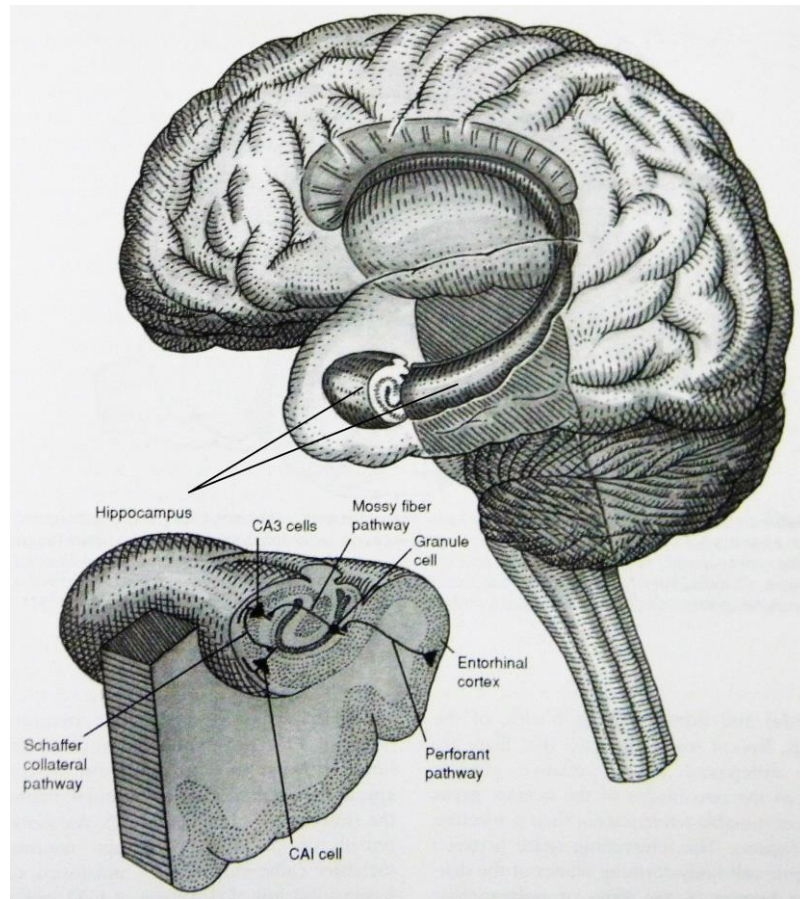


Figura 2 – Relativa localização do hipocampo no encéfalo humano. É enfatizado um corte transversal mostrando, entre outras estruturas, as sub-regiões do hipocampo CA1 e CA3 (Adaptado de SQUIRE; KANDEL, 2000).

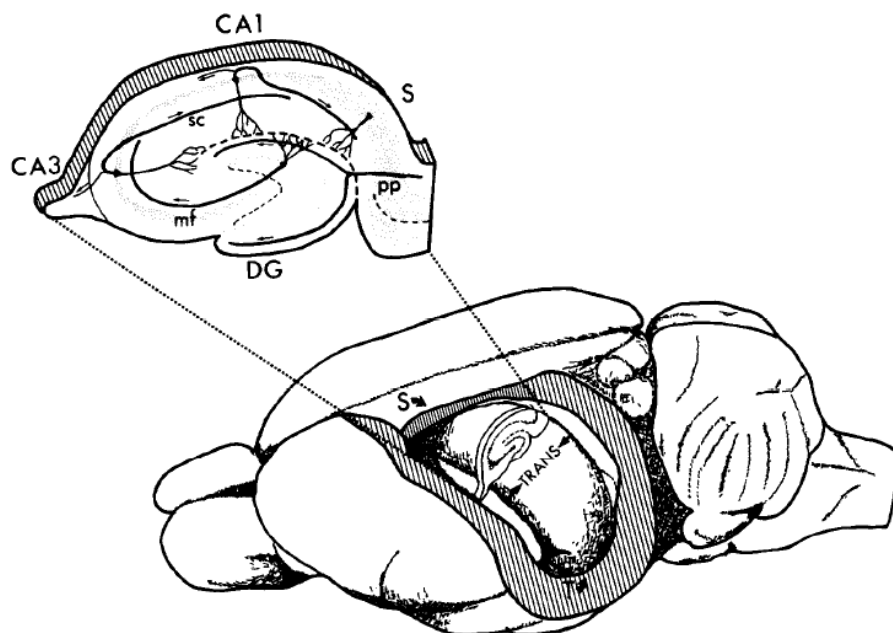


Figura 3 – Relativa localização do hipocampo no encéfalo do rato. São enfatizadas as sub-regiões CA1, CA3 e Giro Denteado (GD) (Adaptado de AMARAL; WITTER, 1989).

Quanto ao funcionamento dessa estrutura cerebral, já é conhecida a distinção entre as subregiões dorsal e ventral do hipocampo (FANSELOW; DONG, 2010; MOSER; MOSER, 1998). O hipocampo dorsal (HD) possui participação principal na criação e consolidação de memória espacial, mas também na ansiedade (ANDRADE; ZANGROSSI; GRAEFF, 2013), enquanto que o HV participa preferencialmente na modulação de comportamentos de ansiedade (ALVES, et al., 2005; BANNERMAN et al., 2003; BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2010; MCHUGH et al., 2004; MOSER; MOSER, 1998; SAHAY; HEN, 2007; SAMUELS; HEN, 2011; TU et al., 2014; WEEDEN et al., 2015), hipótese corroborada por outros estudos com lesões (KJELSTRUP et al., 2002; MCHUGH et al., 2004; MOSER et al., 1995; MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993). A pesquisa conduzida por Adams, Kusljic e Van Den Buuse (2008) concluiu que a depleção de 5-HT no HV leva à desregulação de comportamentos de ansiedade, sem, contudo, afetar a memória espacial. Ciochi et al. (2015) encontrou grande quantidade de neurônios em CA1 no HV relacionados à modulação de comportamentos de ansiedade, contra uma quantidade bem menor no HD de neurônios com a mesma atuação. Lesões neurotóxicas no GD no HV provocou ansiólise no LCE e na arena, resultado não apresentado por animais que sofreram lesão semelhante no GD do HD (WEEDEN et al., 2015).

Já está bem descrita na literatura a participação, em todo o hipocampo, dos neurotransmissores glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA) (KNOWLES, 1992; SANDLER; SMITH, 1991; SIRVIO et al., 1996; WALKER; RUIZ; KULLMANN, 2002). Outros sistemas de neurotransmissão também já foram descritos, incluindo a noradrenalina, a partir do *locus coeruleus*, a acetilcolina, advinda dos núcleos septais e a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), proveniente dos núcleos da rafe, especialmente do NDR (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999; VERTES, 1991; ENGIN; TREIT, 2008; VIZI; KISS, 1998).

Os receptores gabaérgicos GABA_A são ionotrópicos, ou seja, possuem um poro entre suas subunidades que se abre quando sob ação do neurotransmissor. Uma vez aberto, o canal permite maior influxo de íons cloreto (Cl⁻), estabelecendo um gradiente eletroquímico, hiperpolarizando o neurônio num efeito tipicamente inibitório (OLSEN; DELOREY, 1999). Entre suas subunidades há um sítio de ligação alostérico para benzodiazepinas, que, uma vez ligadas, causam maior frequência na abertura dos canais de cloro (HANSON; CZAJKOWSKI, 2008; TWYMAN; ROGERS; MACDONALD, 1989). Existe uma ampla distribuição de receptores GABA_A e de suas

diferentes subunidades no Hipocampo como um todo (LEE; MAGUIRE, 2014; MCEOWN; TREIT, 2013; MCKERNAN; WHITING, 1996; PIRKER et al., 2000; SPERK et al., 1997; YU et al., 2006), sendo que no hipocampo ventral existe uma maior expressão das subunidades $\alpha 2/\beta 1/\gamma 2$ (SARANTIS et al., 2008; SOTIRIOU; PAPTAEODOROPOULOS; ANGELATOU, 2005). Além de propiciar os efeitos inibitórios do GABA endógeno, receptores GABA_A medeiam os efeitos ansiolíticos de um grande número de compostos terapêuticos (BORMANN, 2000; MCEOWN; TREIT, 2013). O midazolam, um benzodiazepínico que age sobre os sítios alostéricos para benzodiazepinas desses receptores, tem sido utilizado em estudos experimentais visando a inibição neuronal (GEORGOPOULOS et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2005).

Acredita-se que os neurotransmissores monoaminérgicos tenham um papel fundamental na fisiopatologia da ansiedade, até porque são sintetizados e liberados em decorrência da exposição a estressores, um dos fatores relacionados com a gênese da ansiedade (SAKURAI-YAMASHITA et al., 1989; VAHABZADEH; FILLENZ, 1994; YOSHIOKA et al., 1995), já que tanto o estresse físico como o psicológico são capazes de provocar o aumento da liberação de serotonina em regiões límbicas, incluindo o hipocampo ventral (KAGAMIISHI; YAMAMOTO; WATANABE, 2003).

Sabe-se que a maior densidade de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos encontra-se nos núcleos da rafe, cujos axônios são direcionados praticamente para todo o cérebro, especialmente para o hipocampo, dentre todas as demais regiões do conhecido sistema límbico. Em todo o sistema serotoninérgico há expressão de receptores serotoninérgicos, com destaque à alta densidade de receptores da família 5-HT₁, especialmente o subtipo 5-HT_{1A}. Estes receptores são metabotrópicos, ou seja, desencadeiam as respostas através de mecanismos intracelulares. Estão ligados à proteína G específica (G_{α1/α0}) e, ao serem conectados ao 5-HT₁, alteram sua conformação estrutural, inibindo a formação de adenilato monofosfato cíclico (cAMP) pela adenilato ciclase. Uma cascata de reações é conduzida de modo a produzir a resposta adequada (BERUMEN et al., 2012).

Os receptores 5-HT_{1A} são encontrados tanto pré-sinápticamente nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, quanto pós-sinápticamente, predominantemente em estruturas límbicas como o hipocampo, o septo e a amígdala, mas também no neocórtex e hipotálamo (HAMON, 1997; BARNES; SHARP, 1999). A ativação de receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos resulta na

inibição do disparo celular e em um consequente declínio da neurotransmissão serotonérgica nas áreas de projeção (HJORTH; MAGNUSSON, 1988; SHARP; HJORTH, 1990; SPROUSE; AGHAJANIAN, 1988). Já a ativação de receptores pós-sinápticos resulta na inibição neuronal de partes selecionadas do sistema límbico. Devido a esta distribuição particular, os receptores 5-HT_{1A} oferecem a possibilidade de controlar a transmissão serotonérgica de uma maneira geral e a atividade neuronal no sistema límbico.

Especialmente no hipocampo, alguns estudos demonstraram que agonistas de receptores 5-HT_{1A} suprimiam a ativação neuronal serotonérgica e diminuíram a liberação de 5-HT nos terminais (KAGAMIISHI; YAMAMOTO; WATANABE, 2003). Esta família de receptores se mostrou interessante em particular devido a estarem envolvidos na regulação de comportamento emocional e afetivo e, possivelmente, no mecanismo de ação de tratamentos de ansiedade (SCHREIBER; DE VRY, 1993).

Os núcleos mediano e dorsal da rafe (NMR e NDR, respectivamente) enviam projeções serotonérgicas para áreas cerebrais envolvidas na regulação de comportamentos defensivos. A maioria das projeções serotonérgicas se origina no NDR (cerca de 80%), sendo o restante originário do NMR (DESCARRIES et al., 1982). As projeções serotonérgicas que alcançam o HD são principalmente provenientes do NMR, ao passo que amígdala, matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) e HV recebem projeções provenientes do NDR, muito embora existam descrições a respeito de fibras provenientes do núcleo mediano da rafe que chegam ao HV (MCKENNA; VERTES, 2001).

Manipulações experimentais ativando ou inibindo a atividade neuronal no NDR e NMR, e no hipocampo foram apresentadas na revisão conduzida por Andrade, Zangrossi e Graeff (2013). Lesões seletivas de neurônios do NDR com 5,7-DHT prejudicaram a esquivas inibitória e, simultaneamente, facilitaram a fuga, isto é, apresentaram efeitos ansiolítico e panicogênico (SENA et al., 2003). Quando o mesmo foi repetido no NMR, o prejuízo das esquivas também foi observado, sem, contudo, afetar as fugas (ANDRADE et al., 2004). Os mesmos efeitos foram observados na administração de 8-OH-DPAT (DOS SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI, 2005; VICENTE et al., 2008). Nesse caso, a inativação de neurônios serotonérgicos do NMR e NDR foi conduzida através da estimulação de receptores 5-HT_{1A} inibitórios localizados no corpo celular e nos dendritos destas células, resultando na inibição do disparo neuronal e na redução da liberação de serotonina nas terminações sinápticas.

Entretanto, quando se utilizou antagonista de receptores 5-HT_{1A} no NMR em doses mais altas constatou-se o aumento de comportamentos de esquia inibitória no LTE e, conseqüentemente, o efeito ansiogênico, sem interferência nas fugas (Dos Santos et al., 2008). A ativação de neurônios serotoninérgicos no NMR pelo bloqueio da ação da serotonina sobre receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos ocasionou provavelmente o aumento da liberação de 5-HT no HD causando aumento das esquivas. Injetando diretamente 8-OH-DPAT no HD observou-se o mesmo resultado, o que foi sugerido por esses pesquisadores que a 5-HT no HD causaria aumento das esquivas por agir sobre receptores 5-HT_{1A} nessa região. Outras pesquisas foram conduzidas visando compreender o papel da serotonina no HD e as mesmas foram listadas na Tabela 2. Todavia percebe-se também em relação a esta estrutura nenhum resultado ou efeitos paradoxais ao encontrado através do labirinto em T elevado.

Tabela 2 - Intervenções no Hipocampo Dorsal e análise da manifestação da ansiedade em diferentes testes de comportamento animal

Intervenção Experimental	Teste	Ansiedade	Referências
Estimulação elétrica	LCE TERSC	- -	DRINGENBERG et al., 2008 DRINGENBERG et al., 2008
Zimelidina (inibidor da recaptação da 5-HT) (20 e 100nmol)	LCE	0 +	GUIMARÃES et al., 1993* PADOVAN; GUIMARÃES, 1993
BNDF (200pg) (facilitação do GABA)	LTE CE	+ +	CASAROTTO et al., 2012 CASAROTTO et al., 2012
Lesão eletrolítica	LTE CC	0 - 0	TRIVEDI; COOVER, 2004 MAREN et al., 1997 TRIVEDI; COOVER, 2004
Tetrodotoxina (5mg) (neurotoxina)	LCE TERSC	0 -	DEGROOT; TREIT, 2004 DEGROOT; TREIT, 2004
Lidocaína (2%) (bloqueia canais de Sódio)	LCE	0	BERTOGLIO et al., 2006
Agonista de receptores 5-HT			
5-MeODMT (20nmol)	LCE	0 -	MENDONÇA-NETTO; GUIMARÃES, 1996 MENDONÇA-NETTO; GUIMARÃES, 1996*
Agonista de receptores 5-HT_{1A} – 8-OH-DPAT			
3 e 15 nmol	LTE	+	DOS SANTOS et al., 2008
0,1 µg e 5 µg/100 ng	LCE TERSC EAC CE	+ - 0 0 +	CHEETA et al., 2000; FILE; GONZALEZ, 1996 MENARD; Treit 1998 MENARD; Treit 1998 MENARD; Treit 1998 ROMANIUK et al., 2001
0,05, 0,1 e 0,2 µg/3 nmol	LCE IS	0 0	BELCHEVEA et al., 1994; FILE; GONZALEZ, 1996 GUIMARÃES et al., 1993*
1 nmol	CC	-	ALMADA et al., 2009
1-5 µg, 10 µg	VU	-	SCHREIBER; DeVry 1993; JOLAS et al., 1995
50 ng	IS Geller-Seifter EP	0 0 -	PICAZO et al., 1995 CERVO et al., 2000 CARLI et al., 1993
100 ng	IS	+	ANDREWS et al., 1994; CHEETA et al., 2000; FILE; GONZALEZ, 1996
Outros agonistas (parciais) de receptores 5-HT_{1A}			
Tandospirona (30ug,60ug)	Vogel	-	KATAOKA et al., 1991
Buspirona (2,5 µg) (15-30 µg)	LCE VU	- -	KOSTOWSKI et al., 1989 SCHREIBER; DEVRY 1993
Ipsapirona (0,1 µg) (40 µg, 10-20 µg)	LCE VU	0 -	PICAZO et al., (1995) SCHREIBER; DEVRY 1993; JOLAS et al., 1995
Outros antagonistas de receptores 5-HT_{1A}			
WAY-100635 (0,18, 0,37 e 0,74 nmol)	LTE	0	DOS SANTOS et al., 2008
Tertatolol (3 µg)	LCE IS	+ 0 +	ANDREWS et al., 1994 FILE; GONZALEZ, 1996 ANDREWS et al., 1994
Agonista de receptores 5-HT_{1C}			
MK-212 (1 µg, 0,3 µg)	LCE	0	ALVES et al. (2004)
Agonistas e antagonistas de receptores Gabaérgicos			
Inibidor de recaptação FrPbAII (174 Da) (EC50=0,09 µg) (EC50=0,03 µg)	LCE CE	- -	LIBERATO et al. (2006) LIBERATO et al. (2006)
Agonista de receptor GABA _A – Muscimol (0,05 µg, 0,25 µg, 0,5 µg)	LCE	-	REZAYAT et al. (2005)
Antagonista de receptor GABA _A – Bicucullina (0,5 µg, 1 µg, 2 µg)	LCE	0	REZAYAT et al. (2005)
Agonistas e antagonistas de receptores Benzodiazepínicos			
Midazolam (1 µg, 2 µg)/agonista	LCE IS	- -	GONZALEZ et al. (1998) GONZALEZ et al. (1998)
Midazolam (10 µg)	LCE TERSC EAC	- 0 0	MENARD; TREIT (2001) MENARD; TREIT (2001) MENARD; TREIT (2001)
Flumazenil (100 ng, 500 ng)/antagonista	LCE IS	0 0	GONZALEZ et al. (1998) GONZALEZ et al. (1998)

+ aumento; - diminuição; 0 inalterado

LTE (Labirinto em T elevado); LCE (Labirinto em cruz elevado); CE (Claro-escuro); CC (Condicionamento Contextual); TERSC (Teste de enterramento em reação à sonda de choque); EAC (Estímulo Aversivo de choque); VU (Vocalização Ultrassônica); IS (Interação Social); EP (Esquiva Passiva); BDNF (Brain-derived neurotrophic factor, ou fator neurotrófico derivado do cérebro); 5-MeODMT (5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine); Way 100635: N-[2-methoxyphenyl]-1-piperazinyl-ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamina; 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina); *drogas revertem o efeito de restrição prévia de 2 horas.

Considerando que estudos discriminativos envolvendo esquivas e fugas ainda não foram conduzidos no HV, pergunta-se: será que a ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} no HV teriam papel inibitório similar ao efeito do midazolam sobre receptores gabaérgicos em relação à manifestação de comportamentos em testes de ansiedade? Será que o HV, uma das principais projeções do NDR teria papel modulatório sobre o TAG? Caso se confirme esta possibilidade, seriam os receptores gabaérgicos (GABA_A) e serotoninérgicos (5-HT_{1A}) partícipes desse efeito? O estudo sequencialmente apresentado teve por objetivo responder a tais questionamentos.

Considerando o pressuposto teórico apresentado por Deakin e Graeff (1991) (1991), fundamentando-se no fato de que o HV recebe uma grande densidade de projeções serotoninérgicas ascendentes (BANNERMAN et al., 2003; CARABELLI et al., 2015) e tendo como base achados que apontam que a expressão das emoções estaria mais relacionada com a parte ventral do hipocampo (BANNERMAN et al., 2004; KJELSTRUP et al., 2002; MCHUGH et al., 2004), especialmente em respostas que envolvem o condicionamento, formula-se a hipótese que o HV exerceria um papel sobre a modulação das esquivas inibitórias no LTE e que, portanto, poderia estar mais relacionado à manifestação do TAG. Já se conhece que o hipocampo ventral também possui papel no processamento e retenção da informação espacial e na consolidação da memória (KJELSTRUP et al., 2008), embora o HD seja mais reconhecido por essas funções (BRANDÃO, 2012; BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004; EICHENBAUM; OTTO; COHEN, 1992; EKSTROM et al., 2003; O'KEEFE; NADEL, 1978).

Assim, esta investigação teve por objetivo avaliar o papel do hipocampo ventral na modulação do Transtorno de Ansiedade Generalizada e do Transtorno do Pânico e, mais especificamente, verificar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados nesta região pela administração de 8-OH-DPAT, um agonista desses receptores, tendo como parâmetro o efeito da microinjeção do midazolam, um benzodiazepínico com ação conhecida em receptores gabaérgicos (GABA_A), sobre a apresentação de esquivas e fugas no labirinto em T elevado.

2. REFERÊNCIAS

- ADAMS, W.; KUSLJIC, S.; VAN DEN BUUSE, M. Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 1048-1055, nov, 2008.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, v. 65, n. 2, p. 257-269, 28 jan, 2010.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. **Neuron**, v. 71, n. 5, p. 898-910, 8 set, 2011.
- ALMADA, R.C.; BORELLI, K.G.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M.L. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 2, p. 279-287, 2009.
- ALVES, S.H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. M. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 37-43, fev, 2004.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571-591, 1989.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013.
- ANDRADE, T.G.C.S.; MACEDO, C.E.A.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEF, F.G. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 55-60, 2004.
- ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. The median raphe nucleus revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1107-1115, 2013.
- ANDREWS, N.; HOGG, S.; GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. 5-Ht_{1a} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. **European Journal of Pharmacology**, v. 264, p. 259-64, 1994.

- ANGST, J.; DOBLER-MIKOLA, A. The Zurich Study: V. Anxiety and phobia in young adults. **European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences**, v. 235, n. 3, p. 171–178, 1985.
- BALLESTEROS, C.I.; GALVÃO, B.O.; MAISONETTE, S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Effect of dorsal and ventral hippocampal lesions on contextual fear conditioning and unconditioned defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e83342, 2014.
- BANNERMAN, D.M.; DEACON, R.M.J.; OFFEN, S.; FRISWELL, J.; GRUBB, M.; RAWLINS, J.N.P. Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, n. 5, p. 884–901, 2002.
- BANNERMAN, D.M.; GRUBB, M.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; FELDON, J.; RAWLINS, J.N.P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 139, p. 197–213, 2003.
- BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.J.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 273–283, 2004.
- BELCHEVA, I.; BELCHEVA, S.; PETKOV, V.V.; PETKOV, V.D. Hippocampal asymmetry in the behavioral responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. **Brain Research**, v. 640, p. 223–8, 1994.
- BARNES N.M.; SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function **Neuropharmacology** 38: 1083-1152, 1999.
- BERGER, A.; EDELSBERG, J.; BOLLU, V.; ALVIR, J.M.; DUGAR, A.; JOSHI, A.V.; OSTER, G. Healthcare utilization and costs in patients beginning pharmacotherapy for generalized anxiety disorder: a retrospective cohort study. **BMC Psychiatry**, v.11, p.193-201, 2011.
- BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.L.; GUIMARAES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 183–188, 2006.
- BERUMEN, L.C.; RODRÍGUEZ, A; MILEDI, R.; GARCÍA-ALCOCER, G. Serotonin Receptors in hippocampus. **The Scientific World Journal**, v.2012, 2012.
- BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v.39, p. 43-68, 1988.

- BORMANN, J. The “ABC” of GABA receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 16-19, 2000.
- BRANDÃO, M.L. Aprendizagem e memória. In: BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**. 3. ed. Sao Paulo: Atheneu, p. 74-102, 2012.
- BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. p. 1-25, 2001.
- BRANDÃO, M.L.; GRAEFF, F.G. **Neurobiologia dos transtornos mentais**. São Paulo: Atheneu, 2014.
- BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14515–14520, 2004.
- BRUCE, S.E.; YONKERS, K. A.; OTTO, M. W. EISEN, J. L.; WEISBERG, R. B.; PAGANO, M.; SHEA, M. T.; KELLER, M. B. Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: A 12-year prospective study. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, p. 1179–1187, 2005.
- CARABELLI, B.; DELATTRE, A.M.; PUDELL, C.; MORI, M.A.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R.B.; VENANCIO, D.P.; PIAZZETTA, S.R.; HAMMERSCHMIDT, I.; ZANATA, S.M.; LIMA, M.M.; ZANOVELI, J.M.; FERRAZ, A.C. The antidepressant-like effect of fish oil: possible role of ventral hippocampal 5-HT_{1A} post-synaptic receptor. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n.1, p. 206-15, aug, 2015.
- CARLI, M.; TATARCKZYNSKA, E.; CERVO, L.; SAMANIN, R. Stimulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptors causes amnesia and anxiolytic-like but not antidepressant-like effects in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 234, n. 2-3, p. 215-221, 1993.
- CASAROTTO, P.C.; BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI JR, H. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, p. 80-88, 2012.
- CENQUIZCA L.A; SWANSON, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, n. 1, p. 1-26, nov, 2007
- CERVO, L.; MOCAËR, E.; BERTAGLIA, A.; SAMANIN, R. Roles of 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe and dorsal hippocampus in anxiety assessed by the behavioral

- effects of 8-OH-DPAT and S 15535 in a modified Geller-Seifter conflict model. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 6, p. 1037-1043, 2000.
- CIOCCHI, S.; PASSECKER, J.; MALAGON-VINA, H.; MIKUS, N.; KLAUSBERGER, T. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. **Science**, v. 348, n. 6234, p. 560-563, 1 may, 2015.
- CHEETA, S.; KENNY, P.J.; FILE, S.E. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 24, n. 7, p. 1053-1067, 2000.
- CHUDASAMA, Y.; WRIGHT, K.S.; MURRAY, E.A. Hippocampal Lesions in Rhesus Monkeys Disrupt Emotional Responses but Not Reinforcer Devaluation Effects. **Biological Psychiatry**, v. 63, p. 1084–1091, 2008.
- CORREIA, L.L.; LINHARES, M.B.M. Maternal anxiety in the pre- and postnatal period: a literature review. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 677–683, 2007.
- DEL-BEN, C.M.; UCHIDA, R. Transtorno do Pânico. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p. 157-175, 2012.
- DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n.4, p. 305-315, 1991.
- DEGROOT, A.; TREIT, D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Brain Research**, v. 949, n. 1-2, p. 60–70, 13 set. 2002.
- DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, v. 1001, p. 60–71, 2004.
- DESCARRIES, L.; WATKINS, K.C.; GARCIA, S.; DEAUDET, A.; The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 207, n. 3, p. 239-54, 1982.
- DONNER, N.C.; LOWRY, C.A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **European Journal of Physiology**, v. 465, p. 601-626, 2013.
- DOS SANTOS, L., ANDRADE, T.G.C.S., ZANGROSSI JR., H. 5-HT_{1A} 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.

- DOS SANTOS, L.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI Jr., H. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. **Psychopharmacology** v. 179, p. 733–741, 2005.
- DRINGENBERG, H.C.; LEVINE, Y.; MENARD, J.L. Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 186, p. 143–147, 2008.
- EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N.J. The hippocampus-what does it do? **Behavioral and Neural Biology**, v. 57, p. 2–36, 1992.
- EKSTROM, A.; KAHANA, M.J.; CAPLAN, J.B.; FIELDS, T.A.; ISHAM, E.A.; NEWMAN, E.L.; FRIED, I. Cellular networks underlying human spatial navigation. **Nature**, v. 425, p. 184–187, 2003.
- ENGIN, E.; TREIT, D. Dissociation of the anxiolytic-like effects of Avpr1a and Avpr1b receptor antagonists in the dorsal and ventral hippocampus. **Neuropeptides**, v. 42, p. 411–421, 2008.
- FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures. **Neuron**, v. 65, p. 7–19, 2010.
- FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphé and ventral hippocampus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 123–128, 1996.
- FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**, 2. ed., v. 2. Oxford: Academic Press. 2007.
- GEORGOPOULOS, P.; PETRIDES, T.; KOSTOPOULOS G.; PAPATHEODOROPOULOS, C. Varying magnitude of GABAergic recurrent inhibition enhancement by different sedative/anesthetic agents in dorsal and ventral hippocampus. **Brain Research**, v. 1207, p. 43–59, 2008.
- GONZALEZ, L.E.; OUAGAZZAL, A.M.; FILE, S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p.3673–80, 1998.
- GRAEFF, F.G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237-246, 1998.
- GRAEFF, F.G. Medicamentos antiansiedade. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. p. 165-204, 2012.

- GRAEFF, F.G. Transtornos de ansiedade. In: BRANDÃO, M.L.; GRAEFF, F.G. **Neurobiologia dos transtornos mentais**. São Paulo: Atheneu, p.131-163, 2014.
- GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 67–70, 1993.
- GRAHN, R.E.; WILL, M.J.; HAMMACK, S.E.; MASWOOD, S.; MCQUEEN, M.B.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. **Brain Research**, v. 826, p.35–43, 1999.
- GRAY, J.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety**. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A.; PADOVAN, C.M.; MENDONÇA NETTO, S.; TITZE DE ALMEIDA, R. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 133-139, 1993.
- HALE, M.W.; SHEKHAR, A; LOWRY, C.A. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, p. 695-708, 2012.
- HAMON M. The main feature of central 5-HT_{1A} receptors. In: BAUMGARTEN, H.G.; GOTHER, M. (Eds.) Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. **Handbook of Experimental Pharmacology** v. 129, p. 239-268, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- HANSON, S.M.; CZAJKOWSKI, C. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 13, p. 3490-9, 26 mar 2008.
- HETEM, L.A.B. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p. 177-193, 2012.
- HJORTH, S.; MAGNUSSON, T. The 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. **Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology**, v. 338, n. 5, p. 463-71, Nov 1988.
- JOLAS, T.; SCHREIBER, R.; LAPORTE, A.M.; CHASTANET, M.; DEVRY, J.; GLASER, T.; ADRIEN, J.; HAMOM, M. Are postsynaptic 5-Ht1a receptors involved in the anxiolytic effects of 5-Ht1a receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, p.920–929, 1995.

- KAGAMIISHI, Y.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor. **Brain Research**, v. 991, n. 1-2, p. 212–221, 2003.
- KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; MIYAZAKI, A.; INOUE, Y.; TOMINAGA, K.; KOIZUMI, S.; UEKI, S.; NIWA, M. Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine_{1A} agonistic anxiolytic. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 5, p. 475-480, 1991.
- KESSLER, R.C.; KELLER, M.B.; WITTCHEN, H.U. The epidemiology of generalized anxiety disorder. The **Psychiatric Clinics of North America**, v. 24, p. 19–39, 2001.
- KJELSTRUP, K.B.; SOLSTAD, T.; BRUN, V.H.; HAFTING, T.; LEUTGEB, S.; WITTER, M.P.; MOSER, E.I.; MOSER, M.B. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, p. 140–143, 2008.
- KJELSTRUP, K.G. TUVNES, F.A.; STEFFENACH, H.-A.; MURISON, R.; MOSER, E.L.; MOSER, M.-B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 10825–10830, 2002.
- KNOWLES, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. **Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society**, v. 9, p. 252–263, 1992.
- KOBAYASHI, S.; FUJITO, Y.; MATSUYAMA, K.; AOKI, M. Synaptic Transmission Comparison of midazolam effects on inhibitory postsynaptic currents in hippocampal CA3 with those in CA1. **Euroreport**, v.16, n.9, p. 1003-1007, 2005.
- KOTWOSKI, W.; PLAZNIK, A.; STEFANSKI, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 168, p. 393–6, 1989.
- LEE, V.; MAGUIRE, J. The impact of tonic GABA_A receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, p. 3, 2014.
- LIBERATO, J.L.; CUNHA, A.O.S.; MORTARI, M.R.; GELFUSO, E.A.; BELEBONI, R.D.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAII, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (araneidae:Araneae). **Brain Research**, v. 1124, p.19–27, 2006.

- MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 88, p. 261-274, 1997.
- MCEOWN, K.; TREIT, D. GABA_A receptor sub-units in the ventral hippocampus and $\alpha 5$ GABA_A receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory. **Neuroscience**, v. 252, p. 169–77, 2013.
- MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; RAWLINS, J.N.P.; BANNERMAN, D.M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, p. 63–78, 2004.
- MCKENNA, J.T.; VERTES, R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 54, n.6, p. 619-630, 2001.
- MCKERNAN, R.M.; WHITING, P.J. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 4, p. 139-143, 1996.
- MENARD J.; TREIT D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. **Behavioural Pharmacology**, v. 9, p. 93–101, 1998.
- MENARD, J.; TREIT, D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. **Brain Research**, v. 888, p. 163–6, 2001.
- MENDONÇA NETTO S.; GUIMARÃES F.S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single experience. **Behavioural Brain Research**, v. 77, p. 215-218, 1996.
- MOSER, M.B.; MOSER, E.I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus** v. 8, p. 608–619, 1998.
- MOSER, E.; MOSER, M.B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 3916–3925, 1993.
- MOSER, M.B.; MOSER, E.I.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R.G. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** v. 92, p. 9697–9701, 1995.
- NASCIMENTO HÄCKL, L.P.; CAROBREZ, A.P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 2, p. 177–85, 2007.

- NATIONAL COMORBITY SURVEY REPLICATION (NCR-S). Lifetime prevalence of DSM-IV/WMH-CIDI disorders by sex and cohort. **National Comorbidity Survey**, 2007.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research**, v. 927, n. 1, p. 87–96, 2002.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, p. 570, 1978.
- OLSEN, R.W.; DELOREY, T.M. "Chapter 16: GABA and Glycine". In: Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Albers RW, Uhler MD. **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- PAUL, E.D.; HALE, M.W.; LUKKES, J.L.; VALENTINE, M.J.; SARCHET, D.M.; LOWRY, C.A. Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, v. 104, p.272–282, 2011.
- PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intra-hippocampal microinjection of zimelidine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 10, p. 1085-1089, 1993.
- PAUL, E.D; LOWRY, C.A. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1090-1106, 2013.
- PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R.J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2185–2196, 2006.
- PICAZO, O.; LOPEZ-RUBALCAVA, C.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. **Brain Research Bulletin**, v. 37, p. 169–75, 1995.
- PIRKER, S.; SCHWARZER, C.; WIESELTHALER A.; SIEGHART, W.; SPERK, G. GABA(A) receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. **Neuroscience**, v. 101, p. 815–850, 2000.
- POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI, H.; VIANA, M.B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, p. 185–192, 2003.

- REGIER, D. A.; NARROW, W. E.; RAE, D.S. The epidemiology of anxiety disorders: The Epidemiologic Catchment Area (ECA) experience. **Journal of Psychiatric Research**. v. 24, p. 3-14, 1990.
- REZAYAT, M.; ROOHBAKHSH, A.; ZARRINDAST, M.R.; MASSOUDI, R.; DJAHANGUIRI, B. Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 84, p. 775–82, 2005.
- ROMANIUK, A.; KOPROWSKA, M.; KROTEWICZ, M.; STRZELCZUK, M.; WIECZOREK, M. Effects of 8-OHDPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats, **Behavioural Brain Research**, v. 120, n. 1, p. 47-57, 2001.
- SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 1110–1115, 2007.
- SAKURAI-YAMASHITA, Y.; KATAOKA, Y.; YAMASHITA, K.; MIYAZAKI, A.; USHIO, M.; MINE, K.; NIWA, M.; UEKI, S. Conflict behavior and dynamics of monoamines of various brain nuclei in rats. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 10, p. 1067-73, Oct 1989.
- SAMUELS, B.A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders. **European Journal of Neuroscience** v. 33, p. 1152–1159, 2011.
- SANDERSON, W.C.; BARLOW, D.H. A description of patients diagnosed with DSM-III-R generalized anxiety disorder. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 178, p. 588–591, 1990.
- SANDLER, R.; SMITH, A.D. Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 2, p. 177–92, 1991.
- SARANTIS, K.; SOTIRIOU, E.; PAPTAEODORPOULOS C.; MATSOKIS, N.; ANGELATOU, F. Differential pharmacological properties of GABAA/benzodiazepine receptor complex in dorsal compared to ventral rat hippocampus. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 6, p. 1019–29, 2008.
- SEGAL, M. Serotonin and local circuits in rat hippocampus. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 1, p. 77–86, 1990.
- SCHMITZ, D.G.T.; EMPSON, R.M.; HEINEMANN, U. Comparison of the effects of serotonin in the hippocampus and the entorhinal cortex. **Molecular Neurobiology**, v. 17, p. 59–72, 1998.

- SCHREIBER, R.; DE VRY, J. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT ipsapirone and buspirone in the rat. **European Journal Of Pharmacology**, v. 249, n. 3, p. 341-51, Nov 16 1993.
- SENA, L.M.; BUENO, C.; , R.L.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI Jr., H.; VIANA, M.B.; The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 142, p. 125-133, 2003.
- SHARP, T.; HJORTH, S. Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT_{1A} autoreceptor. **Journal Of Neuroscience Methods**, v. 34, n. 1-3, p. 83-90, Sep 1990.
- SIRVIO, J.; LARSON, J.; QUACH, C.N.; ROGERS, G.A.; LYNCH, G. Effects of pharmacologically facilitating glutamatergic transmission in the trisynaptic intrahippocampal circuit. **Neuroscience**, v. 74, p. 1025–1035, 1996.
- SOTIRIOU, E.; PAPATHEODOROPOULOS, C.; ANGELATOU, F. Differential expression of gamma-aminobutyric acid--a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**, v. 82, n. 5, p. 690–700, 2005.
- SPERK, G.; SCHWARZER, C.; TSUNASHIMA, K.; FUCHS, K.; SIEGHART, W. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: Immunocytochemical distribution of 13 subunits. **Neuroscience**, v. 80, p. 987–1000, 1997.
- SPIACCI Jr, A.; COIMBRA, N.C.; ZANGROSSI Jr, H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. **Neuroscience**, v. 227, p. 350-360, 2012.
- SPIACCI Jr, A.; POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI Jr, H. 5-HT_{1A} receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. **Neuropharmacology**, xxx, p. 1-9, 2015.
- SPROUSE, J. S.; AGHAJANIAN, G. K. Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 707-15, Jul 1988.
- SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memory, from mind to molecules**. New York: Scientific American Library, 2000.
- STAUB, D.R.; EVANS, A.K.; LOWRY, C.A. Evidence supporting a role for corticotrophin-releasing factor type 2 (CRF₂) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. **Brain Research**, v.1070, p.77–89, 2006.

TRENT, N.L.; MENARD, J.L. The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats' open-arm exploration in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 101, p. 141–152, 2010.

TRIVEDI, M.A.; COOVER, G.D. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, p. 172–184, 2004.

TWYMAN, R.E.; ROGERS, C.J.; MACDONALD, R.L. Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. **Annals of Neurology**, v. 25, n. 3, p. 213-20, mar, 1989.

TYE, K.M.; PRAKASH, R.; KIM, S.Y.; FENNO, L.E.; GROSENICK, L.; ZARABI, H.; THOMPSON, K.R.; GRADINARU, V.; RAMAKRISHMAN, C.; DEISSEROTH, K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 474, n. 7338, p. 358-362, 17 mar, 2011.

TU, W., COOK, A., SCHOLL, J.L., MEARS, M., WATT, M.J., RENNER, K.J., FORSTER, G.L. Serotonin in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behavior during amphetamine withdrawal. **Neuroscience**, v. 281, p. 35-43, 2014.

VAHABZADEH, A.; FILLENZ, M. Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis. **European Journal Of Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 1205-12, Jul 1 1994.

VERTES, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 313, n. 4, p. 643–68, 1991.

VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 407, p. 555–582, 1999.

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

VICENTE, M.A.; ZANGROSSI Jr., H.; DOS SANTOS, L.; DE MACEDO, C.E.; ANDRADE, T.G.C.S. Involvement of median raphe nucleus 5-HT_{1A} receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. **Neuroscience Letters**, v. 445, n. 3, p. 204-8, 21 nov, 2008.

VIZI, E.S.; KISS, J.P. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: Synaptic and nonsynaptic interactions. **Hippocampus**, v. 8, p. 566–607, 1998.

- WALKER, M.C.; RUIZ, A.; KULLMANN, D.M. Do mossy fibers release GABA? **Epilepsia**, v. 43, Suppl 5, p. 196-202, 2002.
- WEEDEN, C.S.S.; ROBERTS, J.M.; KAMM, A.M; KESNER, R.P. The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 118, p. 143-149, 2015.
- WEST M.J. Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men. *Progress in Brain Research* 83: 13-36, 1990.
- WITTCHEN, H.U. Generalized anxiety disorder: Prevalence, burden, and cost to society. **Depression and Anxiety**, v. 16, p. 162–171, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World health report, 2001. Mental Health: New understanding**, New Hope, Geneva: WHO, 2001.
- YOSHIOKA, M.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, K.; SAITO, H. Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 51, n. 2-3, p. 515-9, Jun-Jul 1995.
- YU, G. Quantum Dot-Mediated Detection of γ -Aminobutyric Acid Binding Sites on the Surface of Living Pollen Protoplasts in Tobacco. **Chemistry and Biology**, v. 13, p. 723–731, 2006.
- ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 397-406, 2014.
- ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p. 71-87, 2012.
- ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 1–5, 1997.
- ZHANG, W.-N.; BAST, T.; XU, Y.; FELDON, J. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 262, p. 47–56, 2014.

Este artigo foi redigido parcialmente segundo as normas da revista Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry visando a descrição mais pormenorizada dos experimentos realizados. A adequação exata será realizada na versão final do mesmo. As normas constam no Anexo 1.

Research Report

Envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico

Involvement of the 5-HT_{1A} receptors in ventral hippocampus on anxiety- and panic- related defensive behaviors

Vinícius Dias Kümpel^a, Matheus Fitipaldi Batistela^a, Amaryllis Garcia Almeida^a, Sérgio Mosquim Júnior^a, Hélio Zangrossi, Junior^b, Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade^{c*}

^a *Laboratory of Physiology – UNESP – Assis – São Paulo – Brazil*

^b *USP – University of São Paulo, FMRP – Ribeirão Preto – São Paulo - Brazil*

^c *UNESP – University of the State of São Paulo, FCL, Department of Biological Science - Avenida Dom Antonio, 2100 – 19.806-900 – Assis – São Paulo – Brazil*

**Corresponding author: same address as above.*

E-mail address: vinicius.biotec.assis@gmail.com

RESUMO

Ainda pouco se conhece a respeito da atividade serotoninérgica sobre receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de diferentes tipos de ansiedade. O Labirinto em T elevado (LTE) é um teste que avalia separadamente dois subtipos de ansiedade: a ansiedade generalizada e o pânico, respectivamente através da avaliação dos comportamentos defensivos de esquivas inibitórias e das fugas. Assim, este estudo teve por objetivo investigar o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no HV sobre a manifestação dos transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e pânico (TP) no LTE, tendo como parâmetro a ativação de receptores gabaérgicos (GABA_A) nessa área do hipocampo. Foram conduzidos dois experimentos em ratos *Wistar*: o Experimento 1, visando avaliar o efeito do midazolam (10, 20 ou 40nmol) - um benzodiazepínico que potencializa a ação do GABA em receptores GABA_A; e o Experimento 2, para avaliar o efeito de 8-OH-DPAT (0,6, 3 ou 15nmol) – um agonista de receptores 5-HT_{1A}. Animais dos grupos controles nos dois experimentos foram tratados com salina. Dez minutos após as microinjeções foram submetidos ao LTE para avaliação das latências (em segundos) para esquivas e fugas. Imediatamente após, os animais foram colocados no centro da arena para avaliação da atividade motora (número de quadrados percorridos). Os resultados apontaram que a maior dose de midazolam microinjetada no hipocampo ventral causou ansiólise, comprovada pela diminuição na latência das esquivas em relação aos animais controles e àqueles tratados com 10nmol do mesmo fármaco. Resultado semelhante foi constatado nas três doses de 8-OH-DPAT. Não se observou qualquer alteração nas fugas, e nem na atividade motora dos animais tratados com qualquer um dos fármacos testados. Essas evidências comportamentais indicam que a ativação de receptores 5-HT_{1A} no HV diminuiu o comportamento de esquia dos animais, sem afetar as respostas de fugas, semelhantemente ao que se observou em decorrência da ação do midazolam sobre receptores GABA_A. Esses resultados indicam um envolvimento desses receptores na regulação do TAG, mas não do TP.

Palavras-chave: Hipocampo Ventral, Labirinto em T Elevado, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Pânico, GABA_A, 5-HT_{1A}.

ABSTRACT

The little is known about the serotonergic activity on 5-HT_{1A} receptors in the ventral hippocampus in the regulation of different types of anxiety. The Elevated T Maze (ETM) is a test that evaluates separately two subtypes of anxiety: generalized anxiety and panic, respectively by evaluating the defensive behaviors of inhibitory avoidance and escapes. Therefore this study aimed to investigate the involvement of 5-HT_{1A} receptors in VH on the manifestation of generalized anxiety disorder (GAD) and Panic (PD) in ETM, having as parameter the activation of gabaergic receptors (GABA_A) in that area of the hippocampus. Two experiments were conducted in rats: Experiment 1, to evaluate the effect of midazolam (10, 20 or 40nmol) – a benzodiazepine that potentiates the action of the GABA on GABA_A receptors; and Experiment 2 to evaluate the effect of 8-OH-DPAT (0.6, 3 or 15nmol) - an agonist of 5-HT_{1A} receptors. Animal control groups in both experiments were treated with saline. Ten minutes after microinjection, the animals were submitted for evaluation to the ETM latencies (in seconds) for avoidances and escapes. Immediately after, the animals were placed in the center of the arena to evaluation of motor activity (number of covered squares). The results showed that the highest dose of midazolam microinjected in the ventral hippocampus caused anxiolysis, evidenced by the decrease in latency of avoidances compared to controls and those treated animals 10nmol of the same drug. A similar result was observed at all three doses of 8-OH-DPAT. There was no change in the escapes, nor the motor activity of animals treated with any of the drugs tested. These behavioral evidence indicates that activation of 5-HT_{1A} receptors in VH decreases the behavior of avoidance of the animals without affecting the escape response, similar to what was observed due to the action of midazolam on the GABA_A receptors. These results indicate an involvement of these receptors in the regulation of GAD, but not of PD.

Keywords: Ventral Hippocampus, Elevated T Maze, Generalized Anxiety Disorder, Panic Disorder, GABA_A, 5-HT_{1A}.

Highlights:

- Midazolam in ventral hippocampus (VH) damaged the avoidances but not the escapes
- 8-OH-DPAT in VH also damaged the avoidances but not the escapes in elevated T maze
- 5-HT_{1A} receptors in VH are related with generalized anxiety but not panic

1. Introdução

Deakin e Graeff (1991) propuseram uma hipótese na qual sugeriram que o sistema nervoso central possui mais de um mecanismo de controle sobre a ansiedade, e que estes são diferentemente modulados pela neurotransmissão serotoninérgica. De acordo com esses autores, a via prosencefálica que se origina no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) e se projeta para a amígdala, córtex frontal e hipocampo ventral, facilitaria os comportamentos defensivos expressos em resposta aos perigos potencial ou distal, por exemplo, a esquivas inibitória. Por outro lado, a via NDR-periventricular, com projeções para a MCPD (Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal), inibiria reações de fuga e luta em resposta ao perigo proximal. O mau funcionamento dos sistemas serotoninérgicos nessas vias levaria a distúrbios específicos de ansiedade. Assim, a disfunção da via NDR/amígdala/córtex/hipocampo ventral ocasionaria a manifestação do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) e a disfunção da via NDR/MCPD ocasionaria o Transtorno do Pânico (TP). Subtipos celulares em regiões distintas do NDR seriam responsáveis por essa dupla atuação (Grahn et al., 1999; Hale et al., 2012; Paul et al., 2011; Paul e Lowry, 2013; Spiacci, 2012; Staub et al., 2006). O NDR pode ser subdividido em diferentes subregiões conforme sua anatomia e projeções celulares. Os subnúcleos dorsomedial e caudal representam importante fonte de neurotransmissão serotoninérgica a estruturas límbicas relacionadas com a modulação de comportamentos de ansiedade como ABL, córtex pré-frontal medial (CPFm) e núcleo leito da estria terminal (NLET) (Spiacci et al., 2015). Também há evidências de uma via conectando o subnúcleo dorsomedial do NDR à MCPD (Stezhka e Lovick, 1997). Estas subregiões estão anatômica e funcionalmente ligadas e recebem projeções de estruturas como habênula lateral, NLET e amígdala, regiões conhecidas por sua participação no controle de comportamentos relacionados à ansiedade (Hale et al., 2012). A sub-região interfascicular recebe projeções dos núcleos pré-óptico mediano e parabraquial lateral, e envia projeções para regiões corticais como dorsolateral pré-frontal, medial orbital e anterior cingulado, conhecidas também por atuar no controle de respostas comportamentais ao estresse, além de enviar projeções ao tálamo médio dorsal e hipocampo (Hale et al., 2012). Portanto, os subnúcleos associados ao controle de comportamentos ligados à ansiedade seriam o caudal e o dorsomedial, enquanto as subregiões interfascicular e as asas laterais

estariam associadas a efeitos antidepressivos e antipânico (Hale et al., 2012; Spiacchi et al., 2015).

Alguns estudos têm buscado testar estas duas possibilidades, no entanto, os modelos experimentais utilizados não permitem a discriminação entre os dois subtipos de ansiedade. Avaliações realizadas através do Labirinto em T Elevado (LTE) possibilitam esta análise separadamente, pois as esquivas inibitórias e as fugas têm sido associadas, respectivamente, aos comportamentos defensivos relacionados com o TAG e com o TP (Graeff et al., 1998; Graeff et al., 1993; Poltronieri et al., 2003; Viana et al., 1994; Zangrossi e Graeff, 1997).

Muitas investigações utilizando esse modelo tem sido mais direcionadas à compreensão da via que se projeta para a MCPD (Graeff, 2004). Não obstante existam pesquisas que já demonstraram o papel do Hipocampo Ventral (HV) na ansiedade (Ballesteros et al., 2014; Bannerman et al., 2003; Bannerman et al., 2002; Chudasama et al., 2008; File e Gonzalez, 1996; Gray e Mcnaughton, 2000; Nunes-De-Souza et al., 2002; Kjelstrup et al., 2002; Mchugh et al., 2004; Pentkowski et al., 2006; Trent e Menard, 2010; Trivedi e Coover, 2004; Tu et al, 2014; Zhang et al., 2014), ainda não foram identificados estudos que tenham utilizado o LTE com o objetivo de avaliar o papel funcional desta sub-região do Hipocampo no TAG e no TP. Na Tabela 1 é possível a visualização desses resultados de forma sucinta.

Tabela 1: Intervenções no Hipocampo Ventral e análise da manifestação da ansiedade em diferentes testes de comportamento animal

Intervenção Experimental	Teste	Espécie/linhagem	Ansiedade	Referências
Inativação do HV				
Lesão eletrolítica	Cond contextual	SD	-	Trivedi; Coover, 2004
	LTE	SD	-	Trivedi; Coover, 2004
	Odor de gato	SD	-	Trivedi; Coover, 2004
	Presença do gato	SD	0	Trivedi; Coover, 2004
Lesão neurotóxica (Ác. Ibotênico) (NMDA)	LCE	LE	-	Kjelstrup et al., 2002; Pentkowski et al., 2006; Bannerman et al., 2003; Mchugh et al., 2004; Mchugh et al., 2004; Pentkowski et al., 2006; Trent; Menard, 2010; Nascimento Häckl e Carobrez, 2007
	Claro-escuro	LE	-	
		DA	-	
		LH	-	
	Interação-social	LH	-	
	Cond contextual	LE	-	
	LCE	LE	-	
IAF	LCE	SP	-	Degroot; Treit, 2002
Muscimol	Cond contextual	Wistar	-	Zhang et al., 2014
	LCE	Wistar	-	Zhang et al., 2014
Lidocaína	LCE	Wistar	-	Bertoglio; Joca; Guimaraes, 2006
Tetrotoxina	LCE	SP	-	Degroot; Treit, 2004
Tertatolol WAY 100635	LCE	LH	-	File; Gonzalez, 1996
	LCE	SW	-	Nunes-De-Souza; Canto-De-Souza; Rodgers, 2002
Ativação do HV				
Estimulação Elétrica	LCE	LE	0	Dringenberg; Levine; Menard, 2008
CRF	LCE	SD	+	Kagamiishi; Yamamoto; Watanabe, 2003

+ aumento; - diminuição; 0 inalterado. LCE (Labirinto em Cruz Elevado); NMDA (N-methyl-D-aspartate); 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina); CRF (Fator de Liberação de Corticotropina); IAF (Inibidor de Acetilcolinesterase Fisostigmina); SP (Ratos Sprague-Dawley); LE (Ratos Long Evans); DA (Ratos Dark Agouti); LH (Ratos Lister Hooded), SW (Camundongos Swiss-Webster).

Considerando o pressuposto teórico apresentado por Deakin & Graeff (1991) e tendo como base achados que apontam que a expressão das emoções estaria mais relacionada com a parte ventral do hipocampo (Bannerman et al., 2004; Kjelstrup et al., 2002; Mchugh et al., 2004), especialmente em respostas que envolvem o condicionamento, como também possui papel no processamento e retenção da informação espacial e na consolidação da memória (Kjelstrup et al., 2008), formulou-se a hipótese que o Hipocampo Ventral exerceria um papel sobre a modulação das esquivas inibitórias no LTE e que, portanto, poderia estar mais relacionado à manifestação do TAG.

Assim, esta investigação teve por objetivo avaliar o papel do hipocampo ventral na modulação do Transtorno de Ansiedade Generalizada e do Transtorno do Pânico e, mais especificamente, verificar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados nesta região pela administração de 8-OH-DPAT, um agonista desses receptores, tendo como parâmetro o efeito da microinjeção do midazolam, um benzodiazepínico com ação conhecida em receptores gabaérgicos (GABA_A), sobre a apresentação de esquivas e fugas no labirinto em T elevado.

2. Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Biológicas, na Faculdade de Ciências e Letras da UNESP, Campus de Assis. Uma síntese do delineamento experimental pode ser visualizada através da Figura 1.

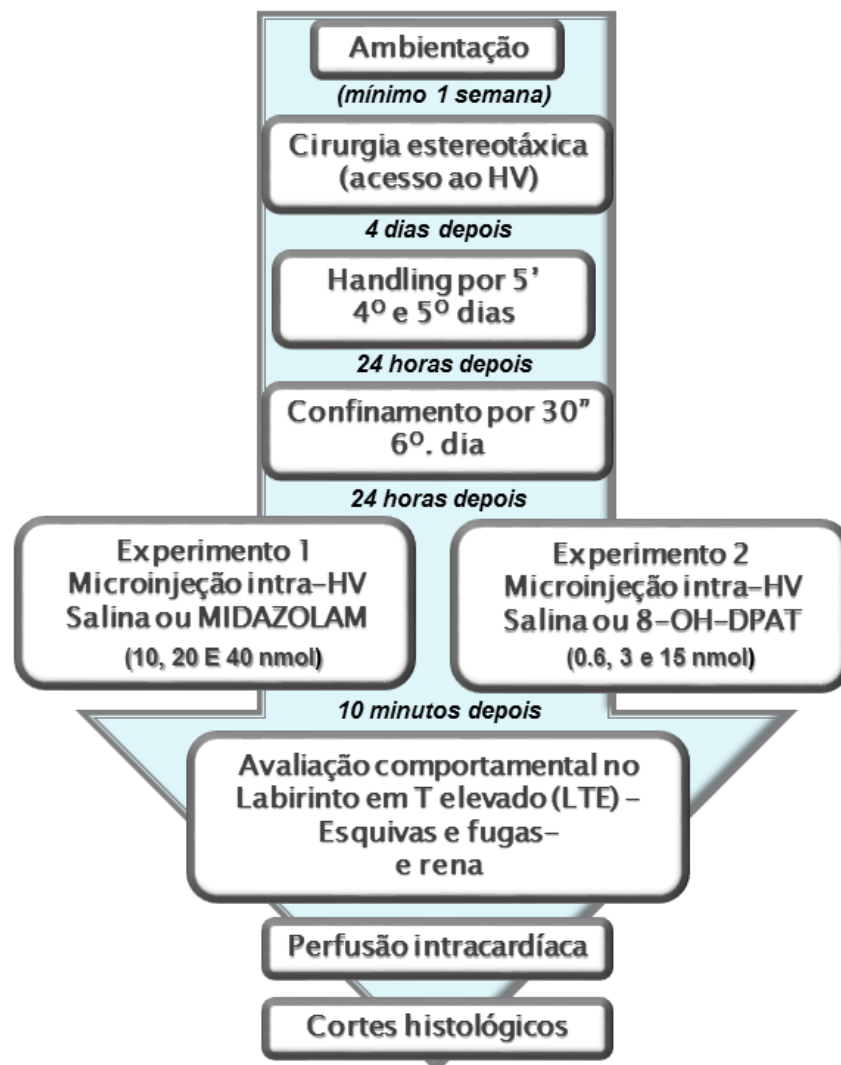


Figura 1 – Delineamento experimental do presente estudo

2.1. Animais

Foram utilizados ratos (machos) *Wistar*, obtidos do biotério central da UNESP – Botucatu, pesando 200-250g no início das sessões experimentais. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (32 x 38 x 18 cm) forradas com maravalha (cinco ratos por caixa), recebendo comida e água *ad libitum*, exceto durante as avaliações. As caixas ficaram alocadas no biotério do Laboratório de Fisiologia, que possui temperatura constante (aproximadamente 23°C +/- 2°C) e iluminação controlada por timer, com intensidade luminosa de 50 lux no centro da sala (as luzes foram acesas diariamente às 7h00 e apagadas às 19h00). Após a chegada dos animais e agrupamento dos mesmos, estes permaneceram em ambientação no biotério por um período mínimo de 1 semana, sendo submetidos à manipulação somente 3 vezes por semana durante as trocas das caixas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, visando minimizar o sofrimento animal. O projeto inicial foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP – Assis (Registro 028/2011-15/03/2012, ver anexo II).

2.2. Equipamentos

2.2.1. Labirinto em T elevado (LTE)

No LTE, as respostas de esquiva inibitória e fuga foram medidas em um modelo que consiste de três braços elevados 50 cm em relação ao solo – um fechado e dois abertos, feitos de madeira, com as mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura). Um dos braços, o fechado, é circundado por paredes laterais (40 cm de altura) e está disposto perpendicularmente aos dois outros braços que permanecem desprovidos de paredes. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são delimitados por uma proteção de 1 cm de altura (Graeff et al., 1993). Este aparato pode ser visualizado na Figura 2.



Figura 2 – Labirinto em T Elevado

2.2.2. Arena

A Arena é um aparato também constituído de madeira medindo 60 x 60cm, lateralmente cercada por paredes de 30cm de altura. No piso deste aparato, encontram-se demarcados nove quadrados (20 x 20cm).

2.2.3. Caixa de transporte individual

Para o transporte dos animais até a sala de avaliação comportamental, adjacente ao biotério, foi utilizada uma caixa de polipropileno (28 x17 x 13cm) forrada com maravalha e coberta com tela plástica e flanela.

2.2.4. Cânulas-guia e agulhas para microinjeção

As cânulas-guia afixadas ao crânio dos ratos foram produzidas pelos próprios pesquisadores a partir de agulhas descartáveis (0,60x25-23G, KDL do Brasil), cortadas nas medidas necessárias para acesso ao hipocampo ventral (12mm de comprimento e 0,6mm de diâmetro externo) após a retirada da porção plástica e limpeza de resíduos. Um pequeno fio de aço (n.30) foi preparado para ser posicionado no interior de cada cânula a fim de impedir contaminação ou obstrução da mesma após ser posicionada no animal.

Semelhantemente, as agulhas utilizadas para a microinjeção foram confeccionadas a partir de agulhas descartáveis (0,60x25-23G, KDL do Brasil) e

gingival (0,3x25-30G, Injecta Produtos Odontológicos) com diâmetro externo de 0,3mm e a porção que será inserida no animal contendo 15mm de comprimento.

2.3. Drogas

2.3.1. Midazolam

Foi utilizado midazolam (Roche), diluído em salina 0,9%, de acordo com estudo prévio (Strauss et al., 2013). Ratos controles receberam microinjeções no HV apenas com salina estéril (NaCl diluído à concentração de 0,9%).

O midazolam ($C_{18}H_{13}ClFN_3$) pertence ao grupo dos benzodiazepínicos e é conhecido por seus efeitos hipnóticos e sedativos em humanos, dentre outros efeitos, utilizado como indutor anestésico ou adjuvante à anestesia geral. Como outros benzodiazepínicos, o midazolam é capaz de se ligar a receptores farmacológicos ligados ao receptor GABA do subtipo A, aumentando a afinidade do receptor pelo GABA, potencializando seus efeitos (Kobayashi et al., 2005; Georgopoulos et al., 2008; Graeff, 2012).

2.3.2. 8-OH-DPAT

Foi utilizado 8-OH-DPAT, ou 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide (SIGMA), um agonista de receptores 5-HT_{1A}, diluídos em solução salina. Ratos controles receberam microinjeções no HV apenas com solução salina estéril.

O 8-OH-DPAT ($C_{16}H_{25}NO \cdot HBr$) é um agonista seletivo de receptores 5-HT₁ com maior afinidade pelo subtipo 5-HT_{1A} (Middlemiss e Fozard, 1983; Peroutka, 1986).

2.4. Procedimentos

2.4.1. Cirurgia estereotáxica

Sob efeito anestésico do 2,2,2-Tribromoethanol (250mg/kg) (Fluka), foram implantadas duas cânulas-guia (cirurgia bilateral) para acesso ao hipocampo ventral a 3,0mm acima da região alvo (Bertoglio et al., 2006). Após a tricotomia da região dorsal do crânio, os ratos foram fixados a um aparelho estereotáxico (David - Kopff) pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após o procedimento de antisepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (PVPI)(Rioquímica) e injeção subcutânea de lidocaína (2%) com vasoconstritor epinefrina (0.2ml) (Cristália), foi efetuada uma

incisão de 1,5 cm removendo-se pele, excesso de lidocaína acumulado, tecido subcutâneo e periósteo.

Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, foram realizados dois orifícios nos ossos parietais para implantação das cânulas. Tendo o bregma como referência, foram seguidas as seguintes coordenadas para acesso ao hipocampo ventral: antero-posterior = - 5,0mm; lateral (ambos os lados) = 5,2mm; e dorso-ventral = 4,0mm, com inclinação da haste de 0° graus (Bertoglio et al., 2006; Paxinos e Watson, 2007). Após o posicionamento das cânulas, estas permaneceram fixadas aos orifícios através de um capacete de acrílico feito de resina autopolimerizante (Polímero Metil Etil Metacrilato)(Clássico LTDA) estabilizado por dois parafusos odontológicos fixados ao crânio. Por fim, 0,2ml de uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico veterinário, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi aplicada para a profilaxia de eventuais infecções. Os ratos foram realojados em suas caixas com os demais (5 animais/caixa), sem modificação do agrupamento inicial. A fim de prevenir possíveis choques envolvendo as cânulas recém fixadas e a grade superior das caixas foi adicionado um extensor de alumínio, elevando-as a uma altura mais segura (7 cm) sem, contudo, prejudicar o acesso à água e comida.

2.4.2. Habituação dos animais ao pesquisador

No 4º e no 5º dia pós-cirúrgico os animais foram submetidos a um procedimento de habituação com o experimentador (“handling”). Este esteve utilizando luvas e individualmente tomou cada animal em suas mãos, sem permitir que o mesmo ficasse desprotegido, e ao longo de 5 minutos realizou movimentos com leve pressão com uma das mãos na região dorsal, no sentido crânio-caudal.

2.4.3. Exposição prévia ao braço aberto do LTE (confinamento prévio)

No dia anterior à avaliação comportamental, todos os ratos foram mantidos individualmente por trinta minutos, em um dos braços abertos do LTE. Os braços abertos foram separados dos demais por uma parede de madeira, disposta na linha entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Após este procedimento foram conduzidos a uma nova caixa em outra sala, conforme realizaram o procedimento, evitando assim que promovessem comunicação com os demais ratos do grupo antes que todos fossem confinados. Uma vez recomposto o grupo na mesma caixa, após o término do procedimento, os animais retornaram ao biotério até o dia

seguinte. As condições das salas são as mesmas descritas para a ambientação e para a avaliação comportamental (Teixeira et al., 2000).

2.4.4. Microinjeção de drogas no hipocampo ventral

Sete dias após a cirurgia estereotáxica os fios de aço foram removidos das cânulas para a inserção das agulhas de microinjeção de 15mm de comprimento no hipocampo ventral. As microinjeções foram realizadas com o auxílio de duas microseringas (Hamilton, EUA) conectadas às agulhas de microinjeção através de uma extensão de polietileno (PE 10 – Intramedic). As microseringas foram conectadas à uma bomba microinjetora (Fisher Scientific Company, EUA). Um volume de 0,2µl de solução foi injetado durante 1 minuto, aguardando-se o mesmo tempo para retirada da agulha, evitando o refluxo da solução.

Foram realizados dois experimentos. O primeiro (Experimento 1) teve como objetivo avaliar o efeito do midazolam no HV. Os grupos foram determinados conforme a dose de midazolam (10 nmol, n=9; 20 nmol, n=9; ou 40 nmol, n=9). Animais do grupo controle receberam microinjeção de solução salina (n=9).

O segundo experimento (Experimento 2) foi destinado à avaliação do efeito do 8-OH-DPAT no HV. Os grupos foram constituídos de acordo com a dose aplicada (0,6 nmol, n=11; 3 nmol, n=13; ou 15 nmol, n=11). De forma similar ao experimento 1, os animais controles foram tratados com solução salina (n=12).

Dez minutos após a microinjeção os ratos foram submetidos aos testes comportamentais.

2.5. Testes Comportamentais

As sessões experimentais foram conduzidas entre 14 e 17 horas em uma sala com controle de temperatura (aproximadamente 23°C +/- 2°C) e com luminosidade igual a 50 lux no centro do LTE ou arena. Os ratos foram levados do biotério para a sala de avaliação em caixas de separação individuais, um a um, e apenas no momento em que foram avaliados. A cada troca de animal os aparelhos foram limpos com álcool 20% para minimizar odores. Após a colocação dos ratos nos aparelhos o experimentador saía da sala. O comportamento do animal foi registrado por meio de um sistema de vídeo. A exemplo de pesquisas semelhantes e visando a não interferência da presença do avaliador na sala, toda a avaliação foi gravada para posterior análise (Graeff et al., 1993; Viana et al., 1994).

2.5.1. Avaliação no LTE

O teste no LTE foi iniciado pela tomada das esquivas inibitórias. Para verificar este comportamento, cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado. Foi registrado o tempo em segundos (medida de latência) gasto pelo mesmo para sair deste braço (Linha de base). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de trinta segundos entre elas (Esquiva 1 e Esquiva 2). Trinta segundos após o término da tomada da Esquiva 2 foi avaliado o comportamento de fuga. Para isso, cada animal foi colocado na extremidade de um dos braços abertos (no mesmo em que foi confinado na véspera). O mesmo procedimento foi adotado, ou seja, foi registrado o tempo de latência (em segundos) de saída de um dos braços abertos. Essa medida foi tomada por três vezes (Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3) com intervalos de trinta segundos entre elas. O tempo máximo de permanência do animal na esquiva ou na fuga foi de trezentos segundos (cinco minutos). Entre cada avaliação o animal foi recolocado em sua caixa individual aguardando a próxima exposição ao teste. O critério de “saída” de um dos braços foi que as quatro patas do animal tivessem ultrapassado totalmente a linha divisória do braço onde foi colocado inicialmente.

2.5.2. Avaliação na arena

Os ratos foram avaliados na Arena, por um período de cinco minutos, 30 segundos após sua avaliação no LTE, com o objetivo de avaliar a atividade geral e motora do animal. Cada animal foi colocado no quadrante central da caixa. Os resultados foram obtidos através da contagem do número de quadrados percorridos durante o teste.

2.6. Perfusão e identificação dos sítios de injeção

Após o término dos testes comportamentais, os ratos foram anestesiados com Thiopental sódico (Thiopentax – Cristália) em dose letal. Por meio de uma agulha de microinjeção foi injetado 0,2 μ L de corante hematoxilina pelas cânulas guias. Na sequência os animais foram perfundidos (perfusão intracardíaca) com salina e em seguida por formol a 10%. Logo após a perfusão, os encéfalos foram removidos e armazenados em formol a 10% para identificação do sítio de microinjeção através dos cortes histológicos (50 μ m). Posteriormente, as porções do tecido coletado foram depositadas em lâminas gelatinizadas e coradas através do método de Nissl. As

imagens foram analisadas através de microscopia. Animais cujas cânulas guia atingiram o hipocampo apenas unilateralmente ou em estruturas cerebrais em área adjacentes foram excluídos das amostras. Uma visão representativa do sítio de microinjeção no HV pode ser visualizada através da Figura 3.

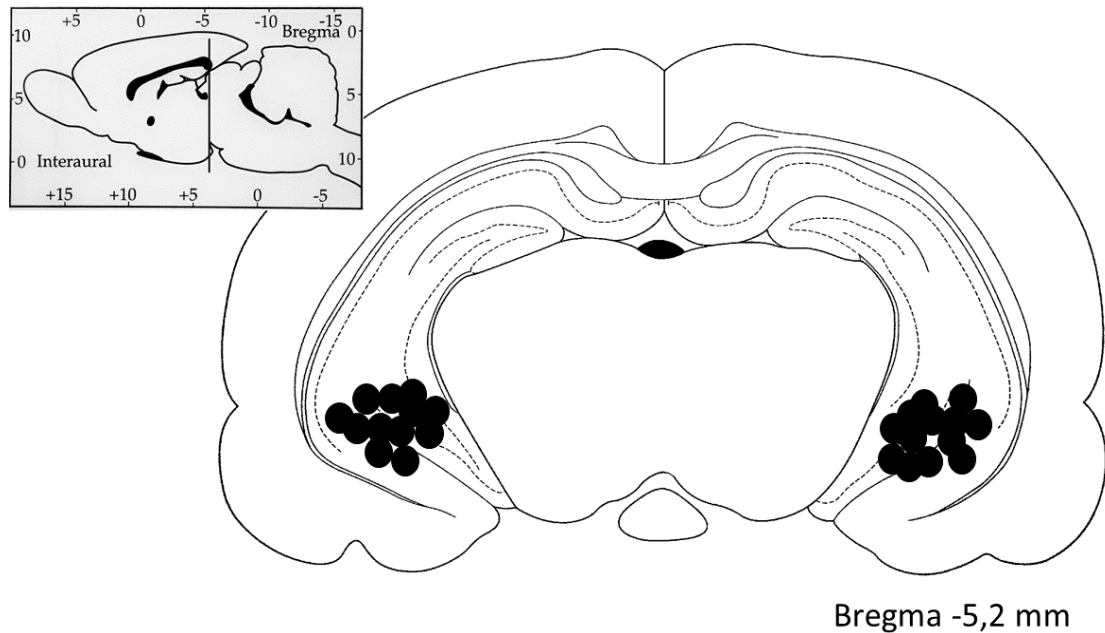


Figura 3: Representação diagramática dos sítios de injeção na região ventral do hipocampo, em seção coronal (5,2mm posterior ao bregma) do cérebro do rato (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007). Os pontos escuros ilustram locais aproximados de microinjeção, apontando a região considerada no estudo como hipocampo ventral. A parte superior ilustra o local em que foi feita a dissecação para obtenção do corte.

2.7. Análise dos dados

As latências de esquiva inibitória e de fuga foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), tendo como fator independente o tratamento, e como medidas repetidas as diferentes exposições efetuadas (Linha de base, Esquiva 1 e Esquiva 2 ou Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3) visando avaliar se houve efeito das repetições. Foram realizadas também análises independentes de cada esquiva e de cada fuga através da ANOVA de uma via. Quando apropriado, foram conduzidas comparações múltiplas utilizando o teste de Duncan. Os resultados da atividade motora na arena foram também analisados através da ANOVA de uma via. Em todos os casos um “p” com valor menor que 0,05 foi considerado significativo.

3. Resultados

Foram considerados no estudo somente os resultados dos animais cujos sítios de microinjeção atingiram a região ilustrada através da Figura 4, que apresenta um corte frontal do encéfalo corado com hematoxilina evidenciando exatamente o ponto da infusão das soluções, visualizado através de microscopia óptica.



Figura 4: Corte frontal do encéfalo de rato a -5,2 mm a partir do Bregma (Paxinos e Watson, 2007). Em (a), sítio de microinjeção demarcado com hematoxilina na região ventral do hipocampo, visualizado através de microscopia óptica (aumento de 50x), imagem representando a região delimitada em (b).

3.1. Experimento 1 – Análise do efeito do midazolam microinjetado no HV.

Na análise do efeito do midazolam microinjetado no HV sobre as esquivas inibitórias no LTE (Figura 5), a ANOVA de Medidas Repetidas mostrou que houve efeito do tratamento entre os grupos [$F_{(3,32)}=5,18$; $p=0,005$] e efeito das repetições [$F_{(2,64)}=11,72$; $p=0,000$], mas sem interação entre grupos e exposições [$F_{(6,64)}=0,70$; $p=0,654$]. O teste de Duncan apontou que não houve uma curva de aprendizagem (aumento progressivo da latência na Linha de base e nas esquivas 1 e 2) em relação aos animais controles, mas constatou-se essa curva na análise do comportamento de ratos tratados com midazolam (10 e 20nmol) ($p<0,05$). Ratos tratados com midazolam 40nmol apresentaram diminuição na latência das 3 esquivas, não se constatando essa curva ($p>0,05$). Ao analisar cada esquiva separadamente por meio da ANOVA de uma via, observou-se diferenças entre os grupos na Linha de Base [$F_{(3,32)}=4,09$; $p=0,01$]. O teste *post hoc* de Duncan apontou que animais tratados com midazolam na concentração de 20 e 40 nmol foram diferentes do controle ($p<0,01$). Analisando-se a Esquiva 1 não se constatou tais diferenças [$F_{(3,32)}=2,20$; $p=0,107$], a não ser na concentração de 40 nmol, em que os animais tratados apresentaram menor latência nesta esquiva em relação aos animais controles, conforme demonstrado pelo teste de Duncan ($p<0,05$). Na Esquiva 2 houve efeito do tratamento [$F_{(3,32)}=3,68$; $p=0,020$]. Nesse caso o teste de Duncan mostrou que o tratamento com midazolam 40nmol diminuiu a latência nas esquivas em relação aos ratos controles ($p<0,01$) e aos tratados com midazolam 10nmol ($p<0,05$).

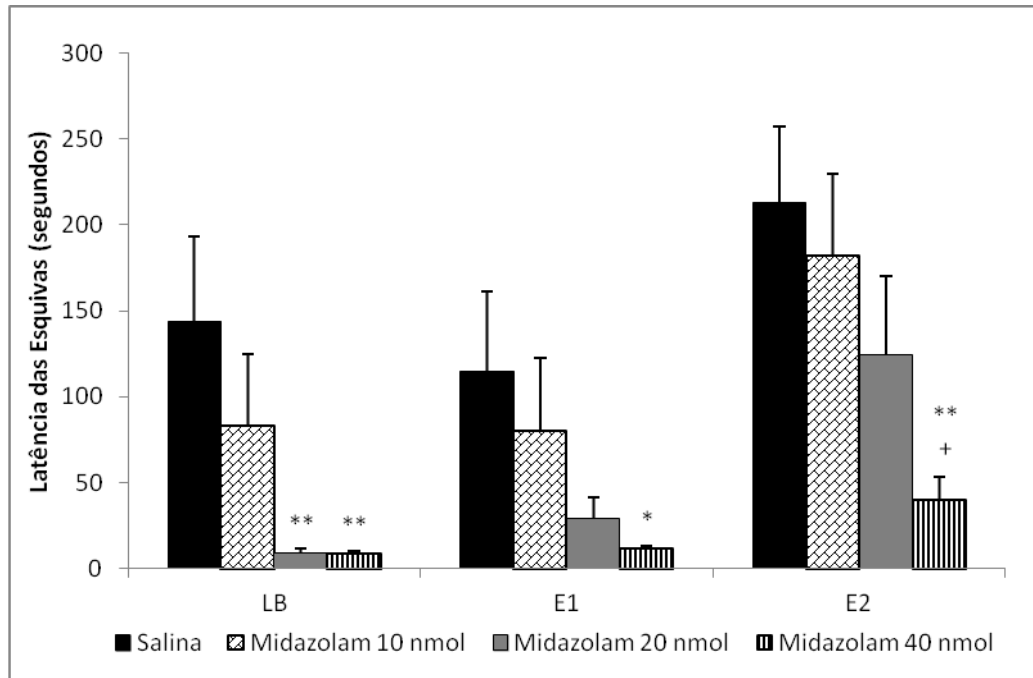


Figura 5 - Média+EPM da latência, em segundos, das esquivas no LTE, de animais tratados com midazolam (10, 20 e 40 nmol) em comparação com o grupo controle (salina). ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, onde, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam as diferenças para com o grupo controle; + $p < 0,05$, diferenças em relação ao grupo tratado com midazolam 10nmol.

Em relação às fugas (Figura 6), a ANOVA de Medidas Repetidas mostrou que não houve efeito do tratamento entre os grupos [$F_{(3,32)}=0,68$; $p=0,572$], mas constatou-se efeito das repetições [$F_{(2,64)}=9,20$; $p < 0,001$]. Não houve interação entre grupos e exposições [$F_{(6,64)}=0,33$; $p=0,916$]. O teste de Duncan apontou redução da latência entre as fugas F1 e F3 apresentadas por animais do grupo controle e por ratos tratados com a menor dose de midazolam ($p < 0,05$). Analisando separadamente cada exposição, a ANOVA de uma via não mostrou que houve diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

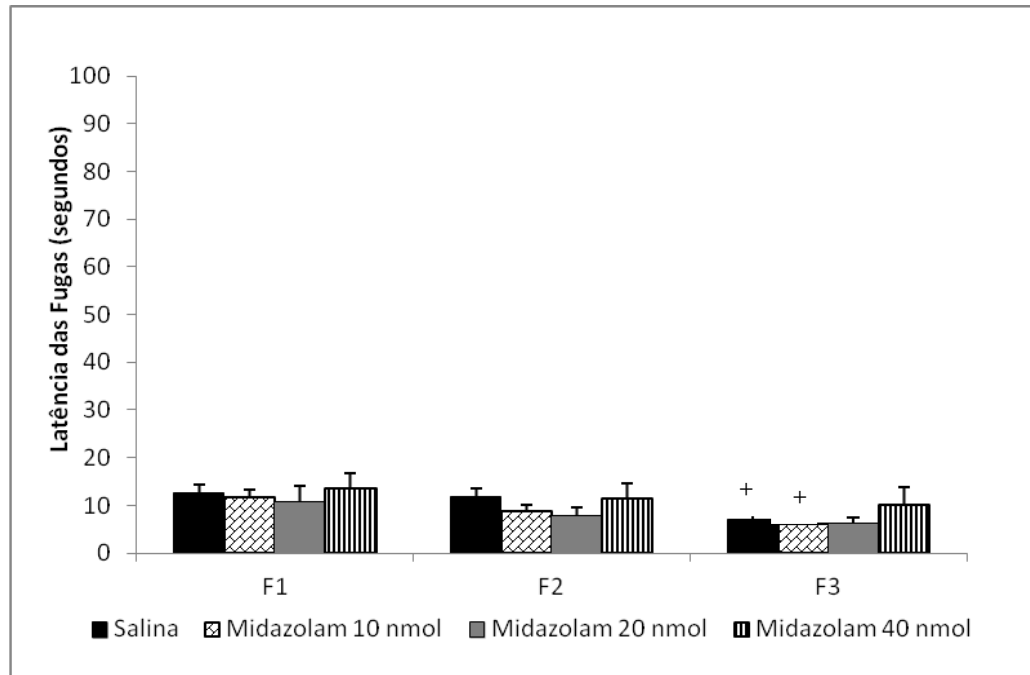


Figura 6 - Média+EPM da latência, em segundos, das fugas no LTE, de animais tratados com midazolam (10, 20 e 40 nmol) em comparação com o grupo controle (tratado apenas com salina). ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, onde, + $p < 0,05$ representa a diferença em relação à Fuga 1 no mesmo grupo.

Analisando o número de quadrados percorridos na arena pelos ratos tratados com midazolam (Figura 7), a ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças entre os grupos [$F_{(3,32)}=1,31$; $p=0,288$], ou seja, não se constatou alteração de atividade motora.

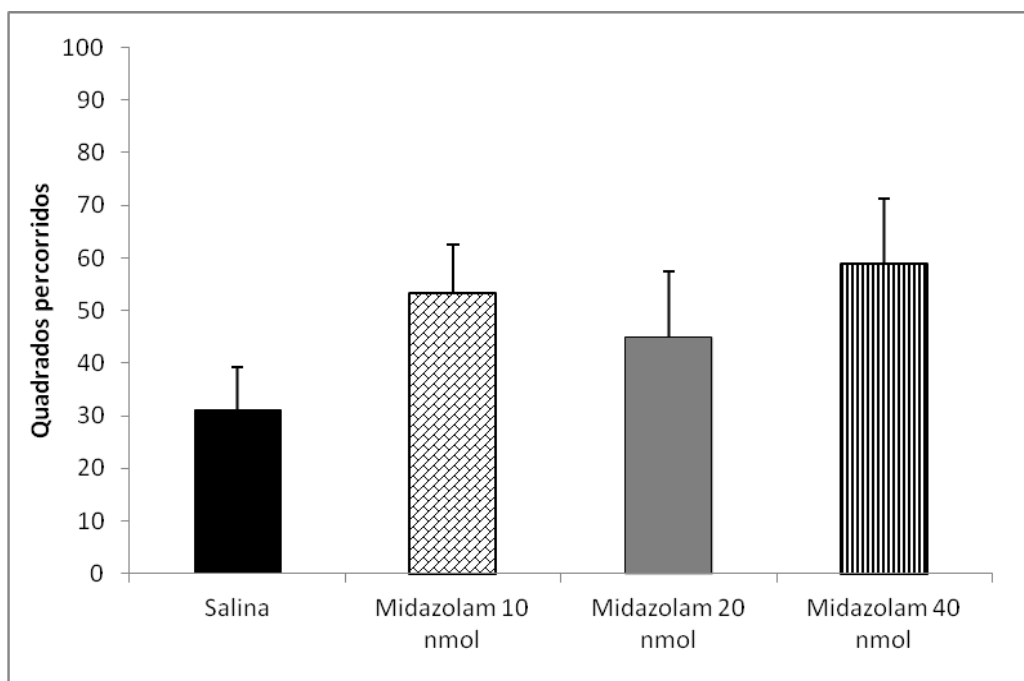


Figura 7 - Média+EPM do número de quadrados percorridos na arena, de animais tratados com midazolam (10, 20 e 40 nmol) em comparação com o grupo controle (tratado apenas com salina).

3.2. Experimento 2 – Análise do efeito do 8-OH-DPAT microinjetado no HV.

Analisando o efeito do 8-OH-DPAT microinjetado no HV sobre o comportamento das esquivas (Figura 8), a ANOVA de Medidas Repetidas mostrou que houve efeito do tratamento entre os grupos [$F_{(3,43)}=7,74$; $p<0,001$] e efeito das repetições [$F_{(2,86)}=6,98$; $p=0,001$], mas sem interação entre grupos e exposições [$F_{(6,86)}=1,77$; $p=0,115$]. O teste de Duncan apontou que não houve uma curva de aprendizagem em relação aos animais controles, mas constatou-se essa curva na análise do comportamento de ratos tratados com 8-OH-DPAT nas concentrações 0,6 nmol ($p<0,01$) e 15 nmol ($p=0,03$). Ao analisar cada esquiva separadamente por meio da ANOVA de uma via, observou-se diferenças entre os grupos na Linha de Base [$F_{(3,43)}=8,46$; $p<0,001$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que animais tratados com 8-OH-DPAT em todas as concentrações foram diferentes do controle, diminuindo as latências ($p<0,01$). Analisando-se a Esquiva 1 constatou-se resultado semelhante [$F_{(3,43)}=5,81$; $p<0,001$], mas apenas nos animais tratados com concentrações de 3 e 15 nmol, conforme demonstrado pelo teste de Duncan ($p<0,05$). Na Esquiva 2 também constatou-se diferenças entre os grupos [$F_{(3,43)}=5,46$; $p=0,002$]. Novamente, o teste de Duncan mostrou que animais tratados com 8-OH-DPAT em todas as

concentrações diminuíram a latência na esQUIVA em relação aos ratos controles (concentrações de 0,6 e 15 nmol, $p<0,05$; concentração de 3 nmol, $p<0,01$).

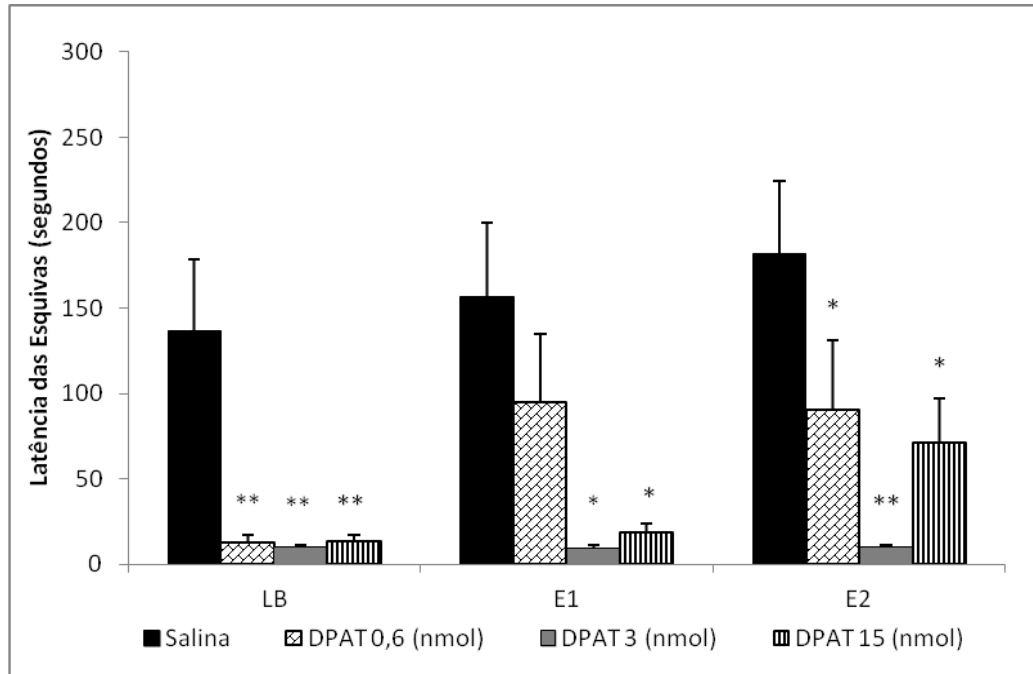


Figura 8 - Média+EPM da latência, em segundos, das esquivas no LTE, de animais tratados com 8-OH-DPAT (0,6, 3 e 15 nmol) em comparação com o grupo controle (tratado apenas com salina). ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, onde, * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ representam as diferenças em relação ao grupo controle.

Em relação às fugas (Figura 9), a análise dos resultados da ANOVA de Medidas Repetidas mostrou que não houve efeito do tratamento entre os grupos [$F_{(3,43)}=0,99$; $p=0,407$]. Também não foi constatado efeito das repetições [$F_{(2,86)}=2,37$; $p=0,099$] nem da interação entre grupos e exposições [$F_{(6,86)}=1,76$; $p=0,118$]. Analisando separadamente cada exposição, a ANOVA de uma via não apontou diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

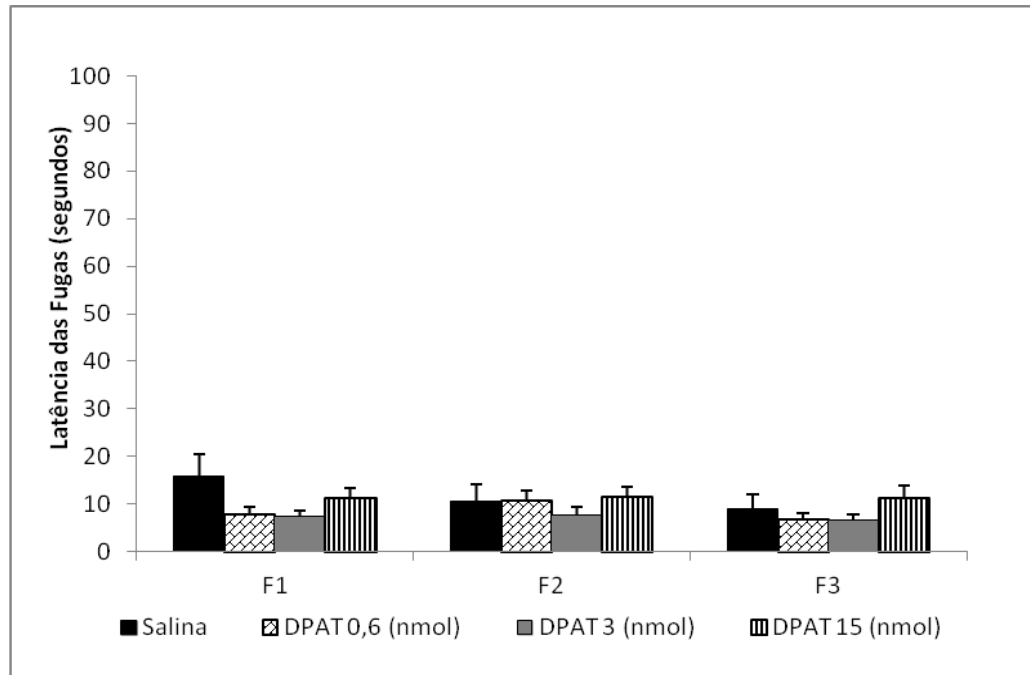


Figura 9 - Média+EPM da latência, em segundos, das fugas no LTE, de animais tratados com 8-OH-DPAT (0,6, 3 e 15 nmol) em comparação com o grupo controle (tratado apenas com salina).

Analisando o número de quadrados percorridos na arena pelos ratos tratados com 8-OH-DPAT (Figura 10), a ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças entre os grupos [$F_{(3,43)}=2,55$; $p=0,07$], ou seja, não se constatou alteração de atividade motora.

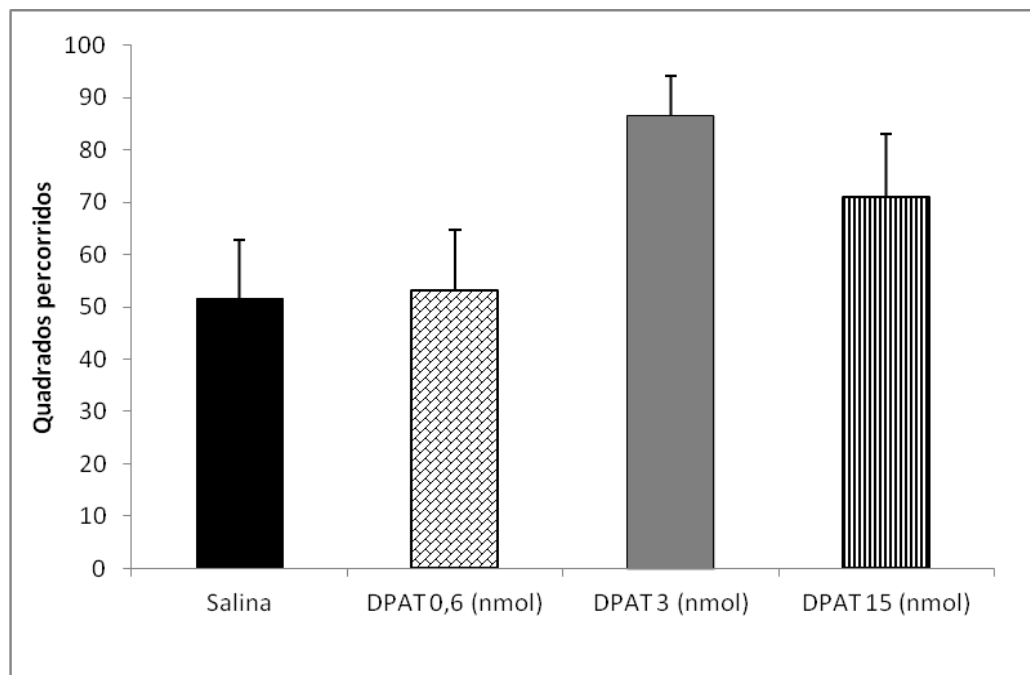


Figura 10 - Média+EPM do número de quadrados percorridos na arena, de animais tratados com 8-OH-DPAT (0,6, 3 e 15 nmol) em comparação com o grupo controle (tratado apenas com salina).

4. Discussão

No Experimento 1 foi possível perceber que a linha de base nas esquivas apresentada pelos ratos controles estava bem alta quando comparada a estudos anteriores realizados no mesmo laboratório (Andrade et al., 2004; Dos Santos et al., 2008; Dos Santos et al., 2005; Sena et al., 2003) e em outros locais (Graeff et al., 1993; Graeff et al., 1998; Poltroniere et al., 2003; Sena et al., 2003; Teixeira et al., 2000; Viana et al., 1994; Zangrossi et al., 2001; Zangrossi e Graeff, 1997). Tal ocorrência impediu a verificação de uma curva de aprendizagem esperada nos controles. Além disso, a análise das fugas mostrou que ratos controles apresentaram uma modificação entre a Fuga 1 e Fuga 3, resultado este não esperado, já que segundo os idealizadores do modelo, baseados em experimentos de validação, não existe modificação das respostas comportamentais entre as fugas por parte de animais controles. Entretanto, essa diferença foi ínfima e de fato, não caracteriza nenhum quadro relevante para esta investigação. A atividade motora apresentada pelos ratos controles e experimentais foi compatível com resultados de outros estudos que utilizaram o mesmo procedimento: avaliação no LTE e subsequente avaliação na arena (Andrade et al., 2004; Dos Santos et al., 2008; Dos Santos et al., 2005; Graeff et al., 1998; Graeff et al., 1993; Poltroniere et al., 2003; Sena et al., 2003; Teixeira et al., 2000; Viana et al., 1994; Zangrossi et al., 2001; Zangrossi e Graeff, 1997).

Analisando os grupos experimentais que receberam microinjeções diretas no hipocampo ventral de 3 doses diferentes de Midazolam foi possível perceber que a menor dose (Midazolam 10 nmol) não modificou as respostas comportamentais e o padrão foi similar ao observado em animais controles. Ratos que receberam a dose de 20nmol saíram mais rapidamente do braço fechado comparados aos animais controles, mostrando que houve efeito ansiolítico dessa dose no Hipocampo ventral, ocorrendo a mesma direção na Esquiva 1 (apenas uma tendência, pois o resultado não foi significativo), sendo que a Esquiva 2 foi semelhante ao que se observou nos animais controles e nos que receberam Midazolam na concentração de 10nmol. Por outro lado, a maior concentração deste benzodiazepínico, 40 nmol, causou ansiólise observada pela diminuição das três esquivas. Não houve modificação das respostas comportamentais de fugas e nem alteração na atividade motora dos ratos testados.

Considerando a ampla distribuição de receptores gabaérgicos e de suas diferentes subunidades no hipocampo como um todo (Lee e Maguire, 2014; Mceown e Treit, 2013; Mckernan e Whiting, 1996; Pirker et al., 2000; Sperk et al., 1997; Yu et

al., 2006); levando-se em conta que no hipocampo ventral existe uma maior expressão das subunidades $\alpha 2/\beta 1/\gamma 2$ (Sarantis et al., 2008; Sotiriou et al., 2005); tendo também como base o fato que receptores GABA_A medeiam os efeitos ansiolíticos de um grande número de compostos terapêuticos (Bormann, 2000; Mceown e Treit, 2013); optou-se por utilizar nesse estudo o Midazolam, um benzodiazepínico que age sobre esses receptores potencializando a ação dos mesmos e produzindo efeito neuronal inibitório (Georgopoulos et al., 2008; Kobayashi et al., 2005).

De fato, constatou-se que a maior dose de Midazolam (40nmol) causou ansiólise no LTE, afetando somente as esquivas e não as fugas. Ou seja, esses dados preliminares permitem considerar que a ação de benzodiazepínicos sobre receptores gabaérgicos (GABA_A) no Hipocampo Ventral diminui a manifestação de comportamentos relacionados com a gênese do TAG, mas não afeta as respostas comportamentais relacionadas ao TP.

No Experimento 2, do mesmo modo que no primeiro, foi possível detectar que a linha de base nas esquivas apresentada pelos ratos controles estava bem alta, impedindo a verificação de uma curva de aprendizagem. A análise da atividade motora apresentada pelos ratos controles e experimentais foi compatível com os resultados do Experimento 1 e de outros estudos preliminares envolvendo avaliação no LTE e subsequente exposição à arena (Andrade et al., 2004; Dos Santos et al., 2008; Dos Santos et al., 2005; Graeff et al., 1998; Graeff et al., 1993; Poltroniere et al., 2003; Sena et al., 2003; Teixeira et al., 2000; Viana et al., 1994; Zangrossi et al., 2001; Zangrossi e Graeff, 1997). Não houve modificação das respostas comportamentais entre as fugas por parte de animais controles

Analisando os grupos experimentais que receberam microinjeções diretas no hipocampo ventral de 3 doses diferentes de 8-OH-DPAT foi possível perceber que todas as doses provocaram modificações nas respostas comportamentais de esquiva inibitória, reduzindo a latência de saída do braço fechado em relação aos animais controles, demonstrando efeito ansiolítico desta droga no HV. A única exceção foi observada no grupo dos ratos que foram microinjetados com a menor dose (0,6 nmol), na Esquiva 1, embora não tenha havido diferenças em relação às demais repetições do mesmo grupo. Quanto às respostas comportamentais de fugas e alteração na atividade motora dos ratos testados, não foram observadas diferenças.

Constatou-se que ambas as doses de 8-OH-DPAT (0,6, 3 e 15 nmol) causaram ansiólise no LTE, afetando somente as esquivas e não as fugas. Esses dados

permitem considerar que a ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} no HV diminuem a manifestação de comportamentos relacionados com a gênese do TAG, mas não afetam as respostas comportamentais relacionadas ao TP.

Conforme já mencionado na introdução deste estudo, semelhantemente, lesões do Hipocampo Ventral, eletrolíticas (Ballesteros et al., 2014; Trivedi e Coover, 2004) ou citotóxicas através do ácido ibotênico ou NMDA (N-methyl-D-aspartate) (Bannerman et al., 2003; Kjelstrup et al., 2002; Mchugh et al., 2004; Pentkowski et al., 2006), diminuíram a manifestação dos comportamentos de defesa associados à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Kjelstrup et al., 2002), no teste de transição claro-escuro (Bannerman et al., 2003; Mchugh et al., 2004), no teste de interação social (Mchugh et al., 2004), no condicionamento contextual (Pentkowski et al., 2006; Trivedi e Coover, 2004), no teste do odor de gato, mas não à presença real do gato, e no LTE, afetando somente as esquivas (Trivedi e Coover, 2004). A administração direta no HV de NMDA (N-methyl-D-aspartate) (Nascimento Häckl e Carobrez, 2007) ou um inibidor da acetilcolinesterase fisostigmina (Degroot e Treit, 2002), causaram ansiólise no LCE. Do mesmo modo, manipulações farmacológicas com nítido efeito inibitório, tais como a microinjeção de muscimol, um agonista de receptor GABA_A (Trent e Menard, 2010) e a inibição transitória com lidocaína (Bertoglio et al., 2006) ou tetrotoxina (Degroot e Treit, 2004), diminuíram a manifestação da ansiedade no LCE. O muscimol também foi efetivo para diminuir a manifestação dos congelamentos no condicionamento contextual (Zhang et al., 2014), mas diminuiu a atividade motora no LCE (Zhang et al., 2014).

Analisando o envolvimento do sistema serotoninérgico na funcionalidade do HV, a microinjeção de antagonistas de receptores 5-HT_{1A} nesta estrutura causou ansiólise no LCE, tanto o tertatolol em ratos (File e Gonzalez, 1996), como também o Way 100.635, em camundongos (Nunes-De-Souza et al., 2002). Por outro lado, a microinjeção no hipocampo ventral de um agonista de receptor 5-HT_{1A}, o 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina (8-OH-DPAT), (100ng), aumentou a atividade motora, sem ocasionar modificações na exploração dos braços abertos do LCE, e neutralizou o efeito ocasionado pelo tertatolol (File e Gonzalez, 1996).

Sabe-se que a maior densidade de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos encontra-se nos núcleos da rafe, cujos axônios são direcionados praticamente para todo o cérebro, especialmente para o hipocampo, dentre todas as demais regiões do conhecido sistema límbico. Em todo o sistema serotoninérgico há

expressão de receptores serotoninérgicos, com destaque à alta densidade de receptores da família 5-HT₁, especialmente o subtipo 5-HT_{1A}. Estes receptores são metabotrópicos, ou seja, desencadeiam as respostas através de mecanismos intracelulares. Estão ligados à proteína G específica (G_{α1/α0}) e, ao serem conectados ao 5-HT₁, alteram sua conformação estrutural, inibindo a formação de adenilato monofosfato cíclico (cAMP) pela adenilato ciclase. Uma cascata de reações é conduzida de modo a produzir a resposta adequada (Berumen et al., 2012).

Os receptores 5-HT_{1A} são encontrados tanto pré-sinápticamente nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, quanto pós-sinápticamente, predominantemente em estruturas límbicas como o hipocampo, o septo e a amígdala, mas também no neocórtex e hipotálamo (Barnes e Sharp, 1999; Hamon, 1997). A ativação de receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos resulta na inibição do disparo celular e em um consequente declínio da neurotransmissão serotoninérgica nas áreas de projeção (Hjorth e Magnusson, 1988; Sharp e Hjorth, 1990; Sprouse e Aghajanian, 1988). Já a ativação de receptores pós-sinápticos resulta na inibição neuronal de partes selecionadas do sistema límbico. Devido a esta distribuição particular, os receptores 5-HT_{1A} oferecem a possibilidade de controlar a transmissão serotoninérgica de uma maneira geral e a atividade neuronal no sistema límbico (Gray, 1982; Schreiber e De Vry, 1993).

Especialmente no hipocampo, alguns estudos demonstraram que agonistas de receptores 5-HT_{1A} suprimiram a ativação neuronal serotoninérgica e diminuíram a liberação de 5-HT nos terminais (Kagamiishi et al., 2003). Esta família de receptores se mostrou interessante em particular devido a estarem envolvidos na regulação de comportamento emocional e afetivo e, possivelmente, no mecanismo de ação de tratamentos de ansiedade (Schreiber e De Vry, 1993), além de responder a antidepressivos estimulando a neurogênese, especialmente em células granulares do GD, resposta abolida quando os receptores 5-HT_{1A} são deletados nesta área (Samuels et al., 2015; Santarelli et al., 2003).

Os núcleos mediano e dorsal da rafe (NMR e NDR, respectivamente) enviam projeções serotoninérgicas para áreas cerebrais envolvidas na regulação de comportamentos defensivos. A maioria das projeções serotoninérgicas se origina no NDR (cerca de 80%), sendo o restante originário do NMR (Descarries et al., 1982). As projeções serotoninérgicas que alcançam o HD são principalmente provenientes do NMR, ao passo que amígdala, matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) e HV

recebem projeções provenientes do NDR (Zangrossi e Graeff, 2014), muita embora existam descrições a respeito de fibras provenientes do NMR que chegam ao HV (Mckenna e Vertes, 2001).

Manipulações experimentais ativando ou inibindo a atividade neuronal no NDR e NMR, e no hipocampo foram apresentadas na revisão conduzida por Andrade, Zangrossi e Graeff (2013). Lesões seletivas aos neurônios do NDR com 5,7-DHT prejudicaram a esquivas inibitória e, simultaneamente, facilitaram a fuga, isto é, apresentaram efeitos ansiolítico e panicogênico (Sena et al., 2003). Quando o mesmo foi repetido no NMR, o prejuízo das esquivas também foi observado, sem, contudo, afetar as fugas (Andrade et al., 2004). Os mesmos efeitos foram observados na administração de 8-OH-DPAT (Dos Santos et. al., 2005; Vicente et al., 2008). Nesse caso, a inativação de neurônios serotoninérgicos do NMR e NDR foi conduzida através da estimulação de receptores 5-HT_{1A} inibitórios localizados no corpo celular e nos dendritos destas células, resultando na inibição do disparo neuronal e na redução da liberação de serotonina nas terminações sinápticas.

Entretanto, quando se utilizou antagonista de receptores 5-HT_{1A} no NMR em doses mais altas constatou-se o aumento de comportamentos de esquivas inibitória no LTE e, conseqüentemente, o efeito ansiogênico, sem interferência nas fugas (Dos Santos et al., 2008). A ativação de neurônios serotoninérgicos no NMR pelo bloqueio da ação da serotonina sobre receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos ocasionou provavelmente o aumento da liberação de 5-HT no HD causando aumento das esquivas. Injetando diretamente 8-OH-DPAT no HD observou-se o mesmo resultado, o que foi sugerido por esses pesquisadores que a 5-HT no HD causaria aumento das esquivas por agir sobre receptores 5-HT_{1A} nessa região. Outras pesquisas foram conduzidas visando compreender o papel da serotonina no HD e as mesmas foram listadas na Tabela 2. Todavia percebe-se também em relação a esta estrutura nenhum resultado ou efeitos paradoxais ao encontrado através do labirinto em T elevado.

Tabela 2 - Intervenções no Hipocampo Dorsal e análise da manifestação da ansiedade em diferentes testes de comportamento animal

Intervenção Experimental	Teste	Ansiedade	Referências
Estimulação elétrica	LCE TERSC	- -	DRINGENBERG et al., 2008 DRINGENBERG et al., 2008
Zimelidina (inibidor da recaptação da 5-HT) (20 e 100nmol)	LCE	0 +	GUIMARÃES et al., 1993* PADOVAN; GUIMARÃES, 1993
BNDF (200pg) (facilitação do GABA)	LTE CE	+ +	CASAROTTO et al., 2012 CASAROTTO et al., 2012
Lesão eletrolítica	LTE CC	0 -	TRIVEDI; COOVER, 2004 MAREN et al., 1997
Tetrodotoxina (5mg) (neurotoxina)	LCE TERSC	0 -	TRIVEDI; COOVER, 2004 DEGROOT; TREIT, 2004
Lidocaína (2%) (bloqueia canais de Sódio)	LCE	0	DEGROOT; TREIT, 2004 BERTOGLIO et al., 2006
Agonista de receptores 5-HT			
5-MeODMT (20nmol)	LCE	0 -	MENDONÇA-NETTO; GUIMARÃES, 1996 MENDONÇA-NETTO; GUIMARÃES, 1996*
Agonista de receptores 5-HT_{1A} – 8-OH-DPAT			
3 e 15 nmol	LTE	+	DOS SANTOS et al., 2008
0,1 µg e 5 µg/100 ng	LCE TERSC EAC CE	+ - 0 0 +	CHEETA et al., 2000; FILE; GONZALEZ, 1996 MENARD; Treit 1998 MENARD; Treit 1998 MENARD; Treit 1998 ROMANIUK et al., 2001
0,05, 0,1 e 0,2 µg/3 nmol	LCE IS	0 0	BELCHEVEA et al., 1994; FILE; GONZALEZ, 1996 GUIMARÃES et al., 1993*
1 nmol	CC	-	ALMADA et al., 2009
1-5 µg, 10 µg	VU	-	SCHREIBER; DeVry 1993; JOLAS et al., 1995
50 ng	IS Geller-Seifter EP	0 0 -	PICAZO et al., 1995 CERVO et al., 2000 CARLI et al., 1993
100 ng	IS	+	ANDREWS et al., 1994; CHEETA et al., 2000; FILE; GONZALEZ, 1996
Outros agonistas (parciais) de receptores 5-HT_{1A}			
Tandospirona (30ug,60ug)	Vogel	-	KATAOKA et al., 1991
Buspirona (2,5 µg) (15-30 µg)	LCE VU	- -	KOSTOWSKI et al., 1989 SCHREIBER; DEVRY 1993
Ipsapirona (0,1 µg) (40 µg, 10-20 µg)	LCE VU	0 -	PICAZO et al., (1995) SCHREIBER; DEVRY 1993; JOLAS et al., 1995
Outros antagonistas de receptores 5-HT_{1A}			
WAY-100635 (0,18, 0,37 e 0,74 nmol)	LTE	0	DOS SANTOS et al., 2008
Tertatolol (3 µg)	LCE IS	+ 0 +	ANDREWS et al., 1994 FILE; GONZALEZ, 1996 ANDREWS et al., 1994
Agonista de receptores 5-HT_{1C}			
MK-212 (1 µg, 0,3 µg)	LCE	0	ALVES et al. (2004)
Agonistas e antagonistas de receptores Gabaérgicos			
Inibidor de recaptação FrPbAII (174 Da) (EC50=0,09 µg) (EC50=0,03 µg)	LCE CE	- -	LIBERATO et al. (2006) LIBERATO et al. (2006)
Agonista de receptor GABA _A – Muscimol (0,05 µg, 0,25 µg, 0,5 µg)	LCE	-	REZAYAT et al. (2005)
Antagonista de receptor GABA _A – Bicucullina (0,5 µg, 1 µg, 2 µg)	LCE	0	REZAYAT et al. (2005)
Agonistas e antagonistas de receptores Benzodiazepínicos			
Midazolam (1 µg, 2 µg)/agonista	LCE IS	- -	GONZALEZ et al. (1998) GONZALEZ et al. (1998)
Midazolam (10 µg)	LCE TERSC EAC	- 0 0	MENARD; TREIT (2001) MENARD; TREIT (2001) MENARD; TREIT (2001)
Flumazenil (100 ng, 500 ng)/antagonista	LCE IS	0 0	GONZALEZ et al. (1998) GONZALEZ et al. (1998)
Flumazenil (500 ng)			

+ aumento; - diminuição; 0 inalterado

LTE (Labirinto em T elevado); LCE (Labirinto em cruz elevado); CE (Claro-escuro); CC (Condicionamento Contextual); TERSC (Teste de enterramento em reação à sonda de choque); EAC (Estímulo Aversivo de choque); VU (Vocalização Ultrassônica); IS (Interação Social); EP (Esquiva Passiva); BNDF (Brain-derived neurotrophic factor, ou fator neurotrófico derivado do cérebro); 5-MeODMT (5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine); Way 100635: N-[2-methoxyphenyl]-1-piperazinyl-ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamina; 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralina); *drogas revertem o efeito de restrição prévia de 2 horas.

Tanaka e colegas (2012) demonstraram a diferente expressão de vários receptores serotoninérgicos ao longo do eixo dorso-ventral do hipocampo. Diferentes combinações de subtipos de receptores 5-HT são encontradas em camadas celulares distintas no hipocampo. No HD, os receptores 5-HT_{1A} são mais expressos em CA1, enquanto que no HV são expressos em maior quantidade em CA3 e no GD. Semelhantemente, os receptores 5-HT_{2C} e 5-HT₇ são expressos muito mais significativamente no CA3 do HV que no do HD. Ao considerar o hipocampo como um todo, os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₄ são altamente expressos nas células granulares do GD, enquanto que em células piramidais de CA3, os principais receptores serotoninérgicos expressos são 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ e 5-HT₇ e nas células piramidais de CA1 são principalmente expressos os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT₅.

Nesse ponto de análise, se faz relevante comparar o papel da serotonina sobre receptores 5-HT_{1A} com os demais, lembrando a ampla variação de receptores serotoninérgicos encontrada em atividade por todo o SNC (Barnes e Sharp, 1999; Verge e Callas 2000; Berumen, 2012). Várias investigações foram conduzidas avaliando o papel de outros receptores serotoninérgicos no HV.

Já se demonstrou a participação dos receptores 5-HT_{2C}, na regulação dos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade (Drago e Serretti, 2009; Milan, 2005), especialmente em estudos farmacológicos com a microinjeção dos agonistas trifluoromethyl-phenylpiperazine (TFMPP) e 6-chloro-2(1-piperazinyl)pyrazine (MK-212) (Alves et al., 2004). Efeitos ansiogênicos de agonistas de receptores 5-HT_{2C} microinjetados na amígdala (Campbell e Merchant, 2003) e no HV (Alves et al., 2004; Scarpelli et al., 2008) foram observados em diversos modelos animais. Receptores 5-HT_{2C} no HV antagonizados com SB-242084 atenuaram o efeito ansiogênico do agonista WAY-161503 quando avaliado no LCE. Entretanto, o antagonista, por si só, foi incapaz de produzir efeito ansiolítico (Greidinger Carvalho, 2012). Este mesmo padrão para antagonistas de receptores 5-HT_{2C} foi encontrado em estudos na MCPD, avaliado no LTE (Yamashita, et al., 2011) e na amígdala, avaliada no LCE (Cruz et al., 2005). Outro estudo com estimulação da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala baso-lateral (ABL) com receptores 5-HT_{2C} evidenciou o aumento de comportamentos de esquiva inibitória no LTE (Vicente e Zangrossi Jr, 2012). Vicente e Zangrossi Jr (2014) demonstraram que os receptores 5-HT_{2C} na ABL são dessensibilizados após tratamento crônico com antidepressivos ao mesmo tempo em que a neurotransmissão

serotonérgica por receptores 5-HT_{1A} é facilitada, levantando a hipótese de que esses dois mecanismos atuam simultaneamente na regulação de comportamentos relacionados a esses fármacos. Sabe-se que estruturas pós-sinápticas como MCPD, sistema septo-hipocampal, amígdala, hipotálamo e CPF, que recebem serotonina a partir do NDR possuem alta concentração desses receptores (Clemett et al., 2000; Hill et al., 2011; Kristiansen e Dahl, 1996; Mammounas et al., 1991; Millan, 2003; Pompeiano et al., 1994; Vertes, 1991). Tomados juntos, esses resultados podem indicar que também no HV haveria um balanço funcional e paradoxal entre esses dois tipos de receptores de serotonina. Os resultados desta investigação apontam que a ação da serotonina sobre receptores 5-HT_{1A} no HV teriam efeito desinibitório sobre as esquivas, por tanto, ansiolítico, sem alterar as respostas de fuga. Por outro lado, provavelmente, diante dos trabalhos prévios em outros modelos, a ação da serotonina sobre receptores 5-HT_{2C} seria inibitória, ansiogênica.

Em todo o hipocampo são expressos receptores 5-HT₇ (Costa et al., 2012; Eriksson, 2008; Freret, 2014; Gasbarri, 2014; Kinsey, 2001; Matthys, 2011; Meneses, 2015; Sarkisyan, 2009), entretanto, seu papel na modulação de comportamentos de ansiedade é ainda pouco compreendido. Ohmura et al. (2016) relatou supressão da memória dependente do medo no Teste de Medo Condicionado ao Contexto, reduzindo o comportamento de *freezing*, após microinjetarem no HV o antagonista de receptores 5-HT₇ SB269970, o que não foi observado em estruturas adjacentes ao HV. O SB269970 também não afetou a memória independente do medo ou a atividade locomotora no LCE. Por outro lado, a microinjeção no HV de LP-44 (agonista de receptores 5-HT₇) provocou o efeito inverso na memória dependente do medo e no comportamento de *freezing*.

O papel dos demais receptores serotonérgicos na regulação da ansiedade ainda não foi demonstrado, apesar de identificados por todo o hipocampo, impossibilitando a comparação com os resultados do presente estudo (Carr et al., 2011; Carson et al., 1996; Cenquizca e Swanson, 2007; Erlander et al., 1993; Garcia-Alcocer, 2010, 2006; Gerard et al., 1997; Haahr et al., 2013; Helmer, 2003; Kinsey, 2001; Marazziti et al., 2013; Mendez-David, 2014; Nasehi, 2015; Nikiforuk, 2011; Pasqualetti et al., 1998; Svenningsson et al., 2007; Wisden et al., 1993; Yamada e Ujikawa, 2006; Yau et al., 1997).

5. Conclusões

Os resultados apontaram que a maior dose de midazolam microinjetada no hipocampo ventral causou ansiólise, comprovada pela diminuição na latência das esquivas em relação aos animais controles e àqueles tratados com 10nmol do mesmo fármaco. Resultado semelhante foi constatado nas três doses de 8-OH-DPAT. Não se observou qualquer alteração nas fugas, e nem na atividade motora dos animais tratados com qualquer um dos fármacos testados. Essas evidências comportamentais indicam que a ativação de receptores 5-HT_{1A} no HV diminuiu o comportamento de esquiva dos animais, sem afetar as respostas de fugas, semelhantemente ao que se observou em decorrência da ação do benzodiazepínico sobre os receptores GABA_A. Como os receptores GABA_A são inibitórios, supõe-se que a ação da serotonina sobre receptores 5-HT_{1A} no HV seja também a de inibir a atividade neuronal nessa área do hipocampo, culminando na diminuição das esquivas. Esses resultados em conjunto indicam um envolvimento desses receptores na manifestação do TAG, mas não do TP, confirmando a hipótese deste estudo.

6. Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

7. Referências

- Adams, W., Kusljic, S., Van Den Buuse, M., 2008. Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacol* 55(6):1048-1055, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.035.
- Almada, R.C., Borelli, K.G., Albrechet-Souza, L. Brandão, M.L., 2009. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res* 203(2):279-287, doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.017.
- Alves, S.H., Pinheiro, G., Motta, V., Landeira-Fernandez, J., Cruz, A.P.M., 2004. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol* 15(1):37-43, doi: 10.1097/01.fbp.0000113327.49506.87.

- Andrade, T.G.C.S., Macedo, C.E.A., Zangrossi Jr., H., Graef, F.G., 2004. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 153:55-60, doi:10.1016/j.bbr.2003.10.036.
- Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Jr., H., Graeff, F.G., 2013. The median raphe nucleus revisited. *J Psychopharmacol*, 27(12):1107-1115.
- Andrews, N., Hogg, S., Gonzalez, L.E., File, S.E., 1994. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. *Eur J Pharmacol* 264:259–64.
- Ballesteros, C.I., Galvão, B.O., Maisonette, S., Landeira-Fernandez, J., 2014. Effect of dorsal and ventral hippocampal lesions on contextual fear conditioning and unconditioned defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Plos One* 9(1):83342, doi: 10.1371/journal.pone.0083342.
- Bannerman, D.M., Deacon, R.M.J., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., Rawlins, J.N.P., 2002. Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116(5):884–901, doi.org/10.1037/0735-7044.116.5.884.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Feldon, J., Rawlins, J.N.P., 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139:197–213.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N.P., Mchugh, S.B., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H.J., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273–283, doi:10.1016/j.neubiorev.2004.03.004.
- Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacol* 38:1083–1152, doi:10.1016/S0028-3908(99)00010-6.
- Belcheva, I., Belcheva, S., Petkov, V.V., Petkov, V.D., 1994. Hippocampal asymmetry in the behavioral responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Brain Res* 640:223–8, doi: 10.1016/0006-8993(94)91876-7.
- Bertoglio, L.J., Joca, S.R.L., Guimaraes, F.S., 2006. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res* 175:183–188, doi:10.1016/j.bbr.2006.08.021.
- Berumen, L.C., Rodríguez, A., Miledi, R., García-Alcocer, G., 2012. Serotonin receptors in hippocampus. *The Scientific World Journal* 2012:823493. doi: 10.1100/2012/823493.

- Bormann, J., 2000. The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19, doi: 10.1016/S0165-6147(99)01413-3.
- Campbell, B.M., Merchant, K.M., 2003. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res* 993:1-9, doi:10.1016/S0006-8993(03)03384-5.
- Carli, M., Tatarczynska, E., Cervo, L., Samanin, R., 1993. Stimulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptors causes amnesia and anxiolytic-like but not antidepressant-like effects in the rat. *Eur J Pharmacol* 234(2-3):215-221.
- Carr, G.V., Schechter, L.E., Lucki, I., 2011. Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT₆ receptor agonists in rats. *Psychopharmacol (Berl)* 213:499-507, doi: 10.1007/s00213-010-1798-7.
- Carson, M.J., Thomas, E.A., Danielson, P.E., Sutcliffe, J.G., 1996. The 5-HT serotonin receptor is expressed predominantly on astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17:317–326, 10.1002/(SICI)1098-1136(199608).
- Carvalho, M.G., Silva, F.M., Scarpelli G.F.F., Couto, K.C., Salviano, M.F., Cruz, A.P.M., Alves, S.H.S., 2012. Envolvimento de receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral em comportamentos de defesa de ratos no labirinto em cruz elevado. *Estudos de Psicologia* 17: 145-151.
- Casarotto, P.C., Bortoli, V.C., Zangrossi Jr, H., 2012. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behav Pharmacol* 23:80-88, doi: 10.1097/FBP.0b013e32834ecb14.
- Cenquizca, L.A., Swanson, L.W., 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56(1):1-26, doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.002.
- Cervo, L., Mocaër, E., Bertaglia, A., Samanin, R., 2000. Roles of 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe and dorsal hippocampus in anxiety assessed by the behavioral effects of 8-OH-DPAT and S 15535 in a modified Geller-Seifter conflict model. *Neuropharmacol* 39(6):1037-1043, doi: 10.1016/S0028-3908(99)00189-6.
- Cheeta, S., Kenny, P.J., File, S.E., 2000. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24(7):1053-1067, doi: 10.1016/S0278-5846(00)00129-9.

- Chudasama, Y., Wright, K.S., Murray, E.A., 2008. Hippocampal Lesions in Rhesus Monkeys Disrupt Emotional Responses but Not Reinforcer Devaluation Effects. *Biol Psychiatr*, 63:1084–1091, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.11.012.
- Clemett, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P., Fone, K.C., 2000. Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacol* 39:123-132, doi:10.1016/S0028-3908(99)00086-6.
- Costa, L., Trovato, C., Musumeci, S.A., Catania, M.V., Ciranna, L., 2012. 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors differently modulate AMPA receptor-mediated hippocampal synaptic transmission. *Hippocampus* 22,790–801 doi: 10.1002/hipo.20940.
- Cruz, A.P.M., Pinheiro, G., Alves, S.H., Ferreira, G., Mendes, M., Faria, L., ... & Landeira-Fernandez, J., 2005. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacol* 182:345-354, doi 10.1007/s00213-005-0108-2.
- Deakin, J.F.W., Graeff, F.G., 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5(4):305-315, doi: 10.1177/026988119100500414.
- Degroot, A., Treit, D., 2002. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 949(1-2):60–70, doi:10.1016/S0006-8993(02)02965-7.
- Degroot, A., Treit, D., 2004. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res* 1001:60–71, doi:10.1016/j.brainres.2003.10.065.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Deaudet, A., 1982. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol*, 207(3):239-54.
- Dos Santos, L., Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Jr., H., 2008. 5-HT_{1A} 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.
- Dos Santos, L., Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Jr., 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. *Psychopharmacol* 179:733–741.

- Drago, A., Serretti, A., 2009. Focus on HTR2C: a possible suggestion for genetic studies of complex disorders. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet* 150:601-637, doi: 10.1002/ajmg.b.30864.
- Dringenberg, H.C., Levine, Y., Menard, J.L., 2008. Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. *Behav Brain Res* 186:143–147.
- Eriksson, T.M., Golkar, A., Ekstrom, J.C., Svenningsson, P., Ogren, S.O., 2008. 5-HT₇ receptor stimulation by 8-OH-DPAT counteracts the impairing effect of 5-HT(1A) receptor stimulation on contextual learning in mice. *Eur J Pharmacol* 596,107–110, doi:10.1016/j.ejphar.2008.08.026.
- Erlander, M.G., Lovenberg, T.W., Baron, B.M., De Lucea, L., Danielson, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Sigel, B.W., Foye, B.E., Cannon, K., Burns, J.E., Sutcliffe, J.G., 1993. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3452–3456.
- Freret, T., Paizanis, E., Beaudet, G., Gusmao-Montaigne, A., Nee, G., Dauphin, F., 2014. Modulation of 5-HT₇ receptor: effect on object recognition performances in mice. *Psychopharmacol (Berl)* 231,393–400.doi: 10.1007/s00213-013-3247-x.
- File, S.E., Gonzalez, L.E., 1996. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphé and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1):123–128, doi:10.1016/0091-3057(95)02108-6.
- García-Alcocer, G., Rodríguez, A., Moreno-Layseca, P., Berumen, L.C., Escobar, J., Miledi, R., 2010. Serotonin receptor 5-HT_{5A} in rat hippocampus decrease by leptin treatment. *Neurosci Lett* 486:171-173, doi: 10.1016/j.neulet.2010.09.045.
- García-Alcocer, G., Berumen-Segura, L.C, García Peña, M. Martínez-Torres, A., Miledi, R., 2006. Ontogenetic distribution of 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptors in the rat hippocampus. *Gene Expr.* 13: 53–57, doi: 10.3727/000000006783991935.
- Gasbarri, A., Pompili, A., 2014. Serotonergic 5-HT₇ receptors and cognition. *Rev Neurosci* 25:311–323, doi:10.1515/revneuro-2013-0066.
- Georgopoulos, P., Petrides, T., Kostopoulos, G., Papatheodoropoulos, C., 2008. Varying magnitude of GABAergic recurrent inhibition enhancement by different sedative/anesthetic agents in dorsal and ventral hippocampus. *Brain Res* 1207:43–59, doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.017

- Gerard, C., Martres, M.P., Lefevre, K., Miquel, M.C., Verge, D., Lanfumey, L., Doucet, E., Hamon, M., Mestikawy, S., 1997. Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res* 746:207-219, doi:10.1016/S0006-8993(96)01224-3.
- Gonzalez, L.E., Ouagazzal, A.M., File S.E., 1998. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur J Neurosci* 10:3673–80, doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00375.x
- Gould, E., 1999. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol* 21:46S–51S, doi:10.1016/S0893-133X(99)00045-7.
- Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav* 28: 239-259, doi:10.1016/j.neubiorev.2003.12.004
- Graeff, F.G., Ferreira Netto, C., Zangrossi Jr., H., 1998. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23(2):237-246, doi:10.1016/S0149-7634(98)00024-4.
- Graeff, F.G., 2012. Medicamentos antiansiedade. In: Graeff FG, Guimarães FS (eds) *Fundamentos da Psicofarmacologia*, 2nd edn. Atheneu, São Paulo, pp 165-204.
- Graeff, F.G., Viana, M.B., Tomaz, C., 1993. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 26:67–70.
- Grahn, R.E., Will, M.J., Hammack, S.E., Maswood, S., Mcqueen, M.B., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1999. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res* 826:35–43, doi: 10.1016/S0006-8993(99)01208-1
- Gray, J.A., 1982. *Précis of The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. *Behav Brain Sci* 5(3):469-484.
- Gray, J., Mcnaughton, N., 2000. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford University Press, Oxford.
- Guimarães, F.S., Del Bel, E.A., Padovan, C.M., Mendonça Netto, S., Titz De Almeida, R., 1993. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav Brain Res* 58(1-2):133-139, doi: 10.1016/0166-4328(93)90098-B.
- Haahr, M.E., Fisher, P., Holst, K., Madsen, K., Jensen, C.G., Marnier, L., Lehel, S., Baaré, W., Knudsen, G., Hasselbalch, S., 2013. The 5-HT₄ receptor levels in

- hippocampus correlates inversely with memory test performance in humans. *Hum Brain Mapp* 34:3066–3074, doi: 10.1002/hbm.22123.
- Hale, M.W., Shekhar, A., Lowry, C.A., 2012. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders. *Cel Mol Neurobiol* 32:695-708, doi: 10.1007/s10571-012-9827-1.
- Hamon, M., 1997. The main feature of central 5-HT_{1A} receptors. In: BAUMGARTEN, H.G.; GOTHER, M. (Eds.) *Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Handb Exp Pharmacol* 129:239-268, Springer-Verlag: Berlin.
- Helmer, L.A., 2003. New anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. *Am J Psychiatry*, 160(10):1726-39, doi: 10.1176/appi.ajp.160.10.1726.
- Hill, R.A., Murray, S.S., Halley, P.G., Binder, M.D., Martin, S.J., van den Buuse, M., 2011. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the hippocampus of 5-HT_{2C} receptor knockout mice. *Hippocampus* 21(4)434-445, doi: 10.1002/hipo.20759.
- Hjorth, S., Magnusson, T., 1988. The 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338(5):463-71.
- Jolas, T., Schreiber, R., Laporte, A.M., Chastanet, M., Devry, J., Glaser, T., Adrien, J., Hamon, M., 1995. Are postsynaptic 5-Ht_{1a} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-Ht_{1a} receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 272:920–9.
- Kagamiishi, Y., Yamamoto, T., Watanabe, S., 2003. Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 991(1-2):212–221, doi:10.1016/j.brainres.2003.08.021.
- Kataoka, Y., Shibata, K., Miyazaki, A., Inoue, Y., Tominaga, K., Koizumi, S., Ueki, S., Niwa, M., 1991. Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine_{1A} agonistic anxiolytic. *Neuropharmacol* 30(5):475-480.
- Kinsey, A.M., Wainwright, A., Heavens, R., Sirinathsinghji, D.J.S., Oliver, K.R., 2001. Distribution of 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆, e 5-HT₇ receptor mRNAs in the rat brain. *Mol Brain Res* 88:194-198, doi:10.1016/S0169-328X(01)00034-1.

- Kjelstrup, K.B., Solstad, T., Brun, V.H., Hafting, T., Leutgeb, S., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.B., 2008. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* 321:140–143, doi: 10.1126/science.1157086..
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.L., Moser, M.B., 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10825–10830.
- Kobayashi, S., Fujito, Y., Matsuyama, K., Aoki, M., 2005. Synaptic Transmission Comparison of midazolam effects on inhibitory postsynaptic currents in hippocampal CA3 with those in CA1. *Euroreport* 16(9):1003-1007.
- Kotwoski, W., Plaznik, A., Stefanski, R., 1989. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol* 168:393–6, doi: 10.1016/0014-2999(89)90803-0.
- Kristiansen, K., Dahl, S.G., 1996. Molecular modeling of serotonin, ketanserin, ritanserin and their 5-HT_{2C} receptor interactions. *Eur J Pharmacol* 306:95-210, doi:10.1016/0014-2999(96)00180-X.
- Lee, V., Maguire, J., 2014. The impact of tonic GABA_A receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits* 8:3, doi: 10.3389/fncir.2014.00003.
- Liberato, J.L., Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Gelfuso, E.A., Beleboni, R.D., Coutinho-Netto, J., Dos Santos, W.F., 2006. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAll, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistrata* (araneidae:Araneae). *Brain Res* 1124:19–27, doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.052.
- Mammounas, L.A., Mullen, C.A., O'Hearn, E., Molivier, M.E., 1991. Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J Comp Neurol* 314:558-586, doi:10.1002/cne.903140312.
- Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Testa, G., Schmid, L., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., Piano, I., Gargini, C., Castagna, M., Catena-Dell'osso, M., Lucacchini, A., 2013 Serotonin receptor of type 6 (5-HT₆) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: an immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochem Int* 62:182-188, doi: 10.1016/j.neuint.2012.11.013.

- 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,
- Matthys, A., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P., 2011. Role of the 5-HT₇ receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Mol Neurobiol* 43:228–253, doi:10.1007/s12035-011-8175-3.
- Mendonça Netto S., Guimarães F.S., 1996. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single experience. *Behav Brain Res* 77: 215-218.
- Mceown, K., Treit, D., 2013. GABA_A receptor sub-units in the ventral hippocampus and α 5 GABA_A receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory. *Neurosci* 252:169–77, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.012.
- Mchugh, S.B., Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P., Bannerman, D.M., 2004. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118:63–78.
- Mckenna, J.T., Vertes, R.P., 200. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull* 54(6):619-630.
- McKernan, R.M., Whiting, P.J., 1996. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19(4):139-143, doi:10.1016/S0166-2236(96)80023-3.
- Menard, J., Treit, D., 1998. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav Pharmacol* 9:93–101.
- Menard, J., Treit, D., 2001. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. *Brain Res* 888:163–6, doi: 10.1016/S0006-8993(00)03046-8.
- Mendez-David, I., David, D.J., Darcet, F., Wu, M.V., Kerdine-Römer, S., Gardier, A.M., Hen, R., 2014. Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacol* 39:1366–1378, doi: 10.1038/npp.2013.332.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Ponce-Lopez, T., Lacivita, E., Leopoldo, M., 2015. 5-HT₇ receptor activation: procognitiveandanti-

- amnesiceffects. *Psychopharmacol (Berl.)* 232,595–603, doi:10.1007/s00213-014-3693-0.
- Middlemiss, D.N., Fozard, J.R., 1983. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur J Pharmacol* 90(1):151-153, doi:10.1016/0014-2999(83)90230-3.
- Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70: 83-244, doi:10.1016/S0301-0082(03)00087-X.
- Millan, M.J., 2005. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Therapie* 60:441-460, doi: 10.2515/therapie:2005065.
- Nascimento Häckl, L.P., Carobrez, A.P., 2007. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 88(2):177–85, doi:10.1016/j.nlm.2007.04.007.
- Nasehi, M., Kafi, F., Khakpai, F., Zarrindast, M.R., 2015. Involvement of the serotonergic system of the ventral hippocampus (CA3) on amnesia induced by ACPA in mice. *Behavioural Brain Research* 286:356-363, doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.011.
- Nikiforuk, A., Kos, T., Wesolowska, A., 2011. The 5-HT₆ receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacol* 217:411-418, doi: 10.1007/s00213-011-2297-1.
- Nunes-De-Souza, R.L., Canto-De-Souza, A., Rodgers, R.J., 2002. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Res* 927(1):87–96, doi:10.1016/S0006-8993(01)03335-2.
- Ohmura, Y., Yoshida, T., Konno, K., Minami, M., Watanabe, M., Yoshioka, M., 2016. Serotonin 5-HT₇ receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1–12, doi: 10.1093/ijnp/pyv131.
- Padovan, C.M., Guimarães, F.S., 1993. Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intra-hippocampal microinjection of zimelidine. *Braz J Med Biol Res* 26(10):1085-1089.

- Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., Cxastagna, M., Cassano, G.B., Marazziti, D., 1998. Distribution of the 5-HT_{5A} serotonin receptor in the human brain. *Mol Brain Res* 56:1–8.
- Paul, E.D., Hale, M.W., Lukkes, J.L., Valentine, M.J., Sarchet, D.M., Lowry, C.A., 2011. Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiol Behav* 104:272–282, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.006
- 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(12):1090-1106, doi: 10.1177/0269881113490328.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic systems, 6edn. Academic Press, New York.
- Pentkowski, N.S., Blanchard, C., Lever, C., Litvin, Y., Blanchard, R.J., 2006. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci* 23:2185–2196, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04754.x.
- Peroutka, S.J., 1986. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *J Neurochem* 47(2):529–540, doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb04532.x.
- Picazo, O., Lopez-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A., 1995. Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. *Brain Res Bull* 37:169–75, doi: 10.1016/0361-9230(94)00273-4.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA(A) receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neurosci* 101:815–850, doi:10.1016/S0306-4522(00)00442-5.
- Polter, A.M., Li, X., 2010. 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal* 22:1406–1412, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.03.019.
- Poltronieri, S.C., Zangrossi Jr., H., Viana, M.B., 2003. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 147:185–192, doi:10.1016/S0166-4328(03)00151-7.
- Pompeiano, M., Palácios, J.M., Mengod, G., 1994. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol Brain Res* 23:163-178.

- Rezayat, M., Roohbakhsh, A., Zarrindast, M.R., Massoudi, R., Djahanguiri, B., 2005. Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiol Behav* 84:775–82, doi:10.1016/j.physbeh.2005.03.002.
- Romaniuk, A., Koprowska, M., Krotewicz, M., Strzelczuk, M., Wieczorek, M., 2001. Effects of 8-OHDPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats, *Behav Brain Res* 120(1):47-57, 2001.
- Samuels, B.A., Anacker, C., Hu, A., Levinstein, M.R., Pickenhagen, A., Tsetsenis, T., Madroñal, N., Donaldson, Z.R., Drew, L.J., Dranovsky, A., Gross, C.T., Tanaka, K.F., Hen, R., 2015. 5-HT_{1A} receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. *Nat Neurosci* 18(11):1606-1618, doi:10.1038/nn.4116.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805–809, doi:10.1126/science.1083328.
- Sarantis, K., Sotiriou, E., Papatheodoropoulos, C., Matsokis, N., Angelatou, F., 2008. Differential Pharmacological Properties Of Gabaa/Benzodiazepine receptor complex in dorsal compared to ventral rat hippocampus. *Neurochem Int* 52(6):1019–1029, doi:10.1016/j.neuint.2007.10.016.
- Sarkisyan, G., Hedlund, P.B., 2009. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res* 202:26–31, doi:10.1016/j.bbr.2009.03.011.
- Scarpelli, G., Alves, S.H., Landeira-Fernandez, J., Cruz, A.P.M., 2008. Effects of two selective 5-HT_{2C} receptor-acting compounds into the ventral hippocampus of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychol Neurosci*, 1(1):87-96, doi:10.1590/S1983-32882008000100014
- Schreiber, R., De Vry, J., 1993. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT ipsapirone and buspirone in the rat. *Eur J Pharmacol* 249(3):341-51.
- Sena, L.M., Bueno, C., Pobbe, R.L., Andrade, T.G.C.S., Zangrossi Jr., H., Viana, M.B., 2003. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res* 142:125-133,

doi:10.1016/S0166-4328(02)00399-6.

- Sharp, T., Hjorth, S., 1990. Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J Neurosci Methods* 34(1-3):83-90.
- Sotiriou, E., Papatheodoropoulos, C., Angelatou, F., 2005. Differential expression of gamma-aminobutyric acid--a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci Res* 82(5):690–700.
- Sperk, G., Schwarzer, C., Tsunashima, K., Fuchs, K., Sieghart, W., 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: Immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neurosci* 80:987–1000, doi:10.1016/S0306-4522(97)00146-2.
- Spiacci Jr., A., Coimbra, N.C., Zangrossi Jr., H., 2012. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neurosci* 227:350-360, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.061.
- Spiacci Jr., A., Pobbe, R.L.H., Zangrossi Jr., H. , 2015. 5-HT_{1A} receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. *Neuropharmacol* xxx:1-9 , doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.06.015.
- Sprouse, J. S., Aghajanian, G. K., 1988. Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacol* 27(7):707-15.
- Staub, D.R., Evans, A.K., Lowry, C.A., 2006. Evidence supporting a role for corticotrophin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Res* 1070:77–89, doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.096.
- Stezhka, W., Lovick, T.A., 1997. Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. *Neurosci Lett* 230:57-60.
- Strauss, C.V.A., Vicente, M.A., Zangrossi Jr., H., 2013. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. *Behav Brain Res* 246:103-110, doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.005.
- Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Qi, H., Carruthers, R., Witkin, J.M., Nomikos, G.G., Greengard, P., 2007. Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT₆ receptor stimulation. *J Neurosci* 27:4201-4209, doi:10.1523/JNEUROSCI.3110-06.2007.

- Tanaka, K.F., Samuels, B.A., Hen, R., 2012. Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Phil Trans R Soc B* 367:2395–2401, doi:10.1098/rstb.2012.0038.
- Teixeira, R.C., Zangrossi Jr., H., Graeff, F.G., 2000. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 65:571–576, doi:10.1016/S0091-3057(99)00261-0.
- Trent, N.L., Menard, J.L., 2010. The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats' open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 101:141–152, doi: 10.1016/j.physbeh.2010.04.035.
- Trivedi, M.A., Coover, G.D., 2004. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol Learn Mem* 81:172–184, doi:10.1016/j.nlm.2004.02.005.
- Tu, W., Cook, A., Scholl, J.L., Mears, M., Watt, M.J., Renner, K.J., Forster, G.L., 2014. Serotonin in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behavior during amphetamine withdrawal. *Neurosci* 281:35-43, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.019
- Vergé, D., Calas, A., 2000. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat* 18, 41-56, doi:10.1016/S0891-0618(99)00050-2.
- Vertes, R.P., 1991. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643-668, doi: 10.1002/cne.903130409.
- Viana, M.B., Tomaz, C., Graeff, F.G., 1994. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 49:549–554, doi:10.1016/0091-3057(94)90067-1.
- Vicente, M.A.; Zangrossi Jr., H., 2012. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:1-12, doi: 10.1017/S1461145711000873.
- Vicente, M.A., Zangrossi Jr., H., Dos Santos, L., De Macedo, C.E., Andrade, T.G.C.S., 2008. Involvement of median raphe nucleus 5-HT_{1A} receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. *Neurosci Lett* 445(3):204-8, 21.

- Wisden, W., Parker, E.M., Mahle, C.D., Grisel, D.A, Nowak, H.P., Yocca F.D., Felder, C.C, Seeburg, P.H., Voigt, M.M, 1993. Cloning and characterization of the rat 5-HT5B receptor. *FEBS Letts.* 333:25–31, doi: 10.1016/0014-5793(93)80368-5.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., Ujikawa, M., 2006. Involvement of leptin in hypophagia induced by the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in mice, *Biol Pharm Bull* 29:557–559, doi:10.1248/bpb.29.2557.
- Yamashita, P.S.M., Bortoli, V., Zangrossi Jr. H., 2011. 5-HT2C receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacol*, 60(2-3) 216-222, doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.09.001.
- Yau, J.L., Noble, J., Widdowson, J., Seckl, J.R., 1997 Impact of adrenalectomy on 5-HT6 and 5-HT7 receptor gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 45:182-186, doi:10.1016/S0169-328X(97)00026-0.
- Yu, G., 2006. Quantum Dot-Mediated Detection of γ -Aminobutyric Acid Binding Sites on the Surface of Living Pollen Protoplasts in Tobacco. *Chem Biol* 13:723–731, doi:10.1016/j.chembiol.2006.05.007.
- Zangrossi Jr., H., Graeff, F.G., 1997. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44:1–5, doi:10.1016/S0361-9230(96)00381-4.
- Zangrossi Jr., H., Viana, M.B., Zanoveli, J., Bueno, C., Nogueira, R.L., Graeff, F.G., 2001. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 25:637–45, doi:10.1016/S0149-7634(01)00047-1.
- Zhang, W.N., Bast, T., Xu, Y., Feldon, J., 2014. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 262:47–56, doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.044.

8. Anexo I

Normas e informações indicadas aos autores para publicação na revista
Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry.



PROGRESS IN NEURO- PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY

An International Research, Review, and News Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0278-5846

DESCRIPTION

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry is an international and multidisciplinary journal which aims to ensure the rapid publication of authoritative reviews and research papers dealing with experimental and clinical aspects of **neuro-psychopharmacology** and **biological psychiatry**. Issues of the journal are regularly devoted wholly in or in part to a topical subject.

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry does not publish work on the actions of biological extracts unless the pharmacological active molecular substrate and/or specific receptor binding properties of the extract compounds are elucidated.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Neuroscientists, pharmacologists, psychiatrists, psychologists in both basic and clinical research.

IMPACT FACTOR

2014: 3.689 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Elsevier BIOBASE
 Cambridge Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents/BIOMED Database
 Current Contents/Index to Scientific Reviews
 Current Contents/Life Sciences
 MEDLINE®
 EMBASE
 Research Alert
 SCISEARCH
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

Guy Drolet, Axe Neurosciences, Centre de Recherche du CHU de Québec, P-09800, 2705 Laurier, Québec, G1V 4G2, Québec, Canada

Assistant Editor:

Sylvie Laforest

Associate Editor

L. Gendron, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Editorial Board:

O. Akyol, Ankara, Turkey
R.H. Belmaker, Beer Sheva, Israel
W.C. Boon, Heidelberg, Victoria, Australia
C. Davidson, London, UK
S.I. Deutsch, Washington, District of Columbia, USA
K. Domschke, Würzburg, Germany
R. Duman, PhD, New Haven, Connecticut, USA
F. Filardi da Rocha
G. Gobbi
L. He, Shanghai, China
F. Holsboer, München, Germany
A.V. Kalueff, Los Angeles, California, USA
K. Kasai, Tokyo, Japan
Y.-K. Kim, Ansan City, South Korea
Y. Le Strat
P.-Y. Lin, Kaohsiung, Taiwan, ROC
K. Melkersson, Sollentuna, Sweden
J.A. Micó, Cádiz, Spain
M. Molina
D. Muck-Seler, Zagreb, Croatia
G. Pinna, Chicago, Illinois, USA
N. Pivac, Zagreb, Croatia
J. Samochowiec, Szczecin, Poland
A. Serretti, Bologna, Italy
H. Singh Duggal, Tecumseh, Michigan, USA
D.J. Stein, Cape Town, South Africa
R. Szeszko, Glen Oaks, New York, USA
V.A. Vaidya, Mumbai, India
P. Vezina, Chicago, Illinois, USA
M. Xu, Boston, Massachusetts, USA

Founding Editor:

C. Radouco-Thomas†

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry is an international and multidisciplinary research, review and news journal. One of its main aims is to assure rapid publication of authoritative reviews and research papers dealing with experimental and clinical aspects of neuro-psychopharmacology and biological psychiatry. Another important aim of the journal is to supply pertinent information, provided by national and international bodies, that contributes to progress in the scientific and professional fields. Finally, the journal intends to foster and encourage communications between members of the communities of neuro-psychopharmacology and biological psychiatry.

Studies on natural products The journal does *not* publish work on the actions of biological extracts unless the pharmacological active molecular substrate and/or specific receptor binding properties of the extract compounds are elucidated.

Types of paper

1. Original research articles
2. Review articles: Mini-reviews or comprehensive reviews of cutting edge work, or syntheses of cutting edge work that has been done in the past two years.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration

for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts

Before the accepted manuscript is published in an online issue

Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include:

The reason the name should be added or removed or the author names rearranged. Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that:

Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests. Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver

value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/pnp/>

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Genetic Association Studies

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry is interested in Genetics/Association studies that are replicable and generalizable. The following guidelines are offered in pursuit of this goal. (1) Studies need to be sufficiently large. (2) Information about subject ethnicity, and how it was determined, should be provided. The use of an analytic strategy that controls for potential stratification, such as family-controlled association, or structured association, is encouraged. (3) There must be a clear description of how the phenotype was ascertained. (4) Negative studies should always include estimates of power.

Confirmation of the functional consequences of a common disease-associated variant is useful information, but does not substitute for a rigorous demonstration of a statistically significant association. Analysis of pathways or candidate regional analysis is encouraged over single gene studies. Candidate gene studies must have strong positional or biological rationale or precedents in the literature that motivate gene choice.

For studies of non-functional variants, there should generally be sufficiently dense marker coverage to allow a relatively comprehensive analysis of common variants within a gene or genes. Analysis of the extent of marker coverage using standard methods to assess linkage disequilibrium should be presented. If rare variants are being tested, the same method of assessment (sequencing, copy number assessment, etc.) should be used in both case and control groups.

We will consider both negative and positive association studies, as well as large replication studies. Negative studies should be based on an attempt to replicate previous studies. Power calculations considering reasonable effect sizes must be provided to show that the study had sufficient power to be informative.

NIH voluntary posting ("Public Access")

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access")

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after

formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). 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.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <https://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Title

The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Original research articles should be organized as follows:

Introduction

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

Methods

This section should contain explicit, concise descriptions of all procedures, materials and methods used in the investigation to enable the reader to judge their accuracy, reproducibility, etc. To increase clarity, headings should be used throughout. For example, the following subheadings, which should be numbered, could be used:

Experimental articles: Animals, Drugs, Apparatus, Experimental procedure, and Statistical analysis.

Clinical articles: Patient population, Drug administration, Study design, Assessment instruments, and Data analysis. Depending on the type of article they are preparing, authors could introduce any other subheadings they find useful.

Results and statistical analyses

This section usually contains the experimental data, but no extended discussion of their significance. The main statistical results should be reported under this section. The description of the statistical results should include the proper statistical term (such as the F statistic) as well as the degrees of freedom and the P value. The description of statistical results in the figure legends should be limited to important post hoc comparisons. The results should be illustrated (figures and tables); data are usually easier for readers to grasp if they are represented in graphic or tabular form, rather than discursively. Graphic presentation of data is preferred. Data should not be needlessly repeated in text. Sufficient data may allow interested but non-expert readers to judge the variability and reliability of the results. The section should be well structured using appropriate subheadings.

The main statistical results should be reported in the Results section. The description of the statistical results should include the proper statistical term (such as the F statistic) as well as the degrees of freedom and the P value. The description of statistical results in the figure legends should be limited to important post hoc comparisons. For example, you should report F value and degree of freedom Anova $F(x,y) = 5.67, p < 0.05$. For t-test $t = -0.722, df = x, p = 0.05$. For Chi square $X^2 = 9.882, df = 3, p = 0.01$, $X^2 = 9.882, df = 3, p = 0.017$ etc).

Fisher's least significant differences (LSD) tests are not acceptable as they are too permissive. ANOVA followed by an appropriate post-hoc test (ie Tukey-Kramer, etc) should be performed.

Discussion

This should be pertinent to the results. Speculative discussion is not discouraged provided it is based on the data presented. The discussion should be as concise as possible and well structured, using appropriate subheadings.

Conclusion

A short paragraph of conclusions (5 to 10 lines) should be included.

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.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. 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 the e-mail address is given and that contact details are 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. 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

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. 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 <https://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 and 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 editable 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 <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 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.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

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.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Drug nomenclature

Generic names should be used in text, tables and figures. Trade names and the name and city of their manufacturer may be mentioned in parentheses in the first text reference to the drug, but should not appear in titles, figures or tables. Chemical names could also be used. Code numbers could be given in brackets. When a trade name is used, it should be capitalized; general or chemical names are not capitalized. The chemical nature of new drugs must be given when known. The form of drug used in calculations of doses (e.g., base or salt) should be indicated.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- 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 online (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 online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. 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

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

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 management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/progress-in-neuropsychopharmacology-and-biological-psychiatry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

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 150 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 <https://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 <https://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.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers 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 <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

9. Anexo II

Cópias do Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP/FCL Assis, Registro nº 028/2011, e do parecer de 12 de novembro de 2014.



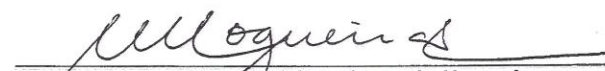
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "**Envolvimento do Hipocampo Ventral na ansiedade generalizada e no pânico**", Registro nº 028/2011, sob responsabilidade do(a) Pesquisador **Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido no período de março/2012 a março/2013, sendo que o Relatório Final deverá ser entregue em Abril/2013.

Assis, 15 de março de 2012.


Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER DA CEUA/FCL/UNESP-ASSIS

Registro nº: 028/2011
Título da Pesquisa: Envolvimento do Hipocampo Ventral na ansiedade generalizada e no pânico
Executores: Vinícius Dias Kümpel
Orientador Responsável: Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade

Foi **aprovada**, em reunião nesta data, a **prorrogação do prazo** para encerramento das atividades referentes ao presente protocolo até **agosto/2015**, devendo o Relatório Final ser entregue em **setembro/2015**.

Tal prorrogação justifica-se pelo período de suspensão dos trabalhos da CEUA enquanto aguardava liberação de autorização de funcionamento pelo CONCEA.

Assis, 12 de novembro de 2014.

Edislane Barreiros de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais