UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

A expressão do medo condicionado em ratos com fenótipos de baixa e
alta reatividade emocional: modulação neural serotoninérgica sobre as
diferenças de gênero

Renata Ferreira

RIBEIRÃO PRETO
2014

Renata Ferreira

A expressão do medo condicionado em ratos com fenótipos de baixa e
alta reatividade emocional: modulação serotoninérgica cortical e
subcortical sobre as diferenças de gênero

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área: Psicobiologia

Orientação: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do
Espírito Santo

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, R.

A expressão do medo condicionado em ratos com fenótipos de baixa e alta reatividade emocional: modulação serotoninérgica cortical e subcortical sobre as diferenças de gênero. 105 p.; 30 cm. Versão corrigida

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo.

1. Medo condicionado. 2. Machos. 3. Fêmeas. 4. Ciclo estral. 5. Córtex pré-límbico. 6. Amígdala basolateral. 7. Substância cinzenta periaquedutal. 8. Serotonina. 9. Sobressalto

Nome: Renata Ferreira

Título: A expressão do medo condicionado em ratos com fenótipos de baixa e alta reatividade emocional: modulação serotoninérgica cortical e subcortical sobre as diferenças de gênero

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, José e Izabel, que sempre me incentivam a ir atrás dos meus sonhos e me ensinam a ser uma pessoa melhor a cada dia, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Manoel Jorge pela orientação, incentivo, confiança e por me fazer acreditar cada vez mais na neurociência.

Ao Professor Dr. Marcus Lira Brandão pelo apoio e contribuição neste trabalho.

À Professora Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi pela contribuição e por ter sido assessora deste trabalho.

À Renata Vicentini Del Moro, pela atenção e apoios prestados.

Aos amigos do laboratório de Neuropsicofarmacologia, pela ajuda e conselhos.

À minha família: José, Izabel, Débora e Rafael, por acreditarem em mim e pelo apoio e amor incondicionais.

A toda minha enorme família: meu porto seguro.

Ao meu maior presente, amor e amigo, meu companheiro para todas as horas e ocasiões: Kadu.

Aos meus grandes amigos da turma 50 Biologia – UEL por estarem sempre presentes, em especial ao Estevan, Fabiana e Leonardo que me acompanharam diretamente durante todos esses anos.

A todos os meus amigos, de perto ou de longe, que fazem com que minha vida seja mais plena.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Ao apoio financeiro do CNPq e da FAPESP.

“Deveria ser sabido que o cérebro é a fonte do nosso prazer, alegria, riso e diversão, assim como nosso pesar, dor, ansiedade e lágrimas, e nenhum outro que não ele. É especificamente o órgão que nos habilita a pensar, ver e ouvir, a distinguir o feio do belo, o mau do bom, o prazer do desprazer.”

Hipócrates (460-379 a.C.)

RESUMO

FERREIRA, R. A expressão do medo condicionado em ratos com fenótipos de baixa e alta reatividade emocional: modulação serotoninérgica cortical e subcortical sobre as diferenças de gênero. 2014. 105 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Extensos dados na literatura têm assinalado a importância da serotonina (5-HT) na modulação de comportamentos de medo e ansiedade em roedores, a grande maioria utilizando ratos machos como sujeitos experimentais. No presente trabalho, foi analisada a influência da neurotransmissão 5-HT periférica e central sobre a expressão da resposta de medo condicionado e incondicionado de ratos machos e fêmeas, previamente selecionados pelo fenótipo como animais de baixa (BA) ou de alta (AA) reatividade emocional. Para este fim foi utilizado o teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM). A influência global e central de 5-HT foi avaliada pela utilização da administração sistêmica ou intraventricular aguda do inibidor irreversível da enzima triptofano hidroxilase PCPA (p-clorofenilalanina) nas doses de 200 mg/mL (i.p.) e 200 µg/5 µL (i.v.), ou através de infusões locais de 5-HT (10 nmol/0.2 µL) ou do agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) na dose de 0.3 µg/0.2 µL, diretamente em áreas encefálicas conhecidas por sua influência na modulação do medo e ansiedade a saber: o córtex pré-límbico (CPL), o núcleo basolateral da amígdala (BLA), e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) do mesencéfalo. As variáveis dependentes registradas foram a amplitude e a latência das respostas incondicionadas e condicionadas de sobressalto e a amplitude do SPM.

Palavras chave: Medo condicionado, machos, fêmeas, ciclo estral, córtex pré-límbico, amígdala basolateral, substância cinzenta periaquedutal, serotonina, sobressalto.

ABSTRACT

FERREIRA, R. The conditioned fear expression in rats with low- or high-anxiety phenotype: cortical and subcortical 5-HT influence on gender differences. 2014. 105 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Extensive data in the literature have signaled the importance of serotonin (5-HT) on the modulation of fear and anxiety-like behaviors in rodents. In the present study, we have analyzed the influence of peripheral and central 5-HT neurotransmission on the expression of the conditioned and unconditioned fear, and on the fear-potentiated startle in male and female rats previously selected as low- (LA) or high-anxiety (HA). For this purpose, we used the fear-potentiated startle (FPS) test. The global and central influence of 5-HT was evaluated by using the acute systemic or intraventricular administration of the irreversible tryptophan hydroxylase inhibitor PCPA (p-chlorophenylalanine - 200 mg/mL i.p., or 200 µg/5 µL i.v.). Local effects were evaluated through local infusions of 5-HT itself (10 nmol/0.2 µL) or the selective 5-HT_{1A} receptors agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT – 0.3 µg/0.2 µL) in the prelimbic cortex (PrL), basolateral amygdala (BLA) or the dorsal periaqueductal gray (DPAG). These brain regions were chosen for the present study based on their great importance in the modulation and expression of conditioned and unconditioned fear. Dependent variables recorded were the amplitude and latency of unconditioned and conditioned fear, and fear-potentiated startle (FPS).

Keywords: Conditioned fear, male rats, female rats, estrous cycle, prelimbic cortex, basolateral amygdala, dorsal periaqueductal gray, serotonin, startle.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT = serotonina (5-hidroxitriptamina)
8-OH-DPAT = 8-hidroxi-2-(dipropilamina) tetralina
AA = animal muito reativo (“alta ansiedade”)
AM = amígdala
ANOVA = análise de variância
ANOVA MR = análise de variância com medidas repetidas
BA = animal pouco reativo (“baixa ansiedade”)
BLA = núcleo basolateral da amígdala
CE = núcleo central da amígdala
CPF = córtex pré-frontal
CPF_l = córtex pré-frontal lateral
CPF_m = córtex pré-frontal medial
CPF_o = córtex pré-frontal orbital
CPL = córtex pré-límbico
Die 1 = diestro 1
Die 2 = diestro 2
DR = núcleo dorsal da rafe
Est = estro
EPM = erro padrão da média
LCE = labirinto em cruz elevado
MR = núcleo mediano da rafe
Pro = proestro
PBS = tampão fosfato salina
PCPA = p-cloro-fenil-alanina
SCP = substância cinzenta periaquedutal
SCP_d = substância cinzenta periaquedutal dorsal
SNC = sistema nervoso central
SPM = sobressalto potencializado pelo medo
VL = ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Ansiedade Humana e Ansiedade Experimental em Animais de Laboratório	13
1.2. Medo e Ansiedade: Bases Neurais	17
1.2.1. Córtex pré-frontal	17
1.2.2. Amígdala	19
1.2.3. Substância Cinzenta Periaquedutal	21
1.3. Ansiedade: Importância Funcional da Serotonina (5-HT)	22
1.4. Ansiedade e a Influência de Gênero.....	24
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	28
3. METODOLOGIA GERAL	30
3.1. Sujeito Experimental	31
3.2. Declaração de Ética.....	31
3.3. Cirurgia	31
3.4. Drogas	32
3.5. Procedimento para Microinjeção	32
3.6. Equipamentos	32
3.6.1. Caixas de Medida de Sobressalto	32
3.6.2. Caixas de Condicionamento.....	33
3.7. Procedimento Experimental	33
3.7.1. Sessões de Balanceamento - Seleção dos animais com baixa e alta ansiedade.....	33
3.7.2. Sessões de Condicionamento (treino)	34
3.7.3. Sessão Teste	34
3.8. Delineamento Experimental	35
3.8.1. Experimento 1	35
3.8.2. Experimento 2	35
3.8.3. Experimento 3	35
3.8.4. Experimento 4	36
3.9. Perfusão e Histologia	36
3.10. Análise Estatística	36
4. EXPERIMENTO 1.....	38
4.1. Animais	39
4.2. Cirurgia	39
4.3. Drogas e Doses.....	39
4.4. Procedimento para Microinjeção	39
4.5. Equipamentos	39
4.6. Grupos Experimentais	40
4.7. Procedimento Experimental	40
4.8. Perfusão e Histologia	40
4.9. Experimento 1A	40
4.9.1. Análise Estatística	40
4.9.2. Resultados	40
4.10. Experimento 1B	42
4.10.1. Análise Estatística	42
4.10.2. Resultados	42
4.11. Discussão.....	43
4.12. Conclusão.....	45
5. EXPERIMENTO 2.....	47
5.1. Animais	48
5.2. Cirurgia	48
5.3. Drogas e Doses.....	48
5.4. Procedimento para Microinjeção	49
5.5. Equipamentos	49
5.6. Grupos Experimentais	50

5.7. Procedimento Experimental	50
5.8. Perfusão e Histologia	50
5.9. Análise Estatística	50
5.10. Resultados	50
5.10.1. Córtex pré-límbico (CPL)	50
5.10.2. Amígdala basolateral (BLA)	52
5.10.3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd)	54
5.11. Discussão.....	56
5.12 Conclusão.....	61
6. EXPERIMENTO 3.....	62
6.1. Animais	63
6.2. Cirurgia	63
6.3. Drogas e Doses.....	63
6.4. Procedimento para Microinjeção	63
6.5. Equipamentos	63
6.6. Procedimento para Esfregaço Vaginal	64
6.7. Grupos Experimentais	65
6.8. Procedimento Experimental	65
6.9. Perfusão e Histologia	65
6.10. Análise Estatística	66
6.11. Resultados	66
6.12. Discussão.....	70
6.13. Conclusão.....	74
7. EXPERIMENTO 4.....	75
7.1. Animais	76
7.2. Cirurgia	76
7.3. Drogas e Doses.....	76
7.4. Procedimento para Microinjeção	76
7.5. Equipamentos	76
7.6. Procedimento para Esfregaço Vaginal	76
7.7. Grupos Experimentais	77
7.8. Procedimento Experimental	77
7.9. Perfusão e Histologia	77
7.10. Análise Estatística	77
7.11. Resultados	78
7.12. Discussão.....	81
7.13 Conclusão.....	84
8. CONCLUSÃO GERAL	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
10. ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade Humana e Ansiedade Experimental em Animais de Laboratório

A ansiedade é uma característica humana, complexa e multifatorial. De modo geral, é um estado de apreensão que se desenvolve em antecipação a uma ameaça ou perigo, auxiliando o organismo na sua adaptação ao ambiente, já que promove certo grau de vigilância e facilita o comportamento de fuga (GROSS; HEN, 2004). Sua desregulação em humanos pode resultar em vários transtornos de ansiedade, apresentando alta taxa de comorbidade com outras doenças psiquiátricas como os transtornos do humor, em particular a depressão (DSM IV).

Em princípio, estar ansioso é uma reação naturalmente adaptativa. Alterações comportamentais e fisiológicas que acompanham a ansiedade preparam o indivíduo para reagir adequadamente às diversas demandas ambientais e, principalmente, permite ao indivíduo tanto escapar de situações percebidas como perigosas, quanto evitá-las (LIVESEY, 1986). No entanto, as variantes patológicas da ansiedade podem de forma intensa interferir de forma negativa na vida diária das pessoas afetadas. Os transtornos de ansiedade são relatados como sendo as doenças psiquiátricas mais prevalentes. Caracterizam-se principalmente pela presença de medo excessivo, tipicamente em resposta a objetos ou situações muitas vezes inócuas ou ainda que não representam ou sinalizam perigo (SHIN; LIBERZON, 2010). De fato, indivíduos que apresentam transtornos de ansiedade experimentam reduzida qualidade de vida, bem como deficiência notável em sua produtividade no trabalho (WITTCHEN *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram inequivocamente o aumento substancial nos gastos dos sistemas de saúde associados aos transtornos de ansiedade (DUPONT *et al.*, 1996; GREENBERG *et al.*, 1999; WITTCHEN, 2002).

Alguns indivíduos experienciam de forma consistente níveis elevados de ansiedade ao longo de sua vida sugerindo que o comportamento ansioso, além de poder persistir por longos períodos de tempo, apresenta diferenças fundamentais em sua composição (KAGAN; SNIDMAN, 1999). Essas diferenças provavelmente se desenvolveram como resultado das singularidades na composição genética de cada indivíduo bem como das influências do ambiente ao qual foram expostos durante sua vida (GROSS; HEN, 2004). Estudos com gêmeos confirmam esta hipótese. Uma análise das frequências de transtornos de ansiedade em gêmeos monozigóticos e gêmeos dizigóticos revela que aproximadamente 30 a 40% das diferenças observadas podem ser atribuídas à variação genética, enquanto que restante 60 a 70% pode ser atribuído as interações do organismo com seu ambiente (HETTEMA; NEALE; KENDLER, 2001). Ou seja, os transtornos de ansiedade apresentam em sua base uma forte

influência do componente genético mas sua expressão fenotípica final é altamente dependente de fatores ambientais (LEONARDO; HEN, 2006) (Figura 1).

Figura 1 – Durante o desenvolvimento, fatores genéticos e ambientais interagem para definir o nível de ansiedade traço no encéfalo adulto. Neste momento, os circuitos podem ser modificados usando abordagens farmacológicas e psicoterapêuticas que podem induzir mudanças compensatórias nos circuitos subjacentes reguladores da expressão do comportamento ansioso. Adaptado de Leonardo e Hen (2006).

A ansiedade é uma emoção essencial altamente conservada durante a evolução. Em interação com os parâmetros cognitivos, ela regula o comportamento em humanos e outros animais (OHL, 2005). Modelos animais são frequentemente utilizados para testar supostos compostos ansiolíticos (PELLOW; FILE, 1986; RODGERS *et al.*, 1997), no estudo dos mecanismos neurobiológicos de ansiedade (HANDLEY *et al.*, 1993; KULIKOV *et al.*, 1997; ROOZENDAAL *et al.*, 1997) e na tentativa de elucidar as bases genéticas da emocionalidade (FLINT *et al.*, 1995; STENZEL-POORE *et al.*, 1994). Em animais, no entanto, a ansiedade não pode ser diretamente analisada; tampouco se pode inclusive afirmar a existência de tal fenômeno em roedores; classe animal mais utilizada em pesquisas de laboratório. Neste caso, o pesquisador tem que contar com o auxílio de modelos animais específicos dos quais extrai alguns parâmetros comportamentais, o que possibilita a inferência de certo estado emocional. No entanto, considerações evolutivas sugerem que características comportamentais relacionadas à ansiedade são comuns e fortemente conservadas entre as espécies, particularmente mamíferos (LIEBSCH *et al.*, 1998). As limitações da pesquisa em seres humanos, no entanto, exigem modelos animais apropriados. Durante décadas, os roedores

provaram ser excelentes modelos animais para o avanço da medicina como um todo e estão se tornando cada vez mais importantes para a investigação em psiquiatria (GEYER; MARKOU, 1995).

A decisão de criar seletivamente ratos com características extremas tanto em emotividade quanto em cognição foi feita em Leipzig, Alemanha na década de 1980. Neste momento, tornou-se cada vez mais evidente que essas duas características são fenômenos intimamente relacionados (LANDGRAF; WIGGER, 2002). Uma abordagem complementar foi a criação de um fenótipo de comportamento robusto e extremo para a ansiedade para, em seguida, procurar os correlatos encefálicos deste comportamento. Ao fazer isso, Landgraf e Wigger (2002), no início da década de 90, tentaram desenvolver um modelo animal tão perto do modelo clínico quanto possível. Os animais foram selecionados de acordo com os resultados obtidos no bem conhecido teste de labirinto em cruz elevado (LCE). Esse teste é relativamente simples, amplamente utilizado, incondicionado e etologicamente relevante (HOGG, 1996; RODGERS *et al.*, 1997; WALL; MESSIER, 2001). Com base nestes resultados os autores estabeleceram duas linhagens, caracterizadas por apresentarem alto (AA) ou baixo (BA) comportamento relacionado à ansiedade. Ratos AA de ambos os sexos gastam menos tempo nos braços abertos e entram neles com pouca frequência. Geralmente, a média de tempo gasto nos braços abertos é menor do que 5% para ratos AA e maior do que 50% para ratos BA (LANDGRAF; WIGGER, 2002). Neste contexto, é importante notar que estas diferenças não são devidas a diferenças na atividade locomotora pois os níveis de ansiedade também foram detectados no campo aberto (LIEBSCH *et al.*, 1998) e no teste de interação social (HENNIGER *et al.*, 2000; SALOMÉ *et al.*, 2004) entre outros (LANDGRAFF; WIGGER, 2002). Utilizando critérios de extrapolação seus animais AA tiveram (e ainda tem) que apresentar certos padrões possivelmente associados aos sintomas de pacientes psiquiátricos que sofrem de transtornos de ansiedade e depressão. Os autores argumentaram que ratos com “ansiedade traço” (AA) são modelos experimentais úteis porque permitem a identificação de vias intracerebrais e circuitos subjacentes ao comportamento relacionado à ansiedade, são sensíveis ao tratamento com antidepressivos/ansiolíticos, e permitem identificar genes e polimorfismos relacionados (LANDGRAF; WIGGER, 2002). Cumpre notar que ansiedade traço se apresenta como uma característica permanente do indivíduo, ao passo que ansiedade estado é uma condição transitória apenas observável em momentos especiais (LISTER, 1990).

Ratos com fenótipo AA, os quais apresentam uma fuga natural dos braços abertos do LCE como já visto, apresentam também concomitante elevada amplitude de sobressalto, como atestado pelo aumento nas respostas incondicionadas e condicionadas de medo, em comparação com ratos com fenótipo BA (EZEQUIEL LEITE; NOBRE, 2012). Estudos utilizando ratos previamente selecionados com genótipos ou fenótipos BA e AA têm mostrado que a reatividade dos animais BA difere dos animais AA (EZEQUIEL LEITE; NOBRE, 2012; HENNIGER *et al.*, 2000; LIEBSCH *et al.*, 1998). A resposta de sobressalto potencializado pelo medo (SPM) provou ser útil na análise dos sistemas neurais envolvidos no medo e na ansiedade, sendo sensível a uma variedade de drogas clinicamente utilizadas como ansiolíticos, tais como o benzodiazepínico diazepam e o agente serotoninérgico buspirona (DAVIS *et al.*, 1993).

No campo da cognição, indivíduos com alta ansiedade apresentam padrão cognitivo característico, caracterizado por alterações no processamento do estímulo aversivo, incluindo atenção seletiva ao estímulo e características relacionadas, assim como atribuição de valência negativa a estímulos ambíguos além de aumento nas respostas condicionadas de medo (BISHOP, 2007). Vale ressaltar que déficits neuropsicológicos têm sido observados nos níveis de funções executiva, atenção, memória de trabalho e aprendizagem de novas tarefas (CASTANEDA *et al.*, 2008). No nível das alterações funcionais e da dinâmica neural, grande ênfase tem sido dada a dois tipos de anormalidades observadas em indivíduos altamente ansiosos durante o processamento da informação sensorial: uma relacionada à ativação dos núcleos amigdalóides, e outra relacionada à sua ligação funcional com outras regiões do sistema nervoso central (SNC). Em um estudo que utilizou a técnica de neuroimagem, foi demonstrado que portadores de desordens de ansiedade apresentam aumento pronunciado na ativação da amígdala quando confrontados com estímulos subjetivos de medo (MCCLURE *et al.*, 2007).

Tendo em conta que o medo excessivo é um componente chave dos distúrbios da ansiedade, não é de estranhar que a busca pelos neurocircuitos da ansiedade tenha suas raízes intimamente entrelaçadas com os estudos do circuito do medo em modelos animais (SHIN; LIBERZON, 2010). Dentre os principais componentes deste circuito se incluem algumas regiões do **córtex pré-frontal medial (CPFm)**, córtex insular, núcleo accumbens, hipocampo, núcleos talâmicos, **amígdala (AM)**, hipotálamo ventromedial, **substância cinzenta periaquedutal (SCP)**, e alguns outros núcleos do tronco cerebral (DAVIS, 2006; QUIRK; MUELLER, 2008). Este circuito consiste em áreas interligadas do encéfalo que

participam do processamento do estímulo e do comportamento defensivo (LEDOUX, 2000; ÖHMAN; MINEKA, 2001; ROSEN, 2004). Tem sido proposto que o CPFm regula o comportamento de medo modulando a atividade da AM e da SCP (PARÉ; QUIRK; LEDOUX, 2004; PRICE, 2005; PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009).

1.2. Medo e Ansiedade: Bases Neurais

1.2.1. Córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (CPF) é uma região encefálica bastante estudada por vários pesquisadores das áreas da emoção, memória, atenção e processos cognitivos de alta ordem, relacionados com a capacidade de planejamento de ações e de previsão de consequências (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004; SEAMANS; LAPISH; DURSTEWITZ, 2008). Corresponde à porção mais anterior do lobo frontal. A elaboração, definição e delimitação de critérios neuroanatômicos do CPF é tarefa muito complexa, pois sua variabilidade de espécie para espécie é marcante (KOLB, 1984). Anatomicamente, essa região é definida como aquela que recebe projeções do tálamo dorsomedial e se localiza a frente do córtex motor e pré-motor no lobo frontal. Entretanto, não se trata de uma região homogênea. Ao contrário, é composta por diversas sub-regiões que apresentam características anatômicas e funcionais distintas (KOLB, 1984; DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004). Até o momento, foram identificadas cinco regiões córtico-frontais no rato: uma área do cíngulo anterior, uma área pré-límbica e infra-límbica, uma área orbital, uma área insular agranular (dorsal e ventral) e uma pequena faixa do córtex pré-central (KOLB, 1984). Essas regiões podem ser ordenadas em três grandes grupos: córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex pré-frontal orbital (CPFo) e córtex pré-frontal lateral (CPFo) (KOLB, 1984; 1990) ([Figura 2](#)). O CPFm, através de suas subdivisões medial (pré-límbico) e ventral (infra-límbico), é comumente envolvido no paradigma do medo condicionado (LAUZON; LAVIOLETTE, 2010; PAPE; PARÉ, 2010), um sistema de aprendizagem discriminativa baseado no modelo Pavloviano ou condicionamento aversivo clássico (DELAMATER, 2012).

O CPF recebe, diretamente ou através do tálamo, fibras do hipotálamo, da substância cinzenta periaquedutal (SCP) e da amígdala (AM). Particularmente, as eferências que partem da AM são direcionadas principalmente para o CPFm (KOLB, 1984; PRICE, 1999). O CPF envia fibras para praticamente todas as estruturas das quais recebe aferências (FUSTER, 2001). Assim, suas eferências projetam-se para outras áreas corticais e para várias estruturas encefálicas, tais como o hipocampo, os núcleos da base, o hipotálamo, a SCP e a AM (KOLB,

1984; FUSTER, 2001). Muitos estudos apontam para um papel regulador do CPF sobre as reações de medo e estresse regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (LACROIX *et al.*, 2000; SULLIVAN; GRATTON, 2002), e pela SCP e AM (MCDONALD, 1998; PRICE, 1999; DAVIDSON, 2002).

Figura 2 – Diagrama esquemático de uma seção coronal do córtex pré-frontal de rato, com as principais subdivisões. AC = cingulado anterior, PL = pré-límbico, IL = infra-límbico, VO = orbitofrontal ventral, LO = orbitofrontal lateral. Adaptado de Leuner e Shors (2013).

Até a data, tem sido bem estabelecido que as interações entre o CPL e a amígdala basolateral (BLA) são subjacentes ao processamento da memória do medo, principalmente através da aquisição e consolidação da aprendizagem do medo condicionado (STEVENSON, 2011). Além disso, alguns estudos mostram que a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) tem função importante na modulação das respostas de medo condicionado (LAUZON; LAVIOLETTE, 2010; PAPE; PARÉ, 2010), particularmente no processamento e expressão das respostas de medo a estímulos aversivos intensos (MOBBS *et al.*, 2007).

O CPF recebe impulsos extremamente densos dos centros neuromoduladores do tronco cerebral e do prosencéfalo, incluindo os núcleos serotoninérgicos da rafe. Destes núcleos, particularmente dos núcleos dorsal e mediano, partem fibras serotoninérgicas que se direcionam para diversas sub-regiões do CPF aí incluídos o cíngulo e os córtices pré e infra-límbico (IL) (GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000). A exposição a estímulos condicionados de medo aumenta o metabolismo de serotonina (5-HT) no CPFm, um efeito abolido pela administração do benzodiazepínico diazepam (YOSHIOKA *et al.*, 1995). Além disso, mecanismos serotoninérgicos exercem influência inibitória sobre as regiões encefálicas que pertencem ao sistema encefálico aversivo (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010), tais como o hipotálamo e a SCPd (MOREIRA *et al.*, 2013). O CPF é altamente enriquecido com

receptores dos tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (POMPEIANO; PALACIOS; MENGOD, 1992; 1994). Os receptores 5-HT_{1A} são geralmente considerados inibitórios, enquanto os 5-HT_{2A} são excitatórios. No rato, 60% dos neurônios piramidais pré-frontais expressam receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (POMPEIANO; PALACIOS; MENGOD, 1992). Curiosamente, cerca de 80% destes neurônios co-expressam ambos os receptores (AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004; PUIG *et al.*, 2010), apesar das influências opostas que exercem sobre a excitabilidade neuronal. Os receptores 5-HT_{1A} são encontrados em corpos celulares e dendritos, principalmente na região dos núcleos da rafe (receptores pré-sinápticos) e em terminais de liberação de 5-HT (receptores pós-sinápticos) (POPOVA; NAUMENKO, 2013).

1.2.2. Amígdala

Estrutura fascinante e complexa, no campo das emoções a amígdala (AM) é conhecida por seu importante envolvimento no processamento das respostas de medo condicionado e incondicionado e também em uma ampla gama de funções, abrangendo dimensões negativas e positivas (PESSOA, 2010). Localizada bilateralmente e profundamente no lobo temporal anterior do encéfalo, a AM, anatomicamente, é uma estrutura complexa que possui mais de uma dúzia de núcleos ricamente interligados (Figura 3).

Figura 3 – Os núcleos central (CE) e do complexo basolateral (B: núcleo basal; L: núcleo lateral; AB: núcleo acessório basal), são apresentados, entre outros núcleos da amígdala. Para as abreviaturas restantes, ver Aggleton e Saunders (2000).

Com base em vários tipos de informações, incluindo a conectividade e a distribuição de neurotransmissores, e dada sua complexidade, alguns autores até questionaram se é viável

considerar este conjunto de núcleos como uma unidade anatômica-funcional (AGGLETON; SAUNDERS, 2000). Embora este problema esteja longe de ser resolvido, é útil considerar pelo menos duas subdivisões da AM, uma envolvendo a AM basolateral (incluindo os núcleos lateral, basal e acessório basal) e outra a AM central (envolvendo o núcleo central) (CARDINAL *et al.*, 2002).

Várias funções têm sido atribuídas à AM como memória, atenção, interpretação de significado emocional de estímulos sensoriais e elaboração e produção de reações emocionais de medo (LEDOUX, 1994; MCGAUGH, 2004; EHRLICH *et al.*, 2009). Do ponto de vista anátomo-funcional, sabe-se que a AM, através de seu núcleo basolateral (BLA), tem um papel fundamental na consolidação da valência emocional das memórias, particularmente aquelas de cunho aversivo, assim como na influência sobre a resposta comportamental induzida pela exposição a um estímulo estressor (PARÉ, 2003; MCGAUGH, 2004). Além disso, este núcleo influencia profundamente a formação e a extinção de memórias relacionadas a estímulos que produzem medo (MAREN, 1999; ANGLADA-FIGUEROA; QUIRK, 2005). Essa influência sofre a modulação de uma região recente no desenvolvimento do SNC dos mamíferos, a área cortical pré-frontal. O descompasso funcional entre essas regiões parece estar subjacente à dificuldade de extinção de memórias de teor aversivo tanto em seres humanos como em animais de laboratório (HOFMANN, 2008). Todas estas alterações estão vinculadas à ativação autonômica (hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), o que leva ao aumento nos níveis de glicocorticóides (LANDGRAF; WIGGER, 2003), particularmente no BLA (KAVUSHANSKY; RICHTER-LEVIN, 2006; DUVARCI; PARÉ, 2007), levando por sua vez a aumentos nos níveis de CRF nos núcleos central da AM e no CPF (MERALI *et al.*, 2008).

As conexões entre o CPFm e a AM são conhecidas por serem críticas na regulação da ansiedade (AKIRAV; MAROUN, 2007), na qual a 5-HT cumpre papel fundamental (OLIVIER; VINKERS; OLIVIER, 2013). Aumentos nos níveis extracelulares de 5-HT foram encontrados no CPFm (YOSHIOKA *et al.*, 1995; HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1999) e na AM (KAWAHARA *et al.*, 1993) após o condicionamento do medo contextual.

Pesquisas nos últimos 15 anos documentaram que os portadores de variações genéticas humanas associadas ao sistema de transmissão serotoninérgica exibem padrões alterados de ativação da AM mediante apresentação de estímulos emocionais (HARIRI *et al.*, 2002; CANLI; LESCH, 2007). Estudos experimentais em modelos animais com componentes da via de sinalização de 5-HT geneticamente modificados mostraram que variações nos genes que

modulam a transmissão serotoninérgica tem um impacto significativo no desenvolvimento estrutural, nas propriedades neuroquímicas e nas funções da AM (FERNANDEZ; GASPAR, 2011; NIETZER *et al.*, 2011; MAHAN; RESSLER, 2012).

1.2.3. Substância Cinzenta Periaquedutal

O termo substância cinzenta periaquedutal (SCP) designa a região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. É conservada entre espécies de vertebrados (peixes ósseos e cartilaginosos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) (KINGSBURY *et al.*, 2011; STEPHENSON-JONES *et al.*, 2011). Sua posição anatômica, entre o rombencéfalo e o diencéfalo, lhe proporciona uma localização privilegiada, participando de vários sistemas sensoriais ascendentes e de trajetos sensoriais descendentes. Esta condição sugere que a SCP está interligada a um grande número de redes neurais que coordenam estratégias distintas para enfrentar diferentes tipos de ameaças, como estímulos estressores e dolorosos (BEITZ, 1985). Utilizando critérios morfológicos, a SCP do rato foi dividida, inicialmente, em quatro sub-regiões: medial, dorsal, dorsolateral e ventrolateral (BEITZ, 1985; BEITZ; SHEPARD, 1985). Posteriormente, Carrive (1993), e Bandler e Shipley (1994), propuseram a divisão da SCP em quatro colunas longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal, assim nomeadas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Figura 4).

Figura 4 – Ilustração esquemática das colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral da SCP (da esquerda para a direita) rostral, intermediária (duas seções) e caudal de rato. Adaptado de Linnman *et al.* (2012).

Estas colunas estão interconectadas e, além dos neurônios de saída há uma rede vasta e intrínseca de conexões envolvidas na ativação e inibição de cada uma. Vários estudos demonstraram que a SCP também possui conexões recíprocas com estruturas do sistema

encefálico aversivo, como o colículo inferior (BEITZ *et al.*, 1986; EICHENBERGER *et al.*, 2002) e a AM (RIZVI *et al.*, 1991). A SCP recebe aferências e envia eferências a diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (BANDLER; CARRIVE; ZHANG, 1991). Ao longo dos anos, vários estudos comportamentais têm mostrado que a SCP é uma estrutura crítica na seleção, organização e no comando das reações defensivas comportamentais e neurovegetativas (BEHBEHANI, 1995; BRANDÃO *et al.*, 1999). Embora o papel da SCP nos mecanismos associados ao medo e à ansiedade incondicionados esteja bem caracterizado, a literatura também mostra seu envolvimento em aspectos relacionados ao aprendizado de respostas emocionais condicionadas (DI SCALA *et al.*, 1987; DE OCA *et al.*, 1998), particularmente no processamento de altos níveis de medo (LAUZON; LAVIOLETTE, 2010; MOBBS *et al.*, 2007; PAPE; PARÉ, 2010;). A inativação de sua coluna dorsal (SCPd) com a utilização do agonista de receptores GABA_A muscimol bloqueia a resposta de sobressalto potencializado pelo medo (SPM), induzida pela exposição a um contexto aversivo (REIMER; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). Lesões de suas colunas dorsal ou lateral causam prejuízo nesta resposta (FENDT; KOCH; SCHNITZLER, 1996); apesar destas lesões não produzirem qualquer efeito sobre a resposta incondicionada de sobressalto (resposta reflexa a um ruído sonoro intenso) (FENDT; KOCH; SCHNITZLER, 1994).

O sistema serotoninérgico está diretamente relacionado à modulação dos transtornos de ansiedade, dentre os quais o ataque de pânico. Na área experimental estudos que utilizaram o modelo de estimulação elétrica intracerebral mostraram que a modulação dessa resposta está diretamente relacionada a ativação de receptores 5-HT (BRANDÃO *et al.*, 1991; GRAEFF, 2004). Estudos eletrofisiológicos descobriram que a SCPd é rica em receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ (BRANDÃO *et al.*, 1991; LOVICK, 1993). Como tal, a ativação desses receptores apresenta um efeito inibitório sobre os substratos neurais da aversão na SCPd (CASTILHO; BRANDÃO, 2001).

1.3. Ansiedade: Importância Funcional da Serotonina (5-HT)

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), amina biogênica descoberta há quase 60 anos, está amplamente distribuída no SNC. Os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco encefálico que estão organizados ao longo da linha média, originando projeções ascendentes e descendentes (GRAEFF, 1997; HALE; LOWRY, 2011). Os núcleos mesencefálicos – particularmente os núcleos dorsal (DR) e mediano da rafe (MR) – inervam o prosencéfalo,

com destaque para a AM, bem como o teto mesencefálico, com destaque para a SCPd (GRAEFF, 1997; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997). É um neurotransmissor evolutivamente antigo e implicado numa grande variedade de processos comportamentais. Baseado em características farmacológicas, estruturais e de transdução, os receptores 5-HT são classificados em sete subfamílias, 5-HT₁ a 5-HT₇, que compreendem 14 subtipos de receptores associados com genes únicos. Com exceção dos receptores 5-HT₃ que são canais iônicos, os receptores 5-HT estão acoplados a uma proteína G, através da qual exercem os seus efeitos sobre a atividade neuronal (HOYER *et al.*, 1994).

Em 1991, Deakin e Graeff propuseram pela primeira vez a hipótese de que diferentes subpopulações de neurônios serotoninérgicos do DR e MR, através de projeções topograficamente organizadas, direcionadas a diferentes alvos cerebrais, tinham funções originais que eram relevantes para a fisiopatologia dos transtornos afetivos e de ansiedade (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF *et al.*, 1996). Estas diferentes subpopulações de neurônios serotoninérgicos incluem: (1) neurônios serotoninérgicos do DR, que se projetam para a SCPd inibindo as respostas fisiológicas e comportamentais do tipo pânico/fuga, (2) neurônios serotoninérgicos do DR, que se projetam para a AM facilitando a expressão do medo condicionado e da ansiedade, e (3) neurônios serotoninérgicos do MR, que apresentam a capacidade de aumentar a resiliência ao estresse e mediar os efeitos do tipo antidepressivo (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF *et al.*, 1996).

Estudos têm demonstrado que a ativação seletiva de alguns receptores serotoninérgicos pode servir como agente terapêutico na melhora das funções cognitivas de pacientes psiquiátricos (TERRY; BUCCAFUSCO; WILSON, 2008). Por outro lado, sabe-se que esta amina biogênica tem função importante nos circuitos neurais que medeiam as respostas condicionadas e incondicionadas de medo relacionadas ao transtorno de pânico e ao distúrbio de ansiedade generalizada, particularmente através de sua ação sobre os neurônios da BLA e da SCP do mesencéfalo (ZANOVELI *et al.*, 2009). Foi demonstrado que as alterações no controle que o CPF exerce sobre as funções da AM podem resultar em perseverança emocional (MORGAN; ROMANSKI; LEDOUX, 1993; MORGAN; SCHULKIN; LEDOUX, 2003). É possível então que as diferenças individuais observadas em portadores de desordens de pânico e de ansiedade sejam produto de alterações cognitivas (CPF) que acentuam a valência emocional (BLA) negativa dos diversos estímulos aversivos induzindo, por sua vez, respostas exageradas de medo (SCP) a estímulos normalmente inócuos.

Em indivíduos que apresentam traço de ansiedade patológica, o estado anormal de comportamento defensivo é mantido, mesmo após o sinal de ameaça ter desaparecido (ETKIN; WAGER, 2007; SHIN; LIBERZON, 2010); padrão de resposta também observado em roedores (LIEBSCH *et al.*, 1998; HENNIGER *et al.*, 2000; EZEQUIEL LEITE; NOBRE, 2012). Supõe-se que essa predisposição inata para responder pode resultar de mudanças na neurotransmissão 5-HT no CPL, na BLA e na SCPd. Isto poderia explicar as diferenças observadas entre indivíduos de baixa (BA) e de alta ansiedade (AA). As mudanças na atividade do sistema serotoninérgico no cérebro têm sido relacionadas, de forma considerável, ao surgimento de uma gama de distúrbios do comportamento, incluindo os transtornos de ansiedade. Além disso, o receptor 5-HT_{1A} foi considerado como modulador de ansiedade nas suas formas normais e patológicas (ALTIERI *et al.*, 2013; POPOVA; NAUMENKO, 2013). Estudos em humanos e roedores sugerem que estes receptores estão envolvidos numa variedade de processos fisiológicos e patológicos, tais como aprendizagem, memória, esquizofrenia, mal de Parkinson e na etiologia e tratamento de desordens de humor e de ansiedade (POLTER; LI, 2010; STROBEL *et al.*, 2003).

1.4 Ansiedade e a Influência de Gênero

Sabe-se que os distúrbios de ansiedade, tais como o transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno do pânico e fobias diversas são mais prevalentes em mulheres do que homens (PIGOTT, 2003). A flutuação dos hormônios ovarianos, como o estrógeno e a progesterona, tem sido associada a mudanças no humor (HIROI; NEUMAIER, 2006). O encéfalo feminino, ao contrário de sua contraparte masculina, opera num ambiente de mudanças químicas causadas pela produção cíclica de hormônios sexuais durante o ciclo menstrual (ciclo estral em animais) (LOVICK, 2012). Assim como as mulheres, roedores do sexo feminino apresentam mudanças no ciclo estral ligadas à capacidade de resposta em situações estressantes. Em geral, níveis mais elevados de ansiedade e capacidade de resposta ao estresse de intensidade leve, têm sido relatados na fase não receptiva do ciclo (diestros) em comparação com a fase receptiva (proestro e estro) em ratos e camundongos (LOVICK, 2012). Ao contrário das mulheres, nas quais a fase lútea tardia (pré-menstrual) é caracterizada pela queda dos níveis de estrógeno e progesterona, o diestro 2 em ratas está relacionado com a rápida queda apenas na concentração plasmática de progesterona, enquanto a secreção de estrógeno permanece em nível baixo e estável (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974) (Figura 5).

CICLO ESTRAL DE ROEDORES

Figura 5 – Padrão esquemático do ciclo estral de 4 dias da rata que descreve as concentrações de estradiol, de progesterona e do hormônio luteinizante (LH) no soro. A ovulação normalmente ocorre durante as primeiras horas da manhã do estro, aproximadamente 10 a 12 horas após o surgimento de LH. Blocos sombreados na base da figura indicam o ciclo claro-escuro (14-10h). Adaptado de Goldman, Murr e Cooper (2007).

A progesterona apresenta a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e sua queda de concentração no encéfalo pode ser o principal fator que desencadeia o aumento da resposta ao estresse agudo durante o diestro 2 em ratas e, por analogia, durante a fase lútea tardia em mulheres. Em apoio a esta ideia, alterações comportamentais semelhantes às observadas no diestro 2 podem ser induzidas em ratas através da retirada a longo prazo de progesterona exógena (SMITH *et al.*, 1998; GANGISETTY; REDDY, 2010). O comportamento cíclico durante o diestro 2 portanto, parece oferecer um modelo útil para estudar o papel da progesterona no desenvolvimento da síndrome pré-menstrual em mulheres (LOVICK, 2012).

O potencial impacto das variações hormonais entre os sexos sobre o resultado de determinada pesquisa, bem como flutuações hormonais cíclicas normais em fêmeas, exige a disponibilização de informações mais detalhadas sobre o ciclo reprodutivo da rata (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005). A influência do ciclo estral sobre seu comportamento é conhecida desde o início do século XX, porém apenas a partir da década de

70 começaram os estudos direcionados a avaliar o impacto das diferenças de gênero. Ainda assim, há poucos estudos que investigam as diferenças do ciclo estral em relação aos modelos animais, particularmente pelos problemas gerados para o controle das diversas fases do ciclo.

O ciclo estral em ratas possui quatro fases: proestro, estro, diestro 1 (metaestro) e diestro 2. Para a maioria das ratas, o ciclo estral dura 4 dias (EVANS; LONG, 1922; MANDL, 1951). Algumas apresentam ciclos de 5 dias, possuindo um dia adicional de estro ou diestro 2, possivelmente devido à secreção prolongada de progesterona (EVANS; LONG, 1922; NEQUIN; ALVAREZ; SCHAWARTZ, 1979). O ciclo estral é considerado irregular quando as fases não estão em sequência ou quando uma única fase dura de 4 a 5 dias (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

A fase do ciclo estral pode ser determinada pela visualização microscópica de amostras de células obtidas a partir da superfície do epitélio vaginal, cujas diferenças resultam como resposta às alterações morfológicas quando suas células descamam (EVANS; LONG, 1922). O proestro dura de 12 a 14 horas e é caracterizado por células nucleadas de tamanho uniforme. Durante esta fase, o epitélio vaginal é composto de 9 a 12 camadas de células maduras na superfície. No final do proestro, a camada superficial de células maduras do epitélio descama. A próxima etapa, o estro, dura de 25 a 27 horas e distingue-se pelo aparecimento de células cornificadas de forma irregular, não-nucleadas. A queratinização de células epiteliais vaginais que tipicamente caracteriza o dia do estro é uma resposta ao aumento do nível de estradiol que começa no diestro 2 e seu pico acontece ao redor do meio-dia no proestro. Esse aumento no nível de estradiol sensibiliza o hipotálamo e a pituitária que desencadeia a liberação do hormônio luteinizante, ocorrendo a ovulação no início do estro (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Durante o próxima fase, no diestro 1, com duração de 6 a 8 horas, os leucócitos infiltram no epitélio vaginal devido ao declínio na secreção de estrógeno e passam para o canal vaginal (MONTES; LUQUE, 1988). Essa fase é caracterizada por um pequeno número de células nucleadas e predominância de leucócitos. Durante o diestro 2, que dura 55 a 57 horas, mais do que metade do ciclo, o epitélio atinge o seu ponto mais fino (4 a 7 camadas). É durante essa fase que a degeneração do epitélio para e sua espessura aumenta novamente (EVANS; LONG, 1922). Leucócitos, células nucleadas e cornificadas estão presentes durante esta fase.

Embora as avaliações da citologia vaginal em roedores no laboratório possa fornecer uma valiosa reflexão sobre a integridade do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, outros índices são mais úteis em humanos para determinar o estado funcional do sistema reprodutivo (fluxo

menstrual, temperatura basal do corpo, alterações no pH vaginal, níveis de hormônio no sangue). No entanto, muitos dos mecanismos envolvidos na regulação do eixo reprodutivo são semelhantes em todas as espécies, particularmente as mediadas através do estrógeno (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Portanto, o estudo da influência do ciclo estral sobre o comportamento, em roedores, pode fornecer uma visão adicional sobre os potenciais efeitos adversos das alterações hormonais em mulheres.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

De forma geral, o presente trabalho teve como objetivo principal analisar a influência da neurotransmissão serotoninérgica de regiões encefálicas conhecidas por sua ação modulatória na expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, previamente classificados por apresentarem baixa ou alta reatividade emocional (ansiedade estado x ansiedade traço), como atestado pelo registro da amplitude e latência da resposta de sobressalto, utilizando como modelo experimental o teste do sobressalto potencializado pelo medo (SPM).

As questões a serem respondidas foram:

1. A modulação serotoninérgica do medo condicionado sofre influência diferencial de estruturas corticais, subcorticais e mesencefálicas?
2. Se sim, esta ação é generalizada para as respostas condicionadas e incondicionadas de medo?
3. Ratos previamente selecionados como pouco ou muito reativos (ansiosos) irão apresentar também respostas diferenciadas à manipulação farmacológica?
4. Os aspectos citados vão sofrer influência dos hormônios ovarianos?

Nossa hipótese de trabalho admite que, tomando como base o controle *top-down* da expressão da resposta incondicionada de medo, o controle 5-HT das áreas corticais e subcorticais prevalecerão sobre a expressão do medo incondicionado de ratos AA, mas não sobre as respostas de medo incondicionado em ratos BA. Por outro lado, admitimos *a priori* que as repostas incondicionadas de medo dos animais AA serão passíveis da ação tipo ansiolítica do agonismo dos receptores 5-HT no teto do mesencéfalo. Supomos também que ratas testadas em diferentes fases do ciclo estral serão suscetíveis aos efeitos tipo ansiolíticos dos agentes serotoninérgicos utilizados, particularmente aquelas testadas em períodos de baixos níveis hormonais.

3. METODOLOGIA GERAL

3.1. Sujeito Experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, com peso aproximado de 230/250g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da USP-RP. Os animais foram mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno (45,0 × 35,0 × 15,0 cm) em um biotério setorial, com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com água e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acesas às 07h00min da manhã.

3.2. Declaração de Ética

Os experimentos foram conduzidos com a aprovação formal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA nº 12.1.144.53.7), sendo realizados em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). O número de animais utilizados foi o suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados. Todo esforço foi feito para minimizar o sofrimento dos animais.

3.3. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com 0.1 ml de Xilazina (10 mg/kg) + 0.1 ml de Ketamina (60 mg/kg), adicionadas a uma mesma seringa, por via intramuscular. Posteriormente os animais foram levados a um aparelho estereotático digital (Insight, Brasil) onde tiveram a cabeça fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0.2 mL de lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Logo após, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça, algodão e hastes flexíveis com ponta de algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, três orifícios foram feitos nos ossos parietais com uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação da cânula guia e de dois parafusos para ancorar a prótese. As coordenadas utilizadas, que dependem da área em estudo ([tabela 1](#)), tomadas como base o atlas de Paxinos e Watson (2008). O crânio então foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação da cânula guia. Ao término da cirurgia cada animal recebeu por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico veterinário (60.000 UI, 0.2 mL) e uma injeção subcutânea do analgésico e anti-inflamatório banamine (2.5 mg/Kg). Depois disso, cada cânula guia foi selada com um fio de aço inoxidável para protegê-la de entupimento. Os animais foram deixados por cinco dias em recuperação pós-operatória antes do início dos experimentos.

Tabela 1 – Coordenadas segundo o atlas de Paxinos e Watson (2008).

Estruturas	Ântero-posterior	Lateral	Vertical
Córtex pré-límbico (CPL)	+ 3,24 mm	- 0,60 mm	- 2,80 mm
Núcleo basolateral da amígdala (BLA)	- 2,28 mm	- 5,00 mm	- 7,60 mm
Substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd)	- 6,72 mm	- 0,20 mm	- 3,80 mm
Ventrículo lateral (VL)	+ 0,60 mm	- 1,40 mm	- 4,30 mm

3.4. Drogas

Foram utilizados o inibidor irreversível da enzima triptofano-hidroxilase p-cloro-fenil-alanina (PCPA, 200 mg/Kg, via intraperitoneal - IP, ou 200 µg/5 µL, via intraventricular - IV), o cloridrato de serotonina (5-HT, 10 nmol/0.2 µL) e o agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (0.3 µg/0.2 µL) administrados 24, 48 ou 72 horas (PCPA) ou 5 minutos antes do experimento, respectivamente. As drogas foram diluídas com tampão fosfato salina (PBS – pH 7,0) que também foi utilizado como solução controle. A dose de PCPA utilizada baseou-se os estudos de Koe e Weissman (1966) e Richter-Levin e Segall (1989) os quais mostraram uma depleção significativa nos níveis de 5-HT após a administração sistêmica de PCPA. As doses de 5-HT e 8-OH-DPAT foram utilizadas com base nos estudos de Graeff *et al.* (1986) e Tomkins *et al.* (1994).

3.5. Procedimento para Microinjeção

As drogas foram administradas através de uma agulha gengival curta (30G) localizada, quando introduzida, 1 mm abaixo da ponta da cânula guia. A agulha de injeção foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 µL, EUA) por meio de um fino tubo flexível de polietileno. O volume injetado foi de 5 µL no ventrículo e de 0.2 µL nas demais regiões, com o auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil).

3.6. Equipamentos

3.6.1. Caixas de Medida de Sobressalto

Para o registro da resposta de sobressalto foram utilizados quatro estabilímetros (16,5 x 7,5 x 7,5 cm) sobre os quais foram anexadas quatro gaiolas de contenção (armação em PVC, 25,5 x 12,0 x 9,0 cm, Insight, Brasil). Cada gaiola ficou localizada dentro de uma câmara de atenuação sonora (64,0 x 60,0 x 40,0 cm) com revestimento interno de espuma (Insight, Brasil). As amplitudes de respostas de sobressalto foram registradas através de células de carga inseridas na base dos estabilímetros. A resposta de sobressalto foi captada por sensores

e amplificada, gerando um sinal analógico, posteriormente digitalizado para análise em um programa computacional (Sobressalto, Insight, Brasil). Essa resposta foi registrada dentro de uma janela de 200 ms. O estímulo utilizado consistiu de um som de alta intensidade com 3 amplitudes diferentes (ruído branco de 90, 95 e 105 dB, 50 ms de duração), liberado por um alto falante localizado a 10 cm de distância da gaiola de contenção. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão experimental para garantir sensibilidade equivalente ao longo do experimento (Figura 6, esquerda).

3.6.2. Caixas de Condicionamento

Foram utilizadas quatro caixas de isolamento acústico (60,0 x 50,0 x 45,0 cm). Dentro de cada caixa foi alocada uma gaiola de contenção (17,0 x 8,0 x 8,0 cm) de acrílico transparente com piso constituído por 8 barras de metal de 5,0 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si, através das quais foram liberados os choques elétricos nas patas (0.6 μ A, 1 segundo de duração). As paredes e tetos das quatro caixas foram compostos por listras horizontais em preto e branco (5 cm de largura). Uma abertura na parede traseira permitiu a apresentação dos estímulos utilizados (luz e som). Os estímulos incondicionados foram administrados por meio de um gerador de choques tipo *scrambler* (Insight, Brasil). Quatro câmeras de vídeo, instaladas no interior de cada câmara de isolamento acústico, permitiu o monitoramento do animal durante os experimentos. Um estímulo luminoso proveniente de uma luz de LED (alto brilho, branco, 6 W) localizada acima do alto falante, posicionado a frente da caixa de condicionamento, foi utilizada como estímulo condicionado (Figura 6, centro e direita).

3.7. Procedimento Experimental

3.7.1. Sessões de Balanceamento - Seleção dos animais com baixa e alta ansiedade

Foram realizadas duas sessões de balanceamento com intervalo de 24h entre elas. Os animais foram colocados nas caixas experimentais e após 5 minutos, foram submetidos à apresentação de 30 estímulos sonoros nas intensidades de 90, 95 e 105 dB, com intervalo variado de 30 segundos entre os estímulos. Os estímulos foram apresentados de forma aleatória tendo como única exigência a utilização de cada uma das três amplitudes para cada grupo de 3 estímulos. O tempo de duração de cada sessão foi de 20 minutos. A amplitude média de sobressalto ao longo das 30 tentativas de estímulos sonoros da segunda sessão de balanceamento foi utilizada para classificar os animais em pouco (BA) ou muito (AA)

“ansiosos”, de tal forma que os animais com amplitude de sobressalto abaixo da mediana foram alocados no grupo BA e os animais com amplitude de sobressalto acima da mediana foram alocados no grupo AA. Este procedimento foi adaptado para este estudo, tendo em conta que os aumentos na amplitude da resposta de sobressalto se correlacionam diretamente, até certo ponto, com os níveis inatos de ansiedade em sujeitos humanos e animais de laboratório (PLAPPERT; PILZ; SCHNITZLER, 1993; KRYSTAL *et al.*, 1997; RAY *et al.*, 2009).

Figura 6 – Caixa de medida de sobressalto à esquerda. Ao centro e à direita contexto e caixa de condicionamento aversivo, respectivamente.

3.7.2. Sessões de Condicionamento (treino)

Foram realizadas duas sessões de condicionamento com intervalo de 24h entre elas. Os animais foram colocados nas caixas de condicionamento e, após 5 minutos de habituação, foram submetidos a 10 associações luz (estímulo condicionado) x choque nas patas (estímulo incondicionado) com intervalo variado. Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e 1 segundo de choque nas patas. Os choques serão apresentados no último segundo de cada apresentação do estímulo condicionado luz. O tempo de duração de cada sessão foi de 40 minutos.

3.7.3. Sessão Teste

Após vinte e quatro horas adicionais à segunda sessão de condicionamento, as drogas foram administradas e imediatamente após, os animais foram avaliados no teste do SPM. Cada animal foi colocado na caixa experimental e após 5 minutos de habituação, foi exposto a

um total de 60 estímulos sonoros nas intensidades de 90, 95 e 105 dB com intervalos variados. Trinta dessas apresentações consistiram apenas da apresentação do estímulo sonoro (tentativas só-som), intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). O tempo de duração do teste foi de 45 minutos. As variáveis independentes coletadas foram a latência e amplitude da resposta de sobressalto, e a amplitude do SPM, dada pela porcentagem calculada pela razão entre as respostas nas tentativas só som e luz-som.

3.8. Delineamento Experimental

3.8.1. Experimento 1

Neste primeiro experimento analisamos o papel funcional da neurotransmissão serotoninérgica periférica e central em ratos machos, através da administração sistêmica (intraperitoneal – i.p.) ou intraventricular (i.v.) do inibidor irreversível da enzima triptofano-hidroxilase p-cloro-fenil-alanina (PCPA) 24, 48 ou 72 horas antes do experimento, na expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo, em animais fenotipicamente selecionados, em função de sua reatividade emocional, como pouco (BA) ou muito (AA) ansiosos.

3.8.2. Experimento 2

Analisamos o papel funcional da neurotransmissão serotoninérgica do CPL, BLA, e SCPd de ratos machos através da microinjeção local de cloridrato de serotonina (5-HT, 10 nmol/0.2 µL) ou do agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (0.3 µg/0.2 µL), administrados 5 minutos antes do início da sessão teste, sobre a expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo, em animais fenotipicamente selecionados como BA ou AA.

3.8.3. Experimento 3

Analisamos se a flutuação dos hormônios ovarianos ao longo do ciclo estral influenciaria o nível de ansiedade em ratas previamente selecionadas como BA ou AA. Além disso, investigamos o papel funcional da neurotransmissão serotoninérgica central, através da microinjeção local de cloridrato de serotonina (5-HT, 10 nmol/0.2 µL) ou do agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (0.3 µg/0.2 µL), no CPL, 5 minutos antes do experimento, sobre a expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo, durante as

diferentes fases do ciclo estral. Para isso, as fêmeas utilizadas tiveram o ciclo estral analisado por esfregaço vaginal no momento dos testes, sendo este localizado dentro de um dos seguintes padrões: proestro (Pro), estro (Est), diestro 1 (Die 1) ou diestro 2 (Die 2). De forma a evitar a grande variabilidade induzida pelas diversas fases e levando em consideração também os efeitos da progesterona e do estradiol sobre o comportamento, as quatro fases do ciclo citadas foram agrupadas em apenas duas: *proestro/estro* (Pro-Est – caracterizada pela presença de altos níveis de estradiol e progesterona) e *diestro 1/diestro 2* (Die 1-2 – caracterizada pela redução acentuada nos níveis de estradiol e progesterona).

3.8.4. Experimento 4

Este último experimento foi conduzido de forma similar ao experimento 3 sendo que, neste caso, as áreas neurais escolhidas para a modulação farmacológica foram o BLA e a SCPd. Também como no experimento 3, as fêmeas utilizadas tiveram o ciclo estral analisado por esfregaço vaginal no momento dos testes, sendo posteriormente subdivididas nos grupos Pro-Est e Die 1-2.

3.9. Perfusão e Histologia

Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados através de exposição a CO₂ ou por sobredose de pentobarbital de sódico (60 mg/kg). Os indicativos de morte do animal foram ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. A confirmação da morte foi por perfusão cardíaca (150 mL de PBS seguido de 150 mL de paraformaldeído a 4%). Posteriormente, os animais foram decapitados para a retirada dos encéfalos, que foram mantidos em uma solução de paraformaldeído por 3 dias, sendo a seguir mergulhados em uma solução de sacarose 30% para crioproteção. Os encéfalos foram fatiados em cortes de 60 µm de espessura no criostato (Leica CM 1850, Nussloch, Alemanha) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2008). Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas revestidas por gelatina e corados com vermelho neutro para a localização dos sítios de microinjeção.

3.10. Análise Estatística

Os dados dos experimentos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de 2 ou 3 fatores, com ou sem repetição, de acordo com cada experimento. As comparações *a posteriori* foram

realizadas com o teste de Tukey-HSD para N igual ou desigual, ou ainda pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. O nível de probabilidade foi estabelecido em igual ou menor que 5% ($p \leq 0.05$). Todos os dados passaram no critério de igualdade das variâncias, segundo o teste de Levene. Entretanto, alguns dos dados coletados em fêmeas, particularmente àqueles resultantes da manipulação experimental da BLA feriram os critérios de normalidade. Ainda assim, decidimos pela utilização da ANOVA já que é sabido que as variações da suposição de normalidade não afetam muito seriamente a validade da análise de variância.

4. EXPERIMENTO 1

4.1. Animais

Para este experimento foram utilizados cento e seis ratos Wistar, provenientes do Biotério Central da USP-RP, acomodados segundo o padrão já descrito.

4.2. Cirurgia

Idem tópico 3.3, com implantação da cânula guia no ventrículo lateral (VL) (Figura 8), somente no experimento 1B.

4.3. Drogas e Doses

Neste estudo utilizou-se o inibidor irreversível da enzima triptofano-hidroxilase p-cloro-fenil-alanina (PCPA, Sigma - EUA) nas doses de 200 mg/Kg (i.p.) ou 200 µg/5 µL (i.v.). O PCPA foi diluído com tampão fosfato salina (PBS – pH 7,0) que também foi utilizado como solução controle. A dose utilizada baseou-se nos estudos de Koe e Weissman (1966), Richter-Levin e Segall (1989), Hritcu, Clicinschi e Nabeshima (2001) e Izquierdo *et al.* (2012), que mostraram uma depleção significativa de 5-HT central e periférica após a administração sistêmica de PCPA. Os animais foram testados 24, 48 e 72 horas após uma única injeção i.p. O tempo mais eficaz de PCPA i.p. foi utilizado para a injeção i.v.

4.4. Procedimento para Microinjeção

O volume de 5 µL de PBS ou PCPA (i.v.) foi administrado a uma taxa de 0.1 µL/min com o auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil) através de uma agulha gengival curta (30G) localizada, quando introduzida, 1 mm abaixo da ponta da cânula guia. A agulha de microinjeção foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 µL, EUA) por meio de um fino tubo flexível de polietileno. Após o final da infusão, a agulha foi deixada no local durante 1 minuto para permitir a difusão. A figura 8 detalha o local das injeções de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2008).

4.5. Equipamentos

Ver tópico 3.6.

4.6. Grupos Experimentais

Os grupos formados foram: BA i.p. – PBS (n = 9), PCPA 24h (n = 9), 48h (n = 8), 72h (n = 8). AA i.p. – PBS (n = 9), PCPA 24h (n = 9), 48h (n = 7), 72h (n = 7). BA e AA i.v. – n = 10 por grupo.

4.7. Procedimento Experimental

Ver tópico 3.7.

4.8. Perfusão e Histologia

Ver tópico 3.9.

4.9. Experimento 1A

Visamos neste experimento fazer uma análise dos efeitos da redução do tônus serotoninérgico induzido pela administração intraperitoneal (i.p.) de PCPA sobre a expressão das respostas incondicionada e condicionada de medo, em ratos fenotipicamente selecionados como BA e AA. Os testes foram realizados 24, 48 ou 72 horas após uma única injeção i.p. de PCPA.

4.9.1. Análise Estatística

As diferenças basais entre os grupos BA e AA foram analisadas através de uma análise de variância (ANOVA) de 2 fatores com medidas repetidas (MR). Os fatores considerados foram os graus de ansiedade entre grupos (BA x AA) e as tentativas ao longo de cada sessão (fator intragrupal: som x luz-som), sendo este último o fator de repetição. Após esta primeira comparação, os efeitos do PCPA foram analisados separadamente nos grupos BA e AA. Em ambos os casos foi realizada uma análise semelhante (ANOVA MR de dois fatores) com os tratamentos (PBS x PCPA - 24, 48 e 72h) e tentativas (repetição som x luz/som) como fatores principais. As comparações *a posteriori* foram realizadas com o teste de Tukey-HSD para N desiguais, sempre que $p \leq 0.05$.

4.9.2. Resultados

A análise estatística mostrou diferenças significativas intra (som x luz-som; $F_{1,16}=136.57$; $p<0.0001$) e entre grupos (BA x AA; $F_{1,16}=17.70$; $p<0.0005$). O teste *post-hoc* de Tukey revelou que os ratos AA tendem a apresentar aumento nas respostas

incondicionadas (som) e condicionadas (luz-som) de medo, comparados com os ratos BA (figura 7 - colunas PBS). Além disso, em adição aos altos níveis de sensibilidade do sobressalto, ratos AA mostraram diminuição da latência (dados não mostrados). A segunda análise mostrou que os efeitos da injeção aguda de PCPA sobre o medo incondicionado e condicionado em ratos BA foram tempo-dependentes. Na verdade, apesar de não serem observadas diferenças no fator tratamento ($F_{3,30}=0.09$; $p>0.05$), as principais diferenças foram obtidas no âmbito das tentativas ($F_{1,30}=72.31$; $p<0.00001$). Além disso, interação significativa entre os fatores foi observada ($F_{3,30}=5.09$; $p<0.005$). Esta diferença no efeito temporal do PCPA no sobressalto, afetou o SPM em 24 e 48 horas, mas não 72 horas após uma única injeção (Figura 7, esquerda).

Em relação ao grupo AA a ANOVA detectou diferenças significativas nos fatores tratamento ($F_{3,28}=3.52$; $p<0.05$) e tentativas ($F_{1,28}=100.03$; $p<0.0001$), mas ausência de interação entre eles ($F_{3,28}=1.82$; $p>0.05$). O teste *post-hoc* de Tukey revelou que esta diferença se deve principalmente a uma tendência do PCPA de atenuar a resposta de sobressalto quando injetado 24 horas antes do teste. No entanto, o aprendizado aversivo foi preservado (Figura 7, direita).

Figura 7 – Efeitos de diferentes intervalos da administração sistêmica (i.p.) de PCPA sobre a amplitude (g = gramas) de respostas incondicionadas (som) e condicionadas (luz/som) de medo em ratos BA e AA. As setas indicam a diferença significativa entre os grupos controle (PBS), dentro de cada variável (som ou luz/som). * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS ou PCPA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. As análises estatísticas foram realizadas separadamente para os fatores nível de ansiedade (BA x AA) e drogas (PCPA $\times$ PBS). ANOVA MR de dois fatores com teste *post-hoc* Tukey-HSD, com $p\leq 0.05$.

4.10. Experimento 1B

Levando-se em conta os dados obtidos no experimento 1A, envolvendo a influência dos efeitos periféricos do PCPA sobre a expressão do medo condicionado e incondicionado, no presente experimento foram avaliados os efeitos centrais de inibição de 5-HT através da administração aguda de PCPA no ventrículo lateral (i.v.) (figura 8) em ratos com o mesmo fenótipo BA e AA. O SPM foi avaliado 24 horas após uma única injeção i.v. de PCPA (200 µg/0.5 µL). Este tempo foi escolhido com base no experimento anterior.

4.10.1. Análise Estatística

As principais diferenças entre os grupos BA e AA nas respostas incondicionadas e condicionadas de medo foram comparadas utilizando a ANOVA de três fatores com MR. A análise estatística foi realizada tomando como fatores os níveis de ansiedade (BA e AA), tratamentos (PBS x PCPA) e tentativas (som/luz-som – sendo este o fator repetido). As comparações *a posteriori* foram realizadas com o teste de Tukey-HSD para N desiguais, sempre que $p \leq 0.05$.

Figura 8 – A figura ilustra o local de microinjeções de drogas no ventrículo lateral (LV). Adaptado do atlas de Paxinos e Watson (2008) (esquerda). A direita fotomicrografia da secção coronal do sítio de microinjeção.

4.10.2. Resultados

ANOVA revelou diferenças significativas nos fatores ansiedade ($F_{1,36}=15.66$; $p<0.0005$) e tentativas ($F_{1,36}=69.23$; $p<0.0001$). Comparações *a posteriori* mostraram que ratos AA apresentam maiores amplitudes de sobressalto para as respostas incondicionadas (som) e condicionadas (luz-som), quando comparado com o grupo BA, onde apenas o SPM é afetado pelo tratamento (Figura 9).

Figura 9 – Efeitos de injeções i.v. de PCPA sobre a amplitude (g = gramas) das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo em ratos BA e AA. Foram utilizados grupos independentes. As setas indicam diferença significativa entre os grupos controle (PBS), dentro de cada variável (som ou luz/som). * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS ou PCPA). # Diferença significativa entre os tratamentos (PBS ou PCPA) na mesma tentativa (som ou luz/som). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de três fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p \leq 0.05$.

4.11. Discussão

De forma geral, os dados de nosso estudo destacam dois pontos principais. Em primeiro lugar, no que diz respeito à amplitude da resposta incondicionada de medo, as reduções no montante global de 5-HT promovidas por injeção sistêmica de PCPA não é capaz de alterar esta variável em animais BA ou AA, mas diminui significativamente a amplitude da resposta condicionada de ratos BA. Em segundo lugar, as injeções i.v. de PCPA mostraram a capacidade de diminuir o SPM (luz-som) (mas não a resposta incondicionada) em ratos AA, sem alterar essas medidas no grupo BA. Assim, a amplitude de resposta do SPM em ratos BA foi afetada por injeções sistêmicas de PCPA, mas não centrais. Por outro lado, a inibição

central de 5-HT apresentou maior eficácia em reduzir a amplitude do SPM, mas apenas nos ratos AA.

Dados da literatura têm mostrado que o PCPA, uma droga que bloqueia a síntese de 5-HT, tem pouca ou nenhuma influência sobre a amplitude da resposta incondicionada de sobressalto (FECHTER, 1974; SHEETS; COOK; REITER, 1989). Quando as mudanças são encontradas, no entanto, elas parecem emergir da exposição a vários testes e pode ser devido à sensibilização das drogas (CONNER *et al.*, 1970) ou à atenuação da habituação (CARLTON; ADVOKAT, 1973). Então, em relação à resposta incondicionada de ratos BA e AA nossos dados foram parcialmente adequados a estes resultados preliminares, uma vez que não foram encontradas mudanças após injeções i.p. de PCPA. No entanto, a redução nos níveis de 5-HT perturbou a expressão do SPM em ratos BA. Este efeito é dependente do tempo, sendo eficaz após 24 e 48 horas da administração de PCPA. Em relação à depleção de 5-HT, o grupo AA não mostrou nenhuma influência sobre a resposta de sobressalto, apesar da droga mostrar uma tendência em reduzir a amplitude das respostas incondicionadas e condicionadas. Estes resultados corroboram a hipótese anterior da influência da 5-HT no medo e na ansiedade, mas os efeitos diferenciais promovidos pelo PCPA em ratos BA e AA merecem atenção.

Com relação a este ponto, dados de estudos anteriores destacaram a influência de lesões 5-HT em linhagens de ratos que apresentam baixa ou alta ansiedade endógena; efeitos ansiogênicos em ratos de baixa e efeitos ansiolíticos em ratos de alta ansiedade (MORLEY, *et al.*, 2001; MECHAN *et al.*, 2002). De certa forma, estes dados apoiam nossas previsões dos efeitos diferenciais da 5-HT subjacentes ao comportamento de ansiedade em animais de laboratório. Supomos então que a ansiedade endógena apresentada por ratos AA pode ser devida ao aumento dos níveis de 5-HT, sendo atenuada por injeções sistêmicas de PCPA e, assim como em ratos que receberam PCPA i.v., parte desse efeito pode ser devido à sua ação periférica. Por outro lado, ratos BA, que deveriam apresentar baixo tônus de 5-HT, diminuíram ainda mais seus níveis serotoninérgicos. É possível que esta redução então tenha alterado o seu perfil de baixa ansiedade para outro mais vinculado ao do tipo depressivo. Cumpre notar que, em humanos, o humor deprimido, uma característica dos processos depressivos, pode até acentuar a ansiedade, mas não altera a resposta de SPM. Mais especificamente, a ansiedade induzida por estímulos aversivos imprevisíveis, como sinais contextuais, aumenta o sobressalto. Em contraste, o medo induzido por estímulos aversivos previsíveis, como som ou luz, diminui a resposta de sobressalto em humanos que apresentam sintomas de depressão (ROBINSON *et al.*, 2012). Geralmente, apesar da grande controvérsia

nesse assunto, está bem estabelecido que aumentos gerais do tônus de 5-HT exacerba a ansiedade em mamíferos (GRAEFF *et al.*, 1996; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997). Levando em conta a administração periférica de PCPA, nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que a redução global na liberação de 5-HT prejudica a expressão da resposta do SPM em ratos BA.

Um ponto merece atenção, no experimento 1B de nosso estudo, no qual a redução da neurotransmissão serotoninérgica foi obtida através da injeção i.v. de PCPA. Os dados coletados mostraram que o tratamento não foi capaz de mudar a resposta de sobressalto nos ratos BA, mas uma redução significativa foi obtida no SPM de ratos AA. Isto pode significar que parte dos efeitos observados após injeção sistêmica de PCPA pode ser devido à redução nos níveis periféricos de 5-HT, principalmente em ratos BA. Por outro lado, o efeito ansiolítico do PCPA quando injetado diretamente no ventrículo afeta apenas ratos AA. De fato, faz sentido que seja assim, já que ratos AA apresentam altos níveis de medo. No que diz respeito a este ponto, e de acordo com a teoria do papel duplo da 5-HT, a expressão da resposta de medo pode ser aumentada por meio do aumento da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala, sendo o efeito oposto observado no mesencéfalo dorsal (SCHUTZ; DE AGUIAR; GRAEFF, 1985; GRAEFF *et al.*, 1986; GRAEFF, 1994; 2004). Supõe-se que altas quantidades circulantes de 5-HT poderiam ser responsáveis pelo aumento da ansiedade natural mostrada nos animais AA, como revelado pela alta amplitude das respostas incondicionadas e condicionadas de medo. Isto ocorre provavelmente em função da exacerbação dos processos “bottom-up” que supostamente estão subjacentes à expressão da ansiedade em indivíduos AA. De fato, em um estudo recente utilizando uma abordagem diferente Myers e Cícero (1969) mostraram que infusões intragástricas de PCPA reduzem o consumo voluntário de álcool em ratos pré-estressados, selecionados por sua avidez por álcool etílico (*high-alcohol drinkers*), sem afetar o consumo de álcool de ratos para o qual o álcool é um fraco reforçador (*low-alcohol drinkers*) (EZEQUIEL LEITE; NOBRE, 2012; HAYTON; MAHONEY; OLMSTEAD, 2012).

4.12. Conclusão

Levando-se em conta todos os dados obtidos aqui, nosso estudo agrega novas informações sobre a influência da neurotransmissão serotoninérgica na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo em ratos que naturalmente apresentam diferentes níveis de ansiedade. Ratos previamente classificados como BA mostraram significativo

enfraquecimento na expressão de respostas de medo após injeção i.p. de PCPA. Por outro lado, ratos AA foram mais afetados pela redução central de 5-HT. Estes dados indicam o envolvimento da 5-HT periférica sobre a expressão da resposta emocional, o que faz sentido, já que sabe-se que, por exemplo, distúrbios intestinais apresentam frequentemente comorbidade com a depressão e a ansiedade (GROS *et al.*, 2009). Vale ressaltar que a 5-HT é um dos principais neurotransmissores que regulam a função intestinal (SANGER, 2008). No entanto, se de fato esse envolvimento está ligado aos comportamentos de ansiedade ou depressão, é uma questão para futuras investigações.

5. EXPERIMENTO 2

5.1. Animais

Para este experimento foram utilizados duzentos e vinte e quatro ratos Wistar, provenientes do Biotério Central da USP-RP. Os animais foram mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno (45,0 × 35,0 × 15,0 cm) em um biotério setorial, com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com água e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acesas às 07h00min da manhã.

5.2. Cirurgia

Idem tópico 3.3, com implantação da cânula guia no córtex pré-límbico (CPL), no núcleo basolateral da amígdala (BLA) e na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) (Figura 10).

Figura 10 – Fotomicrografia mostrando as principais regiões de interesse. As setas indicam os locais dos sítios de microinjeções de drogas utilizadas no CPL (PrL), na BLA e na SCPd (DMPAG). Ratos cuja localização esteve fora dessas regiões foram descartados deste estudo. A barra representa a escala de 1mm.

5.3. Drogas e Doses

Neste estudo utilizou-se o cloridrato de serotonina (5-HT, 10 nmol/0.2 μL , Sigma - EUA) e o agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (0.3 μg /0.2 μL , Sigma - EUA) administrados 5 minutos antes do experimento. Os efeitos das drogas foram avaliados 24

horas depois da segunda sessão de condicionamento. As drogas foram diluídas com tampão fosfato salina (PBS – pH 7,0) que também foi utilizado como solução controle. As doses de 5-HT e de 8-OH-DPAT foram baseadas nos estudos de Graeff *et al.* (1986) e Tomkins *et al.* (1994).

5.4. Procedimento para Microinjeção

O volume de 0.2 μ L de PBS, 5-HT ou 8-OH-DPAT foi administrado a uma taxa de 0.1 μ L/min com o auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil) e através de uma agulha gengival curta (30G) localizada, quando introduzida, 1 mm abaixo da ponta da cânula guia. A agulha de microinjeção foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 μ L, EUA) por meio de um fino tubo flexível de polietileno. Após o final da infusão, a agulha foi deixada no local durante 1 minuto para permitir a difusão. A [figura 11](#) detalha o local das injeções de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2008).

Figura 11 – Figura representativa dos pontos de microinjeção de drogas no CPL (PrL), na BLA e na SCPd (PAG). Círculos abertos referem-se a ratos BA e círculos pretos a ratos AA. Adaptado do atlas de Paxinos e Watson (2008).

5.5. Equipamentos

Ver tópico 3.6.

5.6. Grupos Experimentais

Foram usados grupos independentes e cada animal recebeu apenas uma microinjeção de droga. Os grupos formados foram:

- CPL – BA: PBS (n = 10), 5-HT (n = 10), 8-OH-DPAT (n = 10);
- CPL – AA: PBS (n = 15), 5-HT (n = 15), 8-OH-DPAT (n = 15);
- BLA – BA: PBS (n = 11), 5-HT (n = 11), 8-OH-DPAT (n = 11);
- BLA – AA: PBS (n = 11), 5-HT (n = 10), 8-OH-DPAT (n = 11);
- SCPd – BA: PBS (n = 13), 5-HT (n = 13), 8-OH-DPAT (n = 13);
- SCPd – AA: PBS (n = 15), 5-HT (n = 15), 8-OH-DPAT (n = 15).

5.7. Procedimento Experimental

Ver tópico 3.7.

5.8. Perfusão e Histologia

Ver tópico 3.9.

5.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas (MR) tendo como fatores os tratamentos (drogas) e tentativas (som/luz-som) para cada região em estudo. A ANOVA de um fator foi utilizada para analisar possíveis diferenças entre os grupos no que diz respeito ao SPM. As comparações *a posteriori* foram realizadas com o teste de Tukey-HSD para N desiguais, sempre que $p \leq 0.05$.

5.10. Resultados

5.10.1. Córtex pré-límbico (CPL)

No que diz respeito às diferenças basais (efeito do PBS) entre os grupos BA e AA, a ANOVA revelou efeitos significativos nos fatores grupos ($F_{1,23}=11.04$; $p<0.0005$) e tentativas ($F_{1,23}=21.87$; $p<0.0005$), mas ausência de interação entre os fatores (Figura 12). Comparações *a posteriori* mostraram que os animais apresentam a amplitude de sobressalto aumentada durante as tentativas luz-som, em ambos os grupos. Além disso, a resposta de sobressalto em ratos AA foi mais pronunciada do que em BA, especialmente no SPM. Comparações efetuadas com os dados obtido em ratos BA mostraram interação entre os fatores ($F_{1,30}=28.69$; $p<0.0001$) mas ausência de outros efeitos. Quanto ao grupo AA, a ANOVA

apontou diferenças significativas entre os grupos (BA x AA: $F_{1,42}=4.05$; $p<0.05$), tentativas ($F_{1,42}=31.30$; $p<0.0001$) e também uma interação significativa (grupo x ensaios: $F_{1,42}=9.29$; $p<0.0005$). A análise *post-hoc* mostrou que a 5-HT inibe a potencialização do sobressalto em ratos BA.

Figura 12 – Efeitos da administração de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) no CPL (PrL) sobre a amplitude (g = gramas) e latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo e SPM em ratos BA. Foram utilizados grupos independentes. * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p\leq 0.05$.

No que diz respeito aos animais AA, ambos 5-HT e 8-OH-DPAT foram capazes de alterar o SPM, mas não foram observadas alterações na resposta incondicionada de sobressalto (exposição ao estímulo só-som). A ANOVA de um fator revelou diferença estatisticamente significativa nos grupos AA ($F_{2,42}=13.18$; $p<0.0001$), mas não nos grupos BA, no que diz respeito ao SPM. Esta diferença é devida ao prejuízo causado pelo 5-HT e 8-OH-DPAT na amplitude da resposta de sobressalto (Figura 13).

Figura 13 – Efeitos da administração de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) no CPL (PrL) sobre a amplitude (g = gramas) e latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo e SPM em ratos AA. Foram utilizados grupos independentes. As setas indicam diferença significativa entre os grupos controle (PBS), dentro de cada variável (som ou luz/som). * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). # Diferença significativa entre os ensaios (som ou luz/som) entre os tratamentos (PBS, 5-HT ou 8-OH-DPAT). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p \leq 0.05$.

5.10.2. Amígdala basolateral (BLA)

A análise de variância mostrou efeitos significativos das variáveis utilizadas sobre a resposta basal de sobressalto (efeitos do PBS) entre grupos BA e AA (grupos: $F_{1,20}=22.05$; $p < 0.0005$, ensaios: $F_{1,20}=25.98$; $p < 0.0005$). Também foi observada interação significativa entre os fatores ($F_{1,20}=2.05$; $p < 0.0005$). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que os ratos apresentam a resposta de sobressalto aumentada durante as tentativas luz-som em ambos os grupos, sendo que esta resposta é mais pronunciada nos ratos AA. Em relação aos efeitos das drogas sobre a resposta de sobressalto em ratos BA, nenhuma diferença significativa foi notada nos fatores grupos ou tentativas. No entanto, uma interação significativa foi observada

($F_{1,30}=28.69$; $p<0.0005$) (Figura 14). Este resultado foi principalmente devido aos efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT em atenuar a resposta de SPM no grupo BA.

Figura 14 – Efeitos da infusão de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) na BLA sobre a amplitude (g = gramas) e a latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo em ratos BA. Foram utilizados grupos independentes. * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p\leq 0.05$.

Em relação aos animais AA, dados semelhantes foram encontrados com interação significativa entre os fatores ($F_{1,29}=62.29$; $p<0.0001$) (Figura 15). Ao contrário dos dados coletados nos ratos BA, as drogas não foram capazes de mudar a resposta incondicionada de sobressalto ou o SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto.

Figura 15 – Efeitos da infusão de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) na BLA sobre a amplitude (g = gramas) e a latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo em ratos AA. Foram utilizados grupos independentes. As setas indicam diferença significativa entre os grupos controle (PBS), dentro de cada variável (som ou luz/som). * Diferença significativa entre som x luz/som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p \leq 0.05$.

5.10.3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd)

A ANOVA indicou que os grupos BA e AA diferem na resposta de sobressalto basal (grupos: $F_{1,26}=18.00$; $p<0.0005$, tentativas: $F_{1,26}=35.46$; $p<0.0005$), mas não há interação entre os fatores ($p<0.05$). Estes resultados revelam diferenças basais na resposta incondicionada de sobressalto e no SPM nos grupos BA e AA, como demonstrado pelo teste *post-hoc* de Tukey. Com relação aos efeitos da droga nos ratos BA, a ANOVA revelou apenas interações significativas entre os fatores (grupos x tentativas: $F_{1,36}=16.30$; $p<0.0005$) (Figura 16). Mais uma vez, ambas as drogas diminuíram a resposta de SPM, neste caso quando injetadas diretamente na SCPd. Em ratos AA, interação significativa entre os fatores foi a única mudança detectada pela análise de variância. Mais uma vez, os efeitos da droga estiveram ausentes.

Figura 16 – Efeitos da infusão de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) na SCPd sobre a amplitude (g = gramas) e latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo em ratos BA. Foram utilizados grupos independentes. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p \leq 0.05$.

Finalmente, a ANOVA de um fator mostrou diferenças na porcentagem de resposta de sobressalto nos ratos BA ($F_{2,36}=4.21$; $p < 0.05$). Os ratos AA não foram afetados pelos tratamentos (Figura 17).

Figura 17 – Efeitos da infusão de 5-HT ou do agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (8-OH) na SCPd sobre a amplitude (g = gramas) e latência das respostas incondicionadas (som) ou condicionadas (luz/som) de medo em ratos AA. Foram utilizados grupos independentes. As setas indicam diferença significativa entre os grupos controle (PBS), dentro de cada variável (som ou luz/som). * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (PBS, 5-HT ou 8-OH). Os dados estão apresentados como média ± EPM. ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Tukey-HSD, com $p \leq 0.05$.

5.11. Discussão

O CPFm desempenha papel duplo na regulação do medo por meio de suas subdivisões: infra e pré-límbica. O córtex infra-límbico supostamente influencia a extinção do medo, enquanto que o pré-límbico desempenha um papel na expressão de medo e da ansiedade (HEISLER *et al.*, 1998; PARKS *et al.*, 1998; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010). Em nosso estudo, a infusão local de 5-HT no CPL abole a resposta condicionada de sobressalto em ratos BA; um efeito não observado após injeções do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT. Em contraste, 5-HT e 8-OH-DPAT bloqueiam esta resposta em ratos AA. Em ambos os grupos, as drogas não alteraram a resposta incondicionada de sobressalto.

Resultado semelhante foi obtido no estudo de Corcoran e Quirk (2007), que mostrou que a atividade pré-límbica é necessária para a expressão do medo aprendido mas não do medo inato, como é a resposta incondicionada de sobressalto. Dados obtidos nos grupos AA indicam que os efeitos do tipo ansiolíticos promovidos por infusões locais de 5-HT e 8-OH-DPAT no CPL foram devidos a ativação de receptores 5-HT_{1A}, para os quais 8-OH-DPAT tem mais afinidade.

Deve notar-se que, dentre os receptores 5-HT presentes no CPF de primatas e roedores, os subtipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} são, de longe, os mais abundantes (MARTINEZ *et al.*, 2001; ARANGO; UNDERWOOD; MANN, 2002). No entanto, ao contrário dos receptores 5-HT_{2A}, que são de natureza excitatória, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} hiperpolariza os neurônios do CPF, o que poderia explicar os dados obtidos em nosso estudo. O CPL facilita a expressão do medo através de seus efeitos excitatórios sobre os núcleos basolateral e central da amígdala (SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011). De fato, a amígdala desempenha um papel crucial na modulação da expressão do medo aprendido e o CPFm, através de sua região pré-límbica em particular, tem importante função modulatória sobre a atividade da amígdala (QUIRK; BEER, 2006; SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011). Esta região recebe forte inervação serotoninérgica dos núcleos dorsal e mediano da rafe e contém vários receptores 5-HT, dentre eles o subtipo 5-HT_{1A} que, quando ativado, inibe significativamente a taxa de disparo neuronal (STEIN; DAVIDOWA; ALBRECHT, 2000; LOWRY *et al.*, 2005; PUIG; ARTIGAS; CELADA, 2005). No CPF, ambos os receptores inibitório (5-HT_{1A}) e excitatório (5-HT_{2A}), estão co-localizados em neurônios glutamatérgicos (PUIG *et al.*, 2003; AMARGOS-BOSCH *et al.*, 2004). O principal papel dos receptores 5-HT_{1A}, localizados no cume axonal das células piramidais glutamatérgicas do CPL, é modular o *drive* excitatório dos receptores 5-HT_{2A} localizados na soma e no dendritos desses neurônios, e que se projetam para o BLA, que por sua vez ativa a divisão medial do núcleo central para produzir respostas condicionadas de medo (PUIG; ARTIGAS; CELADA, 2005). Em suporte a estes dados, foi demonstrado que camundongos geneticamente modificados para expressar prejuízo na função do receptor 5HT_{2A} exibem um perfil comportamental ansiolítico quando expostos a um variedade de paradigmas de ansiedade; uma alteração que é abolida pela restauração cortical destes receptores (WEISSTAUB *et al.*, 2006). Além disso, o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} leva à interrupção do comportamento de derrota condicionada em hamsters (HARVEY; SWALLOWS; COOPER, 2012). Assim, a ação inibitória de ativação de receptores 5-HT_{1A} do CPL poderia

levar a diminuição da excitação dos neurônios do BLA, levando à consequente diminuição da resposta de medo condicionado, como visto em nosso estudo.

Tendo em conta os dados anteriores, seria de se esperar que a microinjeção de agonistas 5-HT_{2A} no CPFm levasse a um aumento do SPM. Até onde sabemos, no entanto, não existem estudos que demonstrem que a ativação de receptores 5-HT_{2A} do CPFm promovem este tipo de efeito. Entretanto, foi demonstrado que o antagonismo dos receptores 5-HT_{2A} previnem a potencialização do sobressalto acústico induzido por estresse inescapável (JIANG *et al.*, 2011). Outros estudos mostraram que estes receptores, quando ativados, induzem um estado afetivo negativo. Por exemplo, o agonismo dos receptores 5-HT_{2A} do CPFm aumenta a concentração intracelular de Ca²⁺, levando à consequente excitação neuronal comumente associada com a retenção da memória de medo após a exposição a um procedimento de condicionamento de medo (AZNAR; KLEIN, 2013). Além disso, alterações no sistema 5-HT_{2A} do CPFm tem sido vinculadas à intensificação da resposta afetiva associada com a depressão, o comportamento suicida e a agressão (FROKJAER *et al.*, 2008).

Apesar dos dados obtidos com a administração das drogas diretamente no CPL, a razão pela qual a modulação 5-HT nesta região afeta mais intensamente ratos AA do que BA permanece em aberto. Com referência a este ponto, sabe-se que o traço de medo excessivo apresentado por ratos AA resultade alterações subjacentes tanto na estrutura normal quanto funcional dos neurônio do CPL, tanto em humanos quanto em animais de laboratório (QUIRK; BEER, 2006; KLUMPERS *et al.*, 2010). Adultos humanos saudáveis, com elevado traço de ansiedade, apresentam diminuição do volume do CPF (SPAMPINATO *et al.*, 2009). Além disso, ratos AA apresentam redução significativa nos dendritos apicais dos neurônios do CPL em relação aos animais BA (MILLER; MORRISON; MCEWEN, 2012). O estudo de Mallo *et al.* (2008) relatou níveis elevados do transportador de 5-HT no CPFm de ratos selecionados em função de seu baixo comportamento exploratório; um dos sintomas de ansiedade em roedores (HENDRIE; WEISS; EILAM, 1996). Além disso, foi demonstrado que camundongos geneticamente modificados para o receptor 5-HT_{1A} exibem típico comportamento de ansiedade no labirinto em cruz elevado, no campo aberto e nos testes de conflito, em relação ao tipo selvagem (controle) (OVERSTREET *et al.*, 2003). Estas diferenças anatômicas e fisiológicas podem ajudar a melhorar a nossa compreensão sobre o porque dos efeitos mais acentuados da modulação 5-HT do CPL de ratos AA, como mostrado em nosso estudo.

Na segunda parte de nosso experimento, foram analisados os efeitos da 5-HT e do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, administrados diretamente no BLA, sobre as variáveis já informadas. De forma contrária aos seus efeitos no CPL, a administração de 5-HT no BLA não alterou o SPM em ratos AA, mas o fez de forma significativa nos animais BA. Os dados obtidos a partir de ensaios com 8-OH-DPAT, provaram ser semelhantes. Ambas as drogas interromperam o SPM, sem afetar a resposta incondicionada de sobressalto. Estes dados são opostos à visão tradicional de que aumentos nos níveis de 5-HT na amígdala facilita a expressão do medo condicionado. Por exemplo, foi demonstrado que a injeção bilateral intra-BLA de 8-OH-DPAT promove efeitos ansiogênicos no teste de interação social (GONZALEZ; ANDREWS; FILE, 1996). Além disso, estudos comportamentais utilizando a técnica de microdiálise mostraram aumentos na taxa de liberação de 5-HT em animais previamente estressados (KAWAHARA *et al.*, 1995). Além disso, microinjeções do inibidor seletivo de recaptação de serotonina fluoxetina na BLA, aumentam a resposta de medo condicionado contextual (MARTINEZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2007). Outros estudos relatam que a infusão de 8-OH-DPAT diretamente no BLA foi ineficaz em alterar o comportamento de ratos testados no labirinto em cruz elevado (GONZALEZ; ANDREWS; FILE, 1996). Por outro lado, um efeito do tipo ansiolítico foi encontrado em animais testados no labirinto em T elevado (ZANGROSSI *et al.*, 2001). Além disso, injeções intra-BLA do inibidor seletivo da recaptação de 5-HT citalopram resulta na redução da resposta congelamento condicionado contextual; um efeito observado em ratos que passaram previamente por choques nas patas (INOUE *et al.*, 2004).

No presente estudo, o agonismo de receptores 5-HT foi eficaz em bloquear a resposta condicionada de sobressalto em ratos que exibem ansiedade estado, mas não naqueles que apresentaram altos níveis de comportamento ansioso. De forma considerável, a exposição a estímulos (contextuais) previamente emparelhados com choques nas patas tem a capacidade de aumentar os níveis extracelulares de 5-HT na amígdala (KAWAHARA *et al.*, 1995) e no córtex pré-frontal (YOSHIOKA *et al.*, 1995; HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1999). Este aumento pode refletir mais uma capacidade melhorada para lidar com a situação estressora que uma simples resposta emocional a um evento aversivo. Como exemplo, foi mostrado que as concentrações extracelulares de 5-HT não estão aumentadas quando os ratos expressam o comportamento de congelamento, mas este aumento foi notado após a recuperação desta resposta (HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1999). Seguindo essa sequência lógica, faz sentido que a facilitação da 5-HT induzida pelo agonista 5-HT_{1A} nos

neurônios do BLA exerça uma ação ansiolítica, como observado em nosso estudo. No entanto, deve-se notar que aumentos na expressão do auto-receptor 5-HT_{1B} na rafe dorsal de ratos levaram a uma redução do medo condicionado, mas apenas nos animais não submetidos a um procedimento anterior de estresse incontrolável (CLARK *et al.*, 2004). Assumindo que os ratos ansiosos são mais predispostos a se comportar diante de uma situação de estresse e aos estímulos a ele relacionados (LIEBSCH *et al.*, 1998; HENNIGER *et al.*, 2000), o resultado anterior compartilha algumas semelhanças com o presente estudo já que aumentos nos níveis de 5-HT na amígdala não foram eficazes em alterar a resposta aprendida de medo em ratos AA.

A última fase de nosso experimento visou avaliar os efeitos das drogas utilizadas quando administradas localmente na SCPd, uma região do mesencéfalo envolvida principalmente na expressão da resposta de medo e ansiedade incondicionados (BRANDÃO *et al.*, 1999; 2005). No geral, a administração intra-SCPd de 5-HT ou 8-OH-DPAT, reduziu a amplitude do SPM em ratos BA, mas não foi eficaz em promover qualquer tipo de efeito sobre o SPM em ratos AA. Mais uma vez, os tratamentos não alteraram a resposta incondicionada de sobressalto.

Uma série de trabalhos na literatura tem implicado a SCP na modulação e expressão de vários comportamentos relacionados ao medo (BANDLER; CARRIVE, 1988; CARRIVE, 1993; GRAEFF *et al.*, 1993; DE OCA *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 1999), incluindo a modulação/expressão de suas vertentes incondicionada e condicionada. Por exemplo, microinjeções do agonista 5-HT_{1A} na SCPd aumentam o limiar aversivo da estimulação elétrica desta região; um efeito que bloqueado pelo antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY (BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008). Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização do agonista não-seletivo de receptor 5-HT α -metil 5-HT ou o antagonista altamente seletivo de receptores 5-HT_{2A} ketanserina (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A resposta de medo condicionado contextual também parece ser mediada pelos receptores 5-HT_{1A} da SCPd (AGUIAR *et al.*, 2013). Além disso, a aquisição da esQUIVA inibitória de ratos submetidos ao teste de labirinto em T elevado foi bloqueada por prévias injeções de 5-HT ou do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004). Portanto, os nossos resultados corroboram a bem conhecida importância dos neurônios 5-HT da SCPd na modulação do medo condicionado, no presente caso, em ratos BA. Além disso, nossos resultados também destacam a influência dos receptores 5-HT_{1A} na modulação da aprendizagem condicionada de medo em ratos BA já que o 8-OH-DPAT aboliu o SPM. A

ausência de efeitos das drogas na resposta incondicionada e no SPM em ratos AA pode significar que a ansiedade traço pode ser resultado do desequilíbrio em outros sistemas de neurotransmissores, tais como o GABA e o glutamato, neste nível do teto mesencefálico. Apoiando este pressuposto, mudanças nos níveis de 5-HT em regiões do encéfalo envolvidas na expressão das respostas emocionais, tais como a SCP e o córtex frontal, foram avaliadas em camundongos NR2C-2B (DE SOUZA SILVA *et al.*, 2007). A análise correlacional revelou que camundongos mostrando altos níveis de imobilidade induzida pelo medo também apresentavam níveis elevados de 5-HT no córtex frontal. Os níveis de dopamina e acetilcolina na SCP foram alteradas de forma significativa, mas não foi detectada alteração nas concentrações de 5-HT. No entanto, a visão mais aceita admite que, no prosencéfalo, a 5-HT facilita o processamento da informação relacionada com a resposta de medo, enquanto que no tronco cerebral, a 5-HT tem uma função principalmente inibitória (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010). Cumpre notar que a maioria dos trabalhos citados no presente estudo utilizaram grupos mistos de ratos sem diferenciar, por conseguinte, os níveis de ansiedade dos animais. Esta diferença metodológica pode por si só explicar as divergências obtidas entre o nosso e outros estudos.

5.12 Conclusão

Em geral, nossos resultados mostraram que a 5-HT apresenta efeitos diferenciais sobre a resposta aprendida de medo e esses efeitos são relativamente dependentes dos níveis inatos de ansiedade dos animais. No CPL, a 5-HT modula a expressão da resposta condicionada de medo em ratos AA e esta modulação é dependente de receptores 5-HT_{1A}. Contrariamente às nossas suposições, no entanto, o mesmo não ocorreu para a BLA ou a SCPd. Nessas regiões, os ratos BA mas não os AA foram suscetíveis aos efeitos ansiolíticos da ativação dos receptores 5-HT_{1A}. Além disso, nenhuma alteração foi observada na expressão da resposta incondicionada de medo, não importando a região em estudo. Presume-se que a expressão do medo condicionado em indivíduos AA pode ser dependente de outros receptores 5-HT, como o subtipo 5-HT_{1B}, e/ou de alterações em outros sistemas de neurotransmissores como o GABA e glutamato. Estes resultados fornecem novas informações sobre a influência rostrocaudal da 5-HT sobre respostas incondicionadas e condicionadas de medo em indivíduos BA e AA e, em certa medida, estão em descompasso com a teoria corrente que enfatiza o papel da 5-HT na ansiedade, principalmente nos níveis subcorticais e mesencefálicos.

6. EXPERIMENTO 3

6.1. Animais

Para este experimento foram utilizadas cento e oitenta e três ratas Wistar, provenientes do Biotério Central da USP-RP. Os animais foram mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno (45,0 × 35,0 × 15,0 cm) em um biotério setorial, com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com água e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acesas às 07h00min da manhã.

6.2. Cirurgia

Idem tópico 3.3, com implantação da cânula guia no córtex pré-límbico (CPL) (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografia apresentando a região de interesse. A seta indica um local representativo das microinjeções de drogas. A barra representa a escala de 1mm. PrL: córtex pré-límbico; Cg1: córtex cingulado 1; IL: córtex infra-límbico.

6.3. Drogas e Doses

Ver tópico 5.3.

6.4. Procedimento para Microinjeção

Ver tópico 5.4.

6.5. Equipamentos

Ver tópico 3.6.

6.6. Procedimento para Esfregaço Vaginal

O esfregaço vaginal foi analisado entre 08h00min e 11h00min da manhã. Uma alça de inoculação foi mergulhada em água e inserida na vagina. Foi retirado fluido contendo células nas quais foram espalhadas em uma lâmina. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante para uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) e analisadas em microscópio. Alterações na aparência citológica dos esfregaços foram utilizadas para identificar as fases do ciclo estral: proestro (Pro), estro (Est), diestro 1 (Die 1) e diestro 2 (Die 2) (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005) (Figuras 19 e 20). De forma a evitar a grande variabilidade induzida pelas diversas fases e levando em consideração também os efeitos da progesterona e do estradiol sobre o comportamento, os grupos de fêmeas foram subdivididos nas fases *proestro/estro* (Pro-Est – caracterizada pela presença de altos níveis de estradiol e progesterona) e *diestro 1/diestro 2* (Die 1-2 – caracterizada pela redução acentuada nos níveis de estradiol e progesterona).

Figura 19 – Fluxograma representativo das fases do ciclo estral de fêmeas. Adaptado de Hubscher, Brooks e Johnson (2005).

Figura 20 – Fotos representativas de cada fase do ciclo estral de fêmeas. A = proestro; B = estro; C = diestro 1; D = diestro 2.

6.7. Grupos Experimentais

Foram usados grupos independentes e cada animal recebeu apenas uma microinjeção de droga. Os grupos formados foram:

- BA (Pro-Est): PBS (n = 18), 5-HT (n = 18), 8-OH-DPAT (n = 18)
- BA (Die 1-2): PBS (n = 14), 5-HT (n = 14), 8-OH-DPAT (n = 15)
- AA (Pro-Est): PBS (n = 14), 5-HT (n = 13), 8-OH-DPAT (n = 14)
- AA (Die 1-2): PBS (n = 15), 5-HT (n = 15), 8-OH-DPAT (n = 15)

6.8. Procedimento Experimental

Ver tópico 3.7.

6.9. Perfusão e Histologia

Ver tópico 3.9.

6.10. Análise Estatística

As primeiras comparações foram destinadas a avaliar a influência dos fatores hormonais no sobressalto e no SPM. Para este fim, foi feita ANOVA de dois fatores (níveis de ansiedade: BA x AA e ciclo estral: Pro-Est x Die 1-2) e de um fator (condição: som x luz-som) e *post-hoc* de Newman-Keuls. Os testes foram realizados para as seguintes medidas: latência de sobressalto, amplitude da resposta de sobressalto e SPM e porcentagem de resposta de sobressalto. A porcentagem de SPM foi calculada usando a seguinte fórmula: $(\text{luz-som} \times 100) / \text{som} - 100$. O segundo nível de análise teve como objetivo avaliar os efeitos da droga sobre as variáveis dependentes já descritas. Para este efeito, foi utilizada ANOVA multifatorial com medidas repetidas com níveis de ansiedade (BA x AA), drogas (PBS x 5-HT x 8-OH) e tentativas (som x luz-som) como fatores sendo o último variável repetida. Neste caso, as análises foram conduzidas isoladamente para cada fase estral. Comparações a posteriori foram feitas utilizando o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade de significância foi estabelecida em $p \leq 0.05$ para todas as comparações.

6.11. Resultados

Nosso primeiro objetivo foi avaliar a influência do ciclo estral na resposta de sobressalto e de SPM de ratas pertencentes a um dos dois grupos denominados Pro-Est e Die 1-2. Isto foi feito por meio da comparação dos dados obtidos após a infusão de PBS em ambos os grupos.

A amplitude da resposta de sobressalto foi a mais afetada em função da fase hormonal. A ANOVA revelou diferenças significativas nos níveis de ansiedade ($F_{1,57}=26.07$; $p<0.0001$). O fator tentativas também foi afetado ($F_{1,57}=175.04$; $p<0.0001$). Foi encontrada interação significativa entre os fatores tentativas x nível de ansiedade ($F_{1,57}=14.94$; $p<0.0005$) e tentativas x nível de ansiedade x fase hormonal ($F_{1,57}=11.57$; $p<0.005$). Em relação à amplitude do SPM apenas interação significativa entre os fatores foi detectada ($F_{1,57}=24.78$; $p<0.0001$). Não foram observadas alterações entre os grupos na variável latência para a resposta de sobressalto. A análise *post-hoc* mostrou os efeitos triviais da ansiedade e do condicionamento aversivo sobre a resposta de sobressalto, apesar da ausência de efeitos induzidos pela variável fase hormonal. No entanto, a amplitude do SPM, uma variável que melhor descreve a resposta de medo condicionado, foi muito influenciada pelo ciclo estral, já que os grupos Pro-Est e Die 1-2 mostraram um perfil inverso ([Figura 21](#)).

Figura 21 – Efeitos dos ciclos hormonais (Pro/Est x Die 1-2) sobre a latência, a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem de SPM. Em relação à amplitude de sobressalto dos dados brutos: * diferença significativa entre ensaios para cada grupo (BA - Pro/Est, BA - Die 1-2, AA - Pro/Est, AA - Die 1-2). + diferença significativa entre os grupos, no mesmo ensaio (som ou luz/som). Quanto ao SPM: * diferença significativa entre os grupos (Pro/Est x Die 1-2) no mesmo nível de ansiedade (BA ou AA). + diferença significativa entre os níveis de ansiedade na mesma fase hormonal. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA MR de dois fatores com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

Os efeitos das drogas foram analisados separadamente, conforme descrito anteriormente, nos grupos Pro-Est e Die 1-2. No primeiro caso, a ANOVA detectou os efeitos dos tratamentos em todas as variáveis (níveis de ansiedade: $F_{1,89}=87.54$; $p<0.0001$; drogas: $F_{1,89}=5.61$; $p<0.005$; tentativas: $F_{1,89}=125.17$; $p<0.0001$). A ansiedade foi o fator que influenciou significativamente o fator tentativas ($F_{1,89}=39.16$; $p<0.0001$) assim como o efeito das drogas ($F_{2,89}=13.50$; $p<0.0001$). Os dados de latência mostraram que os grupos diferem no fator ansiedade ($F_{1,89}=21.08$; $p<0.0001$). A análise de variância mostrou que a amplitude de SPM foi significativamente afetada pelos níveis de ansiedade ($F_{1,89}=7.24$; $p<0.005$) e pelos efeitos das drogas ($F_{2,89}=9.10$; $p<0.0005$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que ratas BA foram mais afetadas pelos efeitos das drogas, reduzindo a amplitude da resposta de

SPM. No que diz respeito a esta variável a 5-HT e 8-OH-DPAT foram eficazes em reduzir a amplitude do SPM, sendo 8-OH-DPAT mais eficaz do que a 5-HT.

Em relação à resposta de sobressalto do grupo Die 1-2, a ANOVA mostrou diferenças significativas sobre os fatores níveis de ansiedade ($F_{1,82}=21.66$; $p<0.0001$) e tentativas ($F_{1,82}=74.87$; $p<0.0001$). Interação significativa entre drogas x tentativas foi notada também ($F_{2,82}=10.35$; $p <0.0001$). A latência para a resposta de sobressalto e a amplitude de SPM foram afetadas pelo fator drogas ($F_{2,82}=5.17$; $p<0.005$ e $F_{2,82}=11.07$; $p<0.0001$, respectivamente), mas sem alterações adicionais. No geral, o teste *post-hoc* revelou que os efeitos das drogas foram significativos apenas nos grupos BA ([Figura 22](#)).

Figura 22 – Efeitos de 5-HT e 8-OH-DPAT sobre a latência, a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem de SPM em ratas BA ou AA. Acima é mostrado os dados de ratas do grupo Pro-Est. Abaixo é mostrado os dados de ratas do grupo Die 1-2. No que diz respeito à latência e à amplitude de sobressalto: * diferença significativa entre os ensaios para cada grupo (BA-PBS, 5-HT ou 8-OH; AA-PBS, 5-HT ou 8-OH). # diferença significativa entre os grupos, no mesmo ensaio (som ou luz/som). + diferença significativa entre os grupos droga e controle, no mesmo ensaio e no mesmo nível de ansiedade (BA ou AA). Quanto ao SPM: * diferença significativa entre drogas e grupo controle no mesmo nível de ansiedade (BA ou AA). + diferença significativa entre os níveis de ansiedade no mesmo tratamento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA MR multifatorial com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

6.12. Discussão

A primeira parte do nosso estudo foi direcionada à análise da influência dos hormônios ovarianos na latência e na amplitude de resposta de sobressalto e de SPM em ratas. Este objetivo foi alcançado através da divisão feita anteriormente dos nossos sujeitos experimentais em função de seus altos (Pro-Est) ou baixos (Die 1-2) níveis de estradiol/progesterona. A possível influência do ciclo estral sobre a resposta de medo condicionado pôde ser detectada pelos efeitos opostos sobre a resposta de sobressalto em ratas testadas sob diferentes níveis hormonais. Ratas AA mostraram um aumento na amplitude de SPM, quando testadas durante a fase Pro-Est, contrastando com sua baixa amplitude observada na fase Die 1-2. Este aumento do SPM não é considerado um aumento, mas sim uma diminuição dos níveis de medo neste grupo, levando em conta os efeitos não-monotônicos do medo sobre a amplitude da resposta de sobressalto, em outras palavras, uma melhora na performance dos animais no teste obtida pela redução do medo como resultado do aumento nos níveis mais elevados de estradiol/progesterona.

Estudos anteriores sugerem que os níveis elevados de medo interferem na resposta de sobressalto de tal maneira que intensidades moderadas, como aquela observada nos animais BA podem maximizar o SPM, enquanto que níveis mais elevados, como aqueles observados nos animais AA, mudam a resposta defensiva desses animais para uma estratégia de defesa diferente que não inclui o SPM como componente (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; WALKER; DAVIS, 1997). Essa proposição, inicialmente postulada por dados coletados de ratos e tomada como uma mudança no desempenho, em vez de uma falha de aprendizagem, corrobora nossos resultados com ratas AA testadas durante o Die 1-2, que mostraram reduzida intensidade de SPM, quando comparadas com ratas BA testadas na mesma fase estral. Os dados obtidos com ratas pertencentes ao grupo Pro-Est reafirmaram a importância dos hormônios ovarianos na manutenção do equilíbrio emocional adaptativo. Na verdade, as mudanças nos níveis desses hormônios que ocorrem durante o ciclo estral tem sido implicadas no desencadeamento de diversos transtornos afetivos e emocionais (CAMPBELL; WHITEHEAD, 1977; ARPELS, 1996). Como exemplo, o alvo principal do metabólito da progesterona allopregnanolone é o receptor de GABA_A. Sua ação neste receptor inclui a produção de efeito anticonvulsivante, sedativo, analgésico, anestésico e ansiolítico (BELELLI *et al.*, 2009; LAMBERT *et al.*, 2009). Além disso, o sistema serotoninérgico, que é ligado a uma variedade de processos psicopatológicos incluindo ansiedade e depressão, é modulado ao longo da vida por hormônios ovarianos (KRAJNAK *et al.*, 2003).

As diferenças de gênero são frequentemente observadas em uma variedade de condições psiquiátricas, incluindo a depressão e os transtornos de ansiedade (SIMONDS; WHIFFEN, 2003). Quanto a este último, sabe-se que o transtorno do pânico, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno de ansiedade generalizada ocorrem três vezes mais em mulheres do que em homens (YONKERS; ELLISON, 1996). Esta diferença pode ser devido à capacidade dos hormônios gonadais de modular o comportamento de fêmeas em resposta a apresentação de estressores diversos (ZIMMERBERG; FARLEY, 1993; ARPELS, 1996; MORA; DUSSAUBAT; DIAZ-VELIZ, 1996). Em nosso estudo, supõe-se que os hormônios ovarianos influenciam o medo condicionado de forma diferencial e esta influência é dependente do ciclo estral (no caso de roedores) e da predisposição do animal a reagir a um estímulo aversivo. Ratas AA apresentaram resposta elevada de sobressalto durante o Pro-Est. Assumimos que, para este grupo, o aumento na amplitude de sobressalto denuncia uma redução na intensidade de medo e da intensidade da experiência aversiva exibida por animais AA durante o teste, certo tipo de estado de pânico, um estado emocional para o qual a resposta de sobressalto é incompatível. Por outro lado, as diminuições na resposta de sobressalto observadas em ratas BA durante a fase Pro-Est refletem uma atenuação dos níveis normais de ansiedade que estes animais supostamente apresentam, um efeito que ocorre no lado esquerdo da curva não-monotônica em U invertido. Neste contexto, no campo das emoções humanas, vários teóricos têm proposto a ideia de que os reflexos primitivos, como a resposta de sobressalto, são a base para a ação e mobilização dos aspectos fisiológicos das emoções (LANG; BRADLEY, 2010). Dados mais antigos de estudos com animais de laboratório mostraram que as mudanças na intensidade, duração e recorrência do estressor resultam no prejuízo na expressão da resposta defensiva (CHALMERS; HOHF; LEVINE, 1974; DAVIS; ASTRACHAN, 1978). Em um recente estudo clínico foi demonstrado a existência de um padrão semelhante, sendo observada uma atenuação da potencialização da resposta de medo concomitante com um aumento nos aspectos afetivos negativos induzidos experimentalmente (MCTEAGUE; LANG, 2012).

Em indivíduos que sofrem de transtornos de ansiedade, um estado geral de excitação é gerado e mantido, mesmo após o desaparecimento do estímulo aversivo que o gerou (ETKIN; WAGER, 2007; SHIN; LIBERZON, 2010). Este estado de ansiedade constante, também observado em roedores (LIEBSCH *et al.*, 1998; HENNIGER *et al.*, 2000; EZEQUIEL LEITE; NOBRE, 2012), resulta de um desequilíbrio homeostático em vários sistemas de neurotransmissores. Neste trabalho, supomos, *a priori*, que o sistema 5-HT pode ser um deles,

sugerindo que as mudanças na neurotransmissão 5-HT podem estar subjacentes às diferenças emocionais e comportamentais observadas entre indivíduos BA e AA. De fato, alterações na atividade 5-HT no cérebro tem sido implicadas em uma ampla gama de formas patológicas de ansiedade, especialmente vinculadas ao funcionamento do 5-HT_{1A} (ALTIERI *et al.*, 2013; POPOVA; NAUMENKO, 2013).

Na segunda parte de nosso estudo, abordamos os efeitos da manipulação farmacológica do sistema 5-HT do CPL sobre a amplitude de resposta de sobressalto de ratas testadas durante diferentes níveis hormonais (Pro-Est ou Die 1-2). As análises estatísticas foram realizadas de forma independente para cada uma destas fases. Em geral, o agonismo dos receptores 5-HT do CPL levou a uma atenuação da amplitude do SPM de ratas AA testadas durante o Pro-Est, mas nenhuma alteração no SPM de ratas BA foi notada. Ao contrário, este efeito foi observado de forma consistente em ratas BA testadas durante a fase Die 1-2, mas não no grupo AA.

Estudos anteriores destacaram o papel da porção medial do córtex pré-frontal na regulação do medo. Especificamente, a ativação de sua subdivisão infra-límbica facilita a extinção da resposta de medo condicionado, ao passo que a ativação de sua área pré-límbica influencia a expressão dessa resposta (HEISLER *et al.*, 1998; PARKS *et al.*, 1998; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010). De forma similar a um experimento anterior de nosso grupo (FERREIRA; NOBRE, 2014), a infusão local de 5-HT no CPL diminuiu o SPM em ratas BA testadas durante o baixo período hormonal (Die 1-2), e esse efeito parece ser mediado pelo receptor serotoninérgico do tipo 1A, conforme revelado pelos efeitos do 8-OH-DPAT. Por outro lado, a 5-HT e o 8-OH-DPAT bloquearam o SPM em ratas AA, mas este efeito foi dependente do ciclo estral, uma vez que foi observada apenas nas ratas testadas durante a fase Pro-Est. Alterações nos níveis de medo induzidas pelas drogas estiveram ausentes em ambos os grupos BA Pro-Est e AA Die 1-2.

A 5-HT é um neurotransmissor amplamente presente no sistema nervoso central produzido e liberado por um sistema neural oriundo principalmente dos núcleos mesencefálicos da rafe, sendo modulada ao longo da vida pelos hormônios ovarianos (KRAJNAK *et al.*, 2003; LOWRY *et al.*, 2008). A ação dos estrógenos sobre o SNC durante o desenvolvimento leva à diferenciação sexual do sistema serotoninérgico, que resulta na diferente densidade de inervação 5-HT em machos e fêmeas (GONZALEZ; LERET, 1992; REZNIKOV; NOSENKO, 1996). Além disso, a 5-HT neuronal é altamente influenciada pela variação do estrógeno e da progesterona que ocorrem habitualmente ao longo do ciclo estral

durante a idade adulta (MASWOOD; STEWART; UPHOUSE, 1995; MASWOOD *et al.*, 1999). Além disso, esses hormônios ovarianos apresentam a capacidade de manter a saúde e a viabilidade dos neurônios 5-HT (BETHEA *et al.*, 2002), sendo essa uma das condições necessárias para a preservação da integridade emocional e afetiva (GRAEFF *et al.*, 1996).

Em seres humanos e roedores é bem reconhecido que indivíduos AA, nos quais um traço contínuo de medo excessivo é predominante, apresentam mudanças subjacentes na estrutura e função normal dos neurônios do CPL (QUIRK; BEER, 2006; KLUMPERS *et al.*, 2010). Humanos adultos com escores altos para ansiedade traço apresentam redução acentuada no volume do CPF (SPAMPINATO *et al.*, 2009). Ratos previamente classificados como AA apresentam um encurtamento significativo dos dendritos apicais de neurônios pré-limbicos, quando comparados com ratos BA (MILLER; MORRISON; MCEWEN, 2012). O estudo de Mällo *et al.* (2008) relatou níveis elevados do transportador de 5-HT no CPFm de ratos selecionados em função de seu comportamento exploratório baixo, um sintoma de ansiedade em roedores (HENDRIE; WEISS; EILAM, 1996). Além disso, foi demonstrado que camundongos modificados geneticamente para o receptor 5-HT_{1A} exibem comportamento típico de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado, campo aberto e em testes de conflito, em comparação com controles do tipo selvagem (OVERSTREET *et al.*, 2003). Essas diferenças anatômicas e fisiológicas podem ajudar a entender os efeitos mais intensos da modulação 5-HT em ratos AA obtidos em nosso estudo.

Em mulheres durante a menopausa e em ratas ovariectomizadas, o aumento da ansiedade é um fenômeno comumente relatado (WALF; FRYE, 2009); um efeito equilibrado pela terapia de reposição de estrógeno (SHERWIN, 1998), ou através da administração de uma dose única de estradiol (DIAZ-VELIZ *et al.*, 1991), respectivamente. No nosso estudo, ratas BA testadas na fase de Die 1-2, a qual supomos ser uma condição hormonal semelhante aos animais ovariectomizados, se mostraram mais suscetíveis aos efeitos da 5-HT e do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, o que sugere um efeito ansiolítico. De forma similar, a administração crônica de fluoxetina reduz a resposta de medo de ratas testadas em períodos de baixos níveis de estrógeno (LEBRON-MILAD *et al.*, 2013). Em nosso estudo as drogas utilizadas não influenciaram o comportamento de ratas AA testadas na fase Die 1-2, provavelmente porque estes animais já apresentam o limite mínimo de resposta esperado para o fenômeno (efeito piso). Ratas AA testadas na fase Pro-Est mostraram-se mais suscetíveis aos efeitos da modulação serotoninérgica, tal como demonstrado pela redução na amplitude do SPM após as infusões de 5-HT ou do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT no CPL. Em ratas

ovariectomizadas tratadas com estradiol ou progesterona, ou sua combinação, a capacidade da fluvoxamina, um inibidor seletivo da recaptação de 5-HT, de promover efeito antidepressivo é reduzida, o que é condizente com o poder destes hormônios de bloquear seus efeitos (BENMANSOUR *et al.*, 2012). Em nosso estudo, propomos que um mecanismo semelhante está operando, o que resulta numa redução da amplitude de SPM. No entanto, a questão de como os hormônios ovarianos interagem com mecanismos serotoninérgicos para modular a expressão do medo condicionado em ratas permanece ainda obscura. Alguns estudos destacam que a influência dos hormônios sexuais na expressão de medo é dependente do paradigma comportamental utilizado, sugerindo que esses hormônios podem modular a formação e/ou expressão das memórias de medo (LEBRON-MILAD; MILAD, 2012). Curiosamente, o estrógeno apresenta normalmente a capacidade de regular a expressão de receptores 5-HT_{1A} e a rotatividade da 5-HT no circuito do medo, incluindo a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (AMIN; CANLI; EPPERSON, 2005).

6.13. Conclusão

Em nosso estudo, ratas AA mostraram elevada amplitude de SPM na fase Pro-Est, contrastando com sua baixa amplitude observada na fase Die 1-2 quando comparadas com ratas BA na mesma fase estral. Este aumento na amplitude de sobressalto denuncia redução na intensidade de medo e na intensidade da experiência aversiva exibida por ratas AA. Por outro lado, as diminuições na resposta de sobressalto observadas em ratas BA durante a fase Pro-Est refletem uma atenuação dos níveis normais de ansiedade que estes animais supostamente apresentam. Os dados obtidos com ratas pertencentes ao grupo Pro-Est reafirmaram a importância dos hormônios ovarianos na manutenção do equilíbrio emocional adaptativo.

Sobre os efeitos da manipulação farmacológica do sistema 5-HT do CPL sobre a amplitude de resposta de sobressalto, na fase Pro-Est as ratas AA mostraram-se mais suscetíveis aos efeitos da modulação serotoninérgica, tal como demonstrado pela redução na amplitude do SPM após as infusões de 5-HT ou de 8-OH-DPAT no CPL, mas nenhuma alteração no SPM de ratas BA foi notada. Ao contrário, este efeito foi observado de forma consistente em ratas BA testadas durante a fase Die 1-2, mas não no grupo AA, sugerindo um efeito ansiolítico.

7. EXPERIMENTO 4

7.1. Animais

Para este experimento foram utilizadas duzentos e sessenta e nove ratas Wistar, provenientes do Biotério Central da USP-RP. Os animais foram mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno (45,0 × 35,0 × 15,0 cm) em um biotério setorial, com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com água e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acesas às 07h00min da manhã.

7.2. Cirurgia

Idem tópico 3.3, com implantação da cânula guia no núcleo basolateral da amígdala (BLA) e na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) (Figura 23).

Figura 23 – Fotomicrografia apresentando as regiões de interesse. A seta indica o local das microinjeções. A barra representa a escala em mm. BLA: núcleo amigdalóide basolateral; DMPAG: substância cinzenta periaquedutal dorsal; Aq: aqueduto.

7.3. Drogas e Doses

Ver tópico 5.3.

7.4. Procedimento para Microinjeção

Ver tópico 5.4.

7.5. Equipamentos

Ver tópico 3.6.

7.6. Procedimento para Esfregaço Vaginal

Ver tópico 6.6

7.7. Grupos Experimentais

Foram usados grupos independentes e cada animal recebeu apenas uma microinjeção de droga (BLA ou SCPd). Os grupos formados foram:

BLA:

- BA (Pro-Est):	PBS (n = 8)	5-HT (n = 7)	8-OH-DPAT (n = 7)
- BA (Die 1-2):	PBS (n = 6)	5-HT (n = 5)	8-OH-DPAT (n = 7)
- AA (Pro-Est):	PBS (n = 9)	5-HT (n = 9)	8-OH-DPAT (n = 7)
- AA (Die 1-2):	PBS (n = 8)	5-HT (n = 6)	8-OH-DPAT (n = 8)

SCP:

- BA (Pro-Est):	PBS (n = 15)	5-HT (n = 15)	8-OH-DPAT (n = 15)
- BA (Die 1-2):	PBS (n = 16)	5-HT (n = 15)	8-OH-DPAT (n = 15)
- AA (Pro-Est):	PBS (n = 16)	5-HT (n = 15)	8-OH-DPAT (n = 15)
- AA (Die 1-2):	PBS (n = 15)	5-HT (n = 15)	8-OH-DPAT (n = 15)

7.8. Procedimento Experimental

Ver tópico 3.7.

7.9. Perfusão e Histologia

Ver tópico 3.9.

7.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada de forma independente para cada região em estudo (BLA ou SCPd). A reatividade emocional, influência hormonal e efeitos das drogas foram analisados pela ANOVA de três fatores com medidas repetidas (MR). Os fatores considerados foram os níveis de ansiedade (BA x AA), drogas (PBS x 5-HT x 8-OH-DPAT) e tentativas (som x luz-som). As análises foram realizadas de forma independente para cada grupo hormonal. A porcentagem de SPM foi calculada usando a seguinte fórmula: $(\text{luz-som} \times 100) / \text{som} - 100$. Comparações a posteriori foram feitas utilizando o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade de significância foi estabelecida em $p \leq 0.05$ para todas as comparações.

7.11. Resultados

Drogas x BLA (Pro-Est): Foram encontrados efeitos significativos do tratamento já que a administração de 5-HT ou 8-OH-PAT na BLA reduziu a resposta de sobressalto em ratas do grupo AA ($F_{1,41}=10.10$; $p<0.005$). Este efeito foi dependente do fator tentativas ($F_{1,41}=108.07$; $p<0.0001$), os quais interagiram significativamente com os tratamentos ($F_{2,41}=6.28$; $p<0.005$). Não foram observados efeitos significativos na variável latência. A ANOVA também mostrou que apenas o 8-OH-DPAT influenciou a amplitude do SPM ($F_{2,41}=9.70$; $p<0.0005$), conforme determinado pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls (Figura 24, acima).

Drogas x BLA (Die 1-2): A ANOVA detectou efeitos significativos das drogas sobre os fatores ansiedade ($F_{1,34}=28.67$; $p<0.0001$) e tentativas ($F_{1,34}=55.20$; $p<0.0001$), mas ausência de efeitos sobre as variáveis amplitude do SPM ou latência (Figura 24, abaixo).

Drogas x SCPd (Pro-Est): As principais diferenças promovidas pelo tratamento sobre a resposta de sobressalto foram nos fatores nível de ansiedade ($F_{1,85}=38.94$; $p<0.0001$) e tentativas ($F_{1,85}=69.15$; $p<0.0001$). Tanto o SPM ($F_{1,85}=6.70$; $p<0.05$) quanto a latência ($F_{1,85}=12.03$; $p<0.005$) também foram afetados pelo fator ansiedade (Figura 25, acima).

Drogas x SCPd (Die 1-2): A ANOVA detectou diferenças significativas na amplitude de sobressalto induzidas pelo fator ansiedade ($F_{1,85}=64.81$; $p<0.0001$). Esta alteração mostrou-se dependente das tentativas ($F_{1,85}=82.03$; $p<0.0001$). Ambos os fatores interagiram de forma significativa entre si e com os tratamentos ($F_{1,85}=5.44$; $p<0.01$). Apesar de nenhum efeito ter sido encontrado na amplitude do SPM, a análise estatística aponta uma tendência à redução nessa variável, promovida pela administração intra-SCPd de 5-HT e 8-OH-DPAT observada nos grupos AA Pro-Est e Die 1-2 (Figura 25, abaixo).

Figura 24 – Efeitos de 5-HT e 8-OH-DPAT sobre a latência, a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem de SPM em ratas BA ou AA. Acima são mostrados os dados de ratas do grupo Pro-Est. Abaixo são mostrados os dados de ratas do grupo Die 1-2. No que diz respeito à latência e à amplitude de sobressalto: * diferença significativa entre os ensaios para cada grupo (BA-PBS, 5-HT ou 8-OH; AA-PBS, 5-HT ou 8-OH). + diferença significativa entre os grupos droga e controle, no mesmo ensaio e no mesmo nível de ansiedade (BA ou AA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando a ANOVA MR de três fatores com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

Figura 25 – Efeitos de 5-HT e 8-OH-DPAT sobre a latência, a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem de SPM em ratas BA ou AA. Acima é mostrado os dados de ratas do grupo Pro-Est. Abaixo é mostrado os dados de ratas do grupo Die 1-2. No que diz respeito à latência e à amplitude de sobressalto: * diferença significativa entre os ensaios para cada grupo (BA-PBS, 5-HT ou 8-OH; AA-PBS, 5-HT ou 8-OH). # diferença significativa entre os grupos, no mesmo ensaio (Som ou Luz/Som). + diferença significativa entre os grupos droga e controle, no mesmo ensaio e no mesmo nível de ansiedade (BA ou AA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA MR de três fatores com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

7.12. Discussão

No presente trabalho, analisamos a influência da 5-HT e do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT administrados diretamente na BLA ou na SCPd de ratas BA e AA testadas nas diferentes fases do ciclo estral (baixos ou altos níveis de estradiol e progesterona).

Os dados dos grupos BLA mostraram que a amplitude bruta de sobressalto é afetada por ambas as drogas, mas apenas o agonista de receptores 5-HT_{1A} provou ser efetivo em diminuir o SPM. Esta diminuição denuncia uma ação ansiolítica da droga sobre os níveis de medo em indivíduos AA. Apoiando estes dados, a latência mostra-se claramente diminuída durante o efeito das drogas em ratas AA testadas na fase Pro-Est, apesar da ausência de significância estatística. Este efeito é diferente do observado nos ratos testados sob condições semelhantes, o que significa que os efeitos da 5-HT dependem do estado hormonal. Estes dados vão contra a visão tradicional de que 5-HT na amígdala aumenta os estados de medo condicionado. Por exemplo, os dados do estudo de Gonzalez, Andrews e File (1996) mostraram que a injeção bilateral intra-BLA de 8-OH-DPAT promove efeitos ansiogênicos no teste de interação social. O aumento da liberação de 5-HT em animais estressados foi encontrado em estudos comportamentais utilizando a técnica de microdialise (KAWAHARA *et al.*, 1995). Além disso, as injeções intra-BLA de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, aumenta a resposta de medo condicionado contextual (MARTINEZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2007). Outros estudos, no entanto, relataram a ausência de efeitos de agonistas 5-HT, utilizando o labirinto como modelo comportamental (GONZALEZ; ANDREWS; FILE, 1996), e resultados até contrários (ansiolíticos) em ratos testados no labirinto em T-elevado (ZANGROSSI *et al.*, 2001). No entanto, diferente do nosso trabalho, esses estudos foram realizados utilizando ratos como sujeitos experimentais impossibilitando, nesse caso, a possibilidade da influência dos aspectos hormonais sobre o comportamento.

A amígdala é uma região cerebral subcortical e bilateral que apresenta-se aumentada, na sua reatividade durante a aquisição e a extinção da aprendizagem condicionada aversiva (PHELPS *et al.*, 2004; KNIGHT; NGUYEN; BANDETTINI, 2005). A ativação funcional da amígdala em resposta a estímulos emocionais varia ao longo do ciclo menstrual (GOLDSTEIN *et al.*, 2005). Cumpre notar que esta região encefálica contém altos níveis de receptores de estrógeno, em comparação com outras regiões (OSTLUND; KELLER; HURD, 2003). No entanto, o aumento da capacidade de resposta ao estresse está associado a uma rápida queda apenas na concentração plasmática de progesterona, mas não de estrógeno, que se mantém em níveis estáveis (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). Além disso, o alvo

principal do metabólito de progesterona allopregnanolone é o receptor de GABA_A que, quando ativado, promove efeitos diversos tais como o anticonvulsivante, sedativo, analgésico, anestésico e ansiolítico (BELELLI *et al.*, 2009; LAMBERT *et al.*, 2009). Nossos dados são apoiados por estes resultados, já que as respostas de sobressalto dos grupos controle foram facilitadas durante a fase Pro-Est, mas mostraram-se diminuídas durante a fase Die 1-2. Com relação a estes achados e com base em estudos anteriores de nosso laboratório (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003; SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006), admitimos que o aumento da amplitude de sobressalto em animais AA denuncia uma redução na intensidade do medo, como já estabelecido em trabalho anterior. Esta atenuação da resposta reflete um retorno do animal de um estado emocional semelhante ao pânico para um outro no qual a resposta de sobressalto é compatível. Por exemplo, estudos clínicos e em animais de laboratório mostraram que mudanças na intensidade, duração e recorrência do estressor resultam em diminuição das respostas defensivas (CHALMERS; HOHF; LEVINE, 1974; DAVIS; ASTRACHAN, 1978; MCTEAGUE; LANG, 2012). Além disso, o sistema neuronal 5-HT, que é ligado a uma variedade de processos psicopatológicos incluindo ansiedade e depressão, também é modulado ao longo da vida por hormônios ovarianos (KRAJNAK *et al.*, 2003). Isto é importante para o presente trabalho, no qual a influência do sistema BLA-5-HT no medo condicionado foi avaliado por infusões locais da própria 5-HT ou do agonista 5-HT_{1A}. Nenhuma mudança foi observada entre os grupos testados durante a fase Die 1-2 (baixo estradiol e progesterona), dados semelhantes aos encontrados com ratos. No entanto, a redução significativa de SPM foi alcançada quando o grupo AA foi testado com 8-OH-DPAT durante a fase Pro-Est.

A principal fonte de inervação serotoninérgica está localizada nos núcleos mesencefálicos da rafe, sendo este sistema modulado ao longo da vida pelos hormônios ovarianos (KRAJNAK *et al.*, 2003; LOWRY *et al.*, 2008). A ação dos estrógenos sobre o SNC durante o desenvolvimento leva à diferenciação sexual do sistema serotoninérgico, que resulta na diferente densidade de inervação 5-HT em machos e fêmeas (GONZALEZ; LERET, 1992; REZNIKOV; NOSENKO, 1996). Esses hormônios ovarianos são relatados por manterem a saúde e a viabilidade dos neurônios 5-HT (BETHEA *et al.*, 2002), e essas são condições necessárias para preservar a integridade emocional e afetiva (GRAEFF *et al.*, 1996). Assumimos que esta é a razão para a ação ansiolítica promovida pelo 8-OH-DPAT em ratas AA testadas durante a fase Pro-Est. Os mesmos resultados também comprovam os dados

coletados a partir do grupo AA Die 1-2 em que ambas as drogas foram ineficazes em mudar as medidas de medo condicionado.

A segunda parte de nossos experimentos abordou os efeitos das drogas utilizadas quando infundidas localmente na SCPd, uma região mesencefálica conhecida principalmente pelo envolvimento na expressão do medo e ansiedade incondicionados (BRANDÃO *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2005). A administração intra-SCPd de 5-HT ou 8-OH-DPAT não alterou as medidas de sobressalto, não importando a fase hormonal ou os níveis de ansiedade. Os dados coletados dos animais testados na fase Die 1-2 foram similares àqueles encontrados em ratos machos, em um estudo anterior (FERREIRA; NOBRE, 2014).

Uma vasta literatura salienta o papel da substância cinzenta periaquedutal sobre a modulação da expressão de vários comportamentos relacionados com o medo (BANDLER; CARRIVE, 1988; CARRIVE, 1993; GRAEFF *et al.*, 1993; DE OCA *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 1999). Aumentos do limiar aversivo de estimulação elétrica desta região tem sido demonstrados após o uso de agonistas 5-HT_{1A} (BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008), de agonistas não seletivos α -metil-5-HT ou de antagonista altamente seletivo de receptores 5-HT_{2A} ketanserina (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a expressão da resposta de medo condicionado medida pela amplitude do SPM permaneceu inalterada após a infusão de ambas as drogas, apesar da clara tendência de redução desta medida observada em ratas AA. Mais uma vez, os dados brutos da resposta de sobressalto em ratas BA e AA testadas na fase Die 1-2 apresentaram perfil semelhante aos ratos (FERREIRA; NOBRE, 2014). Isto reforça a ideia de que dados coletados a partir de ratos podem ser usados como controle do ciclo estral em ratas.

As alterações hormonais promovidas durante o ciclo estral no encéfalo de ratas levam a efeitos diferenciais na excitabilidade neural dos neurônios da SCP (BRACK; LOVICK, 2007). Por exemplo, durante a fase de diestro 2 a queda nos níveis de progesterona está associada com a hiperregulação da expressão da subunidade $\alpha 4\beta 1\delta$ dos receptores GABA_A da SCP, tendo como resultado uma desinibição destes circuitos, deixando-o mais excitável. Isto pode explicar as diferenças em termos de reatividade emocional observadas entre ratos machos e fêmeas. A ausência de efeitos dos agentes serotoninérgicos utilizados, quando administrados diretamente na SCPd pode significar que outros sistemas, que não este, podem estar envolvidos na diferenciação emocional induzida nas diferentes fases do ciclo hormonal nesta região, como os sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos.

7.13 Conclusão

Em geral, nossos resultados mostraram que as respostas de sobressalto dos grupos controle foram facilitadas durante a fase Pro-Est, mas mostraram-se diminuídas durante a fase Die 1-2. Com relação a estes achados e com base em estudos anteriores de nosso laboratório (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003; SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006), admitimos que o aumento da amplitude de sobressalto em animais AA denuncia uma redução na intensidade do medo, como já estabelecido em trabalho anterior.

A administração intra-BLA de 5-HT ou 8-OH-DPAT em ratas AA testadas durante a fase Pro-Est diminuiu a amplitude de SPM, mas apenas o agonista de receptores 5-HT_{1A} provou ser efetivo em diminuir o SPM. Esta diminuição denuncia uma ação ansiolítica da droga sobre os níveis de medo em indivíduos AA. Este efeito é diferente do observado nos ratos testados sob condições semelhantes, o que significa que os efeitos da 5-HT dependem do estado hormonal. Nenhuma mudança foi observada entre os grupos testados durante a fase Die 1-2, dados semelhantes aos encontrados com ratos.

A administração intra-SCPd de 5-HT ou 8-OH-DPAT não alterou as medidas de sobressalto, não importando a fase hormonal ou os níveis de ansiedade. Os dados coletados dos animais testados na fase Die 1-2 foram similares àqueles encontrados em ratos machos, em um estudo anterior (FERREIRA; NOBRE, 2014). Isto reforça a ideia de que dados coletados a partir de ratos podem ser usados como controle do ciclo estral em ratas.

8. CONCLUSÃO GERAL

As principais conclusões dos trabalhos descritos acima estão resumidas nos tópicos abaixo:

- Os resultados coletados após a injeção sistêmica do inibidor da síntese de serotonina PCPA sugerem que a inibição periférica de 5-HT altera a expressão da resposta de medo condicionado em ambos grupos BA e AA, não apresentando qualquer efeito sobre o medo incondicionado. Ratos previamente classificados como BA mostraram significativo enfraquecimento na expressão de respostas de medo após injeção i.p. de PCPA. Por outro lado, ratos AA foram mais afetados pela redução central de 5-HT.

- A microinjeção local de agonistas 5-HT diretamente no CPL de ratos promoveu efeitos diferenciais sobre a resposta aprendida de medo, efeitos esses dependentes dos níveis inatos de ansiedade dos animais. Nesta região a 5-HT modula a expressão da resposta condicionada de medo. Nossos dados mostram que, em ratos AA, esta modulação é dependente de receptores 5-HT_{1A}. Contrariamente às nossas suposições, no entanto, o mesmo não ocorreu para a BLA ou a SCPd. Nessas regiões, os ratos BA mas não os AA foram suscetíveis aos efeitos ansiolíticos da ativação dos receptores 5-HT_{1A}. Além disso, nenhuma alteração foi observada na expressão da resposta incondicionada de medo, não importando a região em estudo, sugerindo que a expressão da resposta condicionada de medo em indivíduos AA pode ser dependente da ação modulatória de outros receptores 5-HT, como o subtipo 5-HT_{1B}, e/ou de alterações em outros sistemas de neurotransmissores como o GABA e glutamato.

- Em nosso terceiro experimento investigamos os efeitos da microinjeção de 5-HT ou 8-OH-DPAT diretamente no CPL, de forma similar ao experimento anterior. Os resultados mostraram que ratas AA apresentaram elevada amplitude de SPM na fase Pro-Est, contrastando com sua baixa amplitude observada na fase Die 1-2 quando comparadas com ratas BA na mesma fase estral. Hipotetizamos que este aumento na amplitude da resposta de sobressalto denuncia uma redução na intensidade de medo e na intensidade da experiência aversiva exibida por ratas AA; tomando como base a influência não monotônica dos níveis de medo sobre a intensidade desta resposta. Por outro lado, as diminuições na resposta de sobressalto observadas em ratas BA durante a fase Pro-Est parecem refletir uma atenuação dos níveis normais de ansiedade que estes animais supostamente apresentam. Estes resultados reiteram a importância dos hormônios ovarianos na manutenção do equilíbrio emocional

adaptativo. A modulação farmacológica dos receptores 5-HT desta região os dados mostraram que, se testadas durante a fase Pro-Est, ratas AA mostraram-se mais suscetíveis aos efeitos das drogas, como demonstrado pela redução na amplitude do SPM após as infusões de 5-HT ou de 8-OH-DPAT. Nenhuma alteração no SPM de ratas BA foi notada. Ao contrário, este efeito foi observado de forma consistente em ratas BA testadas durante a fase Die 1-2, mas não no grupo AA, sugerindo um efeito ansiolítico.

- Em nosso último experimento, os dados coletados mostraram que a administração intra-BLA de 5-HT ou 8-OH-DPAT em ratas AA testadas durante a fase Pro-Est mostrou uma tendência em reduzir a resposta de medo condicionado. No entanto, apenas o agonista de receptores 5-HT_{1A} provou ser efetivo em significativamente diminuir esta resposta. Esta diminuição denuncia uma ação ansiolítica da droga sobre os níveis de medo em indivíduos AA. Este efeito é diferente do observado nos ratos testados sob condições semelhantes, o que significa que os efeitos da 5-HT dependem do estado hormonal. Nenhuma mudança foi observada entre os grupos testados durante a fase Die 1-2, dados semelhantes aos encontrados com ratos. A administração intra-SCPd de 5-HT ou 8-OH-DPAT não alterou as medidas de sobressalto, não importando a fase hormonal ou os níveis de ansiedade. Os dados coletados dos animais testados na fase Die 1-2 foram similares àqueles encontrados em ratos machos, em um estudo anterior. Isto reforça a ideia de que dados coletados a partir de ratos podem ser usados como controle do ciclo estral em ratas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J.P.; SAUNDERS, R.C. The amygdala – what’s happened in the last decade. The amygdala: A functional analysis. **Oxford: Oxford University Press**, 1-30, 2000.

AGUIAR, D.C.; HOTT, S.C.; DEOLINDO, M.V.; GUIMARÃES, F.S.; RESSTEL, L.B. The dorsolateral periaqueductal grey N-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. **Journal of Psychopharmacology**, 28:479-485, 2013.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. **Neural Plasticity**, 2007:30873, 2007.

ALTIERI, S.C.; GARCIA-GARCIA, A.L.; LEONARDO, E.D.; ANDREWS, A.M. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, 4:72-83, 2013.

AMARGOS-BOSCH, M.; BORTOLOZZI, A.; PUIG, M.V.; SERRATS, J.; ADELL, A.; CELADA, P.; TOTH, M.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, 14:281-299, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (DSM-IV). Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. **Porto Alegre: Artmed**, 4ª Ed., 2002.

AMIN, Z.; CANLI, T.; EPPERSON, C.N. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, 4:43-58, 2005.

ANGLADA-FIGUEROA, D.; QUIRK, G.J. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. **The Journal of Neuroscience**, 25:9680-9685, 2005.

ARANGO, V.; UNDERWOOD, M.D.; MANN, J.J. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. **Progress in Brain Research**, 136:443-453, 2002.

ARPELS, J.C. The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. **The Journal of Reproductive Medicine**, 41:633-639, 1996.

AZNAR, S.; KLEIN, A.B. Regulating prefrontal cortex activation: an emerging role for the 5-HT (2)_A serotonin receptor in the modulation of emotion-based actions? **Molecular Neurobiology**, 48:841-853, 2013.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Research**, 439:95-106, 1988.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Progress in Brain Research**, 87:269-305, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, 17:379-389, 1994.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, 46:575-605, 1995.

- BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **The Journal of Comparative Neurology**, 237:445-459, 1985.
- BEITZ, A.J.; SHEPARD, R.D. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. **The Journal of Comparative Neurology**, 237:460-475, 1985.
- BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; MULLETT, M.A.; ECKLUND, L.J. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 250:498-509, 1986.
- BELELLI, D.; HARRISON, N.L.; MAGUIRE, J.; MACDONALD, R.L.; WALKER, M.C.; COPE, D.W. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. **The Journal of Neuroscience**, 29:12757-12763, 2009.
- BENMANSOUR, S.; WEAVER, R.S.; BARTON, A.K.; ADENIJI, O.S.; FRAZER, A. Comparison of the effects of estradiol and progesterone on serotonergic function. **Biological Psychiatry**, 71:633-641, 2012.
- BETHEA, C.L.; LU, N.Z.; GUNDLAH, C.; STREICHER, J.M. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 23:41-100, 2002.
- BISHOP, S.J. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. **Trends in Cognitive Science**, 11:307-316, 2007.
- BRACK, K.E., LOVICK, T.A. Neuronal excitability in the periaqueductal gray matter during the estrous cycle in female Wistar rats. **Neuroscience**, 144:325-335, 2007.
- BRANDÃO, M.L.; LOPEZ-GARCIA, J.A.; GRAEFF, F.G.; ROBERTS, M.H.T. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurons of the rat midbrain tectum. **Brain Research**, 556:259-266, 1991.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; DE ARAUJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23:863-875, 1999.
- BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 29:1299-1311, 2005.
- BROIZ, A.C.; OLIVEIRA, L.C.; BRANDÃO, M.L. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 89:76-84, 2008.
- BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, 94:1704-1708, 1974.
- CAMPBELL, S.; WHITEHEAD, M. Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. **Clinics in Obstetrics and Gynaecology**, 4:31-47, 1977.
- CANLI, T.; LESCH, K.P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. **Nature Neuroscience**, 10:1103-1109, 2007.

- CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdale, ventral striatum and prefrontal cortex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 26:321-352, 2002.
- CARLTON, P.L.; ADVOKAT, C. Attenuated habituation due to parachlorophenylalanine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1:657-663, 1973.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, 58:27-47, 1993.
- CASTANEDA, A.E.; TUULIO-HENRIKSSON, A.; MARTTUNEN, M.; SUVISAARI, J.; LONNQVIST, J. A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. **Journal of Affective Disorders**, 106:1-27, 2008.
- CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology**, 155:154-162, 2001.
- CHALMERS, D.V.; HOHF, J.C.; LEVINE, S. The effects of prior aversive stimulation on the behavioral and physiological responses to intense acoustic stimuli in the rat. **Physiology and Behavior**, 12:711-717, 1974.
- CLARK, M.S.; VINCOW, E.S.; SEXTON, T.J.; NEUMAIER, J.F. Increased expression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus decreases fear-potentiated startle in a stress dependent manner. **Brain Research**, 1007:86-97, 2004.
- CONNER, R.L.; STOLK, J.M.; BARCHAS, J.D.; LEVINE, S. Parachlorophenylalanine and habituation to repetitive auditory startle stimuli in rats. **Physiology and Behavior**, 5:1215-1219, 1970.
- CORCORAN, K.A.; QUIRK, G.J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. **The Journal of Neuroscience**, 27:840-844, 2007.
- DALLEY, J.W.; CARDINAL, R.N.; ROBBINS, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28:771-784, 2004.
- DAVIDSON, R.J. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. **Biological Psychiatry**, 51:68-80, 2002.
- DAVIS, M.; ASTRACHAN, D.I. Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, 4:95-103, 1978.
- DAVIS, M.; FALLS, W.A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. **Behavioral Brain Research**, 58:175-198, 1993.
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **Journal of Neuroscience**, 22:2343-2351, 2006.
- DE OCA, B.M.; DECOLA, J.P.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **The Journal of Neuroscience**, 18:3426-3432, 1998.

DE PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI, JR.H. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, 64:181-188, 2004.

DE SOUZA SILVA, M.A.; MARCHETTI, L.; EISEL, U.L.; HUSTON, J.P.; DERE, E. NR2C by NR2B subunit exchange in juvenile mice affects emotionality and 5-HT in the frontal cortex. **Genes, Brain and Behavior**, 6:465-472, 2007.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, 5:305-315, 1991.

DELAMATER, A.R. On the nature of CS and US representations in Pavlovian learning. **Learning and Behavior**, 40:1-23, 2012.

DI SCALA, G.; MANA, M.J.; JACOBS, W.J.; PHILLIPS, A.G. Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. **Physiology and Behavior**, 40:55-63, 1987.

DIAZ-VELIZ, G.; URRESTA, F.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. **Physiology and Behavior**, 50:61-65, 1991.

DUPONT, R.L.; RICE, D.P.; MILLER, L.S.; SHIRAKI, S.S.; ROWLAND, C.R.; HANWOOD, H.J. Economic costs of anxiety disorders. **Anxiety**, 2:167-172, 1996.

DUVARCI, S.; PARÉ, D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. **The Journal of Neuroscience**, 27:4482-4491, 2007.

EHRlich, I.; HUMEAU, Y.; GRENIER, F.; CIOCCHI, S.; HERRY, C.; LUTHI, A. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, 62:757-771, 2009.

EICHENBERGER, G.C.; RIBEIRO, S.J.; OSAKI, M.Y.; MARUOKA, R.Y.; RESENDE, G.C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORREA, S.A.; DA SILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. **Neuropharmacology**, 42:48-59, 2002.

ETKIN, A.; WAGER, T.D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, 164:1476-1488, 2007.

EVANS, H.M.; LONG, J.A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 8:38-39, 1922.

EZEQUIEL LEITE, L.; NOBRE, M.J. The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. **Neuroscience**, 213:93-105, 2012.

FECHTER, L.D. Central serotonin involvement in the elaboration of the startle reaction in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2:161-171, 1974.

FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H.U. Lesions of the central gray block the sensitization of the acoustic startle response in rats. **Brain Research**, 661:163-173, 1994.

FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H.U. Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. **Behavior Brain Research**, 74:127-134, 1996.

FERNANDEZ, S.P.; GASPAR, P. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. **Neuropharmacology**, 62:144-154, 2011.

FERREIRA, R.; NOBRE, M.J. Conditioned fear in low- and high-anxious rats is differentially regulated by cortical subcortical and midbrain 5-HT1A receptors. **Neuroscience**, 268:159-168, 2014.

FLINT, J.; CORLEY, R.; DEFRIES, J.C.; FULKER, D.W.; GRAY, J.A.; MILLER, S.; COLLINS, A.C. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. **Science**, 269:1432-1435, 1995.

FROKJAER, V.G.; MORTENSEN, E.L.; NIELSEN, F.A.; HAUGBOL, S.; PINBORG, L.H.; ADAMS, K.H.; SVARER, C.; HASSELBALCH, S.G.; HOLM, S.; PAULSON, O.B.; KNUDSEN, G.M. Frontolimbic serotonin 2A receptor binding in healthy subjects is associated with personality risk factors for affective disorder. **Biological Psychiatry**, 63:569-576, 2008.

FUSTER, J.M. The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. **New York, USA: Raven Press.**, 2001.

GANGISETTY, O.; REDDY, D.S. Neurosteroid withdrawal regulates GABA-A receptor alpha4-subunit expression and seizure susceptibility by activation of progesterone receptor-independent early growth response factor-3 pathway. **Neuroscience**, 170:865-880, 2010.

GEYER, M.A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. In: Bloom F.E.; Kupfer D.J., eds. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. **New York: Raven Press**, 1995:787-798, 1995.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research**, 80:84-97, 2007.

GOLDSTEIN, J.M.; JERRAM, M.; POLDRACK, R.; AHERN, T.; KENNEDY, D.N.; SEIDMAN, L.J.; MAKRIS, N. Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging. **The Journal of Neuroscience**, 25:9309-9316, 2005.

GONZALEZ, M.I.; LERET, M.L. Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 41:329-332, 1992.

GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. **Brain Research**, 732:145-153, 1996.

GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHUTZ, M.T. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, 22:173-180, 1986.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioral Brain Research**, 58:123-131, 1993.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 27:811-829, 1994.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; DE ANDRADE, T.G.; DEAKIN, J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54:129-141, 1996.

GRAEFF, F.G. Serotonergic systems. **The Psychiatric Clinics of North America**, 20:723-739, 1997.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 21:791-799, 1997.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28:239-259, 2004.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, JR.H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, 10:207-217, 2010.

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

GROENEWEGER, H.J.; UYLINGS, H.B.M. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. **Progress in Brain Research**, 126:3-28, 2000.

GROS, D.F.; ANTONY, M.M.; MCCABE, R.E.; SWINSON, R.P. Frequency and severity of the symptoms of irritable bowel syndrome across the anxiety disorders and depression. **Journal of Anxiety Disorders**, 23:290-296, 2009.

GROSS, C.; HEN, R. Genetic and environmental factors interact to influence anxiety. **Neurotoxicity Research**, 6:493-501, 2004.

HALE, M.W.; LOWRY, C.A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology**, 213:243-264, 2011.

HANDLEY, S.L.; MACBLANE, J.W.; CRITCHLEY, M.A.E.; NJUNG'E, K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. **Behavioural Brain Research**, 58:203-210, 1993.

HARIRI, A.R.; MATTAY, V.S.; TESSITORE, A.; KOLACHANA, B.; FERA, F.; GOLDMAN, D.; EGAN, M.F.; WEINBERGER, D.R. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. **Science**, 297:400-403, 2002.

HARVEY, M.L.; SWALLOWS, C.L.; COOPER, M.A. A double dissociation in the effects of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors on the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Behavioral Neuroscience**, 126:530-537, 2012.

HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. **European Journal of Pharmacology**, 378:23-30, 1999.

HAYTON, S.J.; MAHONEY, M.K.; OLMSTEAD, M.C. Behavioral traits predicting alcohol drinking in outbred rats: an investigation of anxiety, novelty seeking, and cognitive flexibility. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 36:594-603, 2012.

- HEISLER, L.K.; CHU, H.M.; BRENNAN, T.J.; DANAIO, J.A.; BAJWA, P.; PARSONS, L.H.; TECOTT, L.H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95:15049-15054, 1998.
- HENDRIE, C.A.; WEISS, S.M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54:13-20, 1996.
- HENNIGER, M.S.; OHL, F.; HOLTER, S.M.; WEISSENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LORSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. **Behavioral Brain Research**, 111:153-163, 2000.
- HETTEMA, J.M.; NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, 158:1568-1578, 2001.
- HIROI, R.; NEUMAIER, J.F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioural Brain Research**, 166:93-100, 2006.
- HOFMANN, S.G. Cognitive processes during fear acquisition and extinction in animals and humans: implications for exposure therapy of anxiety disorders. **Clinical Psychology Review**, 28:199-210, 2008.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54:21-30, 1996.
- HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANI, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P.A. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacological Reviews**, 46:157-203, 1994.
- HRITCU, L.; CLICINSCHI, M.; NABESHIMA, T. Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. **Physiology and Behavior**, 91:652-657, 2007.
- HUBSCHER, C.H.; BROOKS, D.L.; JOHNSON, J.R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic and Histochemistry**, 80:79-87, 2005.
- INOUE, T.; LI, X.B.; ABEKAWA, T.; KITAICHI, Y.; IZUMI, T.; NAKAGAWA, S.; KOYAMA, T. Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. **European Journal of Pharmacology**, 497:311-316, 2004.
- IZQUIERDO, A.; CARLOS, K.; OSTRANDER, S.; RODRIGUEZ, D.; MCCALL-CRADDOLPH, A.; YAGNIK, G.; ZHOU, F. Impaired reward learning and intact motivation after serotonin depletion in rats. **Behavioural Brain Research**, 233:494-499, 2012.
- JIANG, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, S.; GAMBLE, E.H.; JIA, M.; URSANO, R.J.; LI H. 5-HT_{2A} receptor antagonism by MDL 11,939 during inescapable stress prevents subsequent exaggeration of acoustic startle response and reduced body weight in rats. **Journal of Psychopharmacology**, 25:289-297, 2011.
- JOËLS, M.; KARST, H.; KRUGERS, H.J.; LUCASSEN, P.J. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 28:72-96, 2007.
- KAGAN, J.; SNIDMAN, N. Early childhood predictors of adult anxiety disorders. **Biological Psychiatry**, 46:1536-1541, 1999.

- KAVUSHANSKY, A.; RICHTER-LEVIN, G. Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. **Journal of Neuroscience Research**, 84:1580-1587, 2006.
- KAWAHARA, H.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M.; TANAKA, M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neuroscience Letters**, 162:81-84, 1993.
- KAWAHARA, H.; KAWAHARA, Y.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M.; TANAKA, M. Serotonin release in the rat amygdala during exposure to emotional stress. In Elsevier (Ed.), Serotonin in the central nervous system and periphery. **Amsterdam: Elsevier**, 89-96, 1995.
- KINGSBURY, M.A.; KELLY, A.M.; SCHROCK, S.E.; GOODSON, J.L. Mammal-like organization of the avian midbrain central gray and a reappraisal of the intercollicular nucleus. **Plos One**, 6:1-13, 2011.
- KLUMPERS, F.; RAEMAEEKERS, M.A.H.L.; RUIGROK, A.N.V.; HERMANS, E.J.; KENEMANS, J.L.; BAAS, J.M.P. Prefrontal mechanisms of fear reduction after threat offset. **Biological Psychiatry**, 68:1031-1038, 2010.
- KNIGHT, D.C.; NGUYEN, H.T.; BANDETTINI, P.A. The role of the human amygdala in the production of conditioned fear responses. **NeuroImage**, 26:1193-1200, 2005.
- KOE, B.K.; WEISSMAN, A. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 154:499-516, 1966.
- KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Research**, 320:65-98, 1984.
- KRAJNAK, K.; ROSEWELL, K.L.; DUNCAN, M.J.; WISE, P.M. Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. **Brain Research**, 990:87-94, 2003.
- KRYSTAL, J.H.; WEBB, E.; GRILLON, C.; COONEY, N.; CASAL, L.; MORGAN, C.A.^{3RD}; SOUTHWICK, S.M.; DAVIS, M.; CHARNEY, D.S. Evidence of acoustic startle hyperreflexia in recently detoxified early onset male alcoholics: modulation by yohimbine and m-chlorophenylpiperazine (mCPP). **Psychopharmacology**, 131:207-215, 1997.
- KULIKOV, A.; AGUERRE, S.; BERTON, O.; RAMOS, A.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 281:775-784, 1997.
- LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDER, C.A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, 114:1119-1130, 2000.
- LAMBERT, J.J.; COOPER, M.A.; SIMMONS, R.D.; WEIR, C.J.; BELELLI, D. Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. **Psychoneuroendocrinology**, 34:48-58, 2009.
- LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior Genetics**, 32:301-314, No. 5, 2002.
- LANDGRAF, R.; WIGGER, A. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. **Stress**, 6:111-119, 2003.

- LANG, P.J.; BRADLEY, M.M. Emotion and the motivational brain. **Biological Psychology**, 84:437-450, 2010.
- LAUZON, N.M.; LAVIOLETTE, S.R. Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: implications for neuropsychiatric disorders. **Behavioral Brain Research**, 208:12-22, 2010.
- LEBRON-MILAD, K.; MILAD, M.R. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. **Biology of Mood and Anxiety Disorders**, 2:1-12, 2012.
- LEDOUX, J.E. The amygdala: contributions to fear and stress. **Seminars in Neuroscience**, 6:231-237, 1994.
- LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annual Reviews of Neuroscience**, 23:155-184, 2000.
- LEONARDO, E.D.; HEN, R. Genetics of affective and anxiety disorders. **Annual Reviews of Psychology**, 57:117-137, 2006.
- LEUNER, B.; SHORS, T.J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**, 251:108-119, 2013.
- LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioral Brain Research**, 94:301-310, 1998.
- LINNMAN, C.; MOULTON, E.A.; BARMETTLER, G.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. **NeuroImage**, 60:505-522, 2012.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, 46:321-340, 1990.
- LIVESEY, P.J. Learning and Emotion: A Biological Synthesis. **Lawrence Erlbaum Associates**, 312p., 1986.
- LOVICK, T.A. Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurons in the periaqueductal grey matter in the rat. **Brain Research**, 606:92-98, 1993.
- LOVICK, T.A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 45:314-320, 2012.
- LOWRY, C.A.; JOHNSON, P.L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J.; SHEKHAR, A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress**, 8:233-246, 2005.
- LOWRY, C.A.; HALE, M.W.; EVANS, A.K.; HEERKENS, J.; STAUB, D.R.; GASSER, P.J.; SHEKHAR, A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1148:86-94, 2008.
- MAHAN, A.L.; RESSLER, K.J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends in Neurosciences**, 35:24-35, 2012.
- MALLO, T.; KOIV, K.; KOPPEL, I.; RAUDKIVI, K.; UUSTARE, A.; RINKEN, A.; TIMMUSK, T.; HARRO, J. Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. **Brain Research**, 1194:110-117, 2008.

MANDL, A.M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **The Journal of Experimental Biology**, 28:576-584, 1951.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, 62:609-614, 2002.

MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends in Neurosciences**, 22:561-567, 1999.

MARTINEZ, D.; HWANG, D.; MAWLAWI, O.; SLIFSTEIN, M.; KENT, J.; SIMPSON, N.; PARSEY, R.V.; HASHIMOTO, T.; HUANG, Y.; SHINN, A.; VAN HEERTUM, R.; ABIDARGHAM, A.; CALTABIANO, S.; MALIZIA, A.; COWLEY, H.; MANN, J.J.; LARUELLE, M. Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [11C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. **Neuropsychopharmacology**, 24:209-229, 2001.

MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. **European Neuropsychopharmacology**, 17:717-724, 2007.

MASWOOD, S.; STEWART, G.; UPHOUSE, L. Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, on hypothalamic serotonin. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 51:807-813, 1995.

MASWOOD, S.; TRUITT, W.; HOTEMA, M.; CALDAROLA-PASTUSZKA, M.; UPHOUSE, L. Estrous cycle modulation of extracellular serotonin in mediobasal hypothalamus: role of the serotonin transporter and terminal autoreceptors. **Brain Research**, 831:146-154, 1999.

MCCLURE, E.B.; MONK, C.S.; NELSON, E.E.; PARRISH, J.M.; ADLER, A.; BLAIR, R.J.; FROMM, S.; CHARNEY, D.S.; LEIBENLUFT, E.; ERNST, M.; PINE, D.S. Abnormal attention modulation of fear circuit function in pediatric generalized anxiety disorder. **Archives of General Psychiatry**, 64:97-106, 2007.

MCDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, 55:257-332, 1998.

MCEWEN, B.S.; EILAND, L.; HUNTER, R.G.; MILLER, M.M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, 62:3-12, 2012.

MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, 27:1-28, 2004.

MCTEAGUE, L.M.; LANG, P.J. The anxiety spectrum and the reflex physiology of defense: from circumscribed fear to broad distress. **Depression and Anxiety**, 29:264-281, 2012.

MECHAN, A.O.; MORAN, P.M.; ELLIOTT, M.; YOUNG, A.J.; JOSEPH, M.H.; GREEN, R. A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. **Psychopharmacology (Berl)**, 159:167-175, 2002.

MERALI, Z.; ANISMAN, H.; JAMES, J.S.; KENT, P.; SCHULKIN, J. Effects of corticosterone on corticotrophin-releasing hormone and gastrin-releasing peptide release in response to an aversive stimulus in two regions of the forebrain (central nucleus of the amygdala and prefrontal cortex). **The European Journal of Neuroscience**, 28:165-172, 2008.

- MILLER, M.M.; MORRISON, J.H.; MCEWEN, B.S. Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. **Behavioral Brain Research**, 229:280-288, 2012.
- MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J.L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R.J.; FRITH, C.D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, 317:1079-1083, 2007.
- MONTES, G.S.; LUQUE, E.H. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. **Acta Anatomica**, 133:192-199, 1988.
- MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, 21:609-620, 1996.
- MOREIRA, F.A.; GOBIRA, P.H.; VIANA, T.G.; VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, JR.H.; GRAEFF, F.G. Modeling panic disorder in rodents. **Cell and Tissue Research**, 354:119-125, 2013.
- MORGAN, M.A.; ROMANSKI, L.M.; LEDOUX, J.E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, 163:109-113, 1993.
- MORGAN, M.A.; SCHULKIN, J.; LEDOUX, J.E. Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. **Behavioural Brain Research**, 146:121-130, 2003.
- MORLEY, K.C.; GALLATE, J.E.; HUNT, G.E.; MALLET, P.E.; MCGREGOR, I.S. Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4 methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). **European Journal of Pharmacology**, 433:91-99, 2001.
- NEQUIN, L.G.; ALVAREZ, J.; SCHWARTZ, N.B. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. **Biology of Reproduction**, 20:659-670, 1979.
- NIETZER, S.L.; BONNB, M.; JANSEN, F.; HEIMINGC, R.S.; LEWEJOHANN, L.; SACHSERC, N.; ASANB, E.S.; LESCHA, K.P.; SCHMITT, A.G. Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: Impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas. **Behavioural Brain Research**, 220:42-54, 2011.
- NOBRE, M.J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M.L. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Hearing Research**, 184:82-90, 2003.
- OHL, F. Animal models of anxiety. **Springer-Verlag, Berlin Heidelberg**, 169:35-69, 2005.
- ÖHMAN, A.; MINEKA, S. Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. **Psychological Review**, 108:483-522, 2001.
- OLIVEIRA, L.C.; BROIZ, A.C.; DE MACEDO, C.E.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. **Psychopharmacology**, 191:253-262, 2007.
- OLIVIER, J.D.; VINKERS, C.H.; OLIVIER, B. The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. **Frontiers in Pharmacology**, 4:1-17, 2013.

- OSTLUND, H.; KELLER, E.; HURD, Y.L. Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1007:54-63, 2003.
- OVERSTREET, D.H.; COMMISSARIS, R.C.; DE LA GARZA, R.; FILE, S.E.; KNAPP, D.J.; SEIDEN, L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. **Stress**, 6:101-110, 2003.
- PAPE, H.C.; PARÉ, D. Plastic synaptic networks of the amygdale for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiological Reviews**, 90:419-463, 2010.
- PARÉ, D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Progress in Neurobiology**, 70:409-420, 2003.
- PARÉ, D.; QUIRK, G.J.; LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neurophysiology**, 92:1-9, 2004.
- PARKS, C.L.; ROBINSON, P.S.; SIBILLE, E.; SHENK, T.; TOTH, M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 95:10734-10739, 1998.
- PAXINOS, G; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (6th ed.). **New York: Academic Press**, 2008.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 24:525-529, 1986.
- PESSOA, L. Emotion and cognition and the amygdala: From “what is it?” to “what’s to be done?” **Neuropsychology**, 48:3416-3429, 2010.
- PETERS, J.; KALIVAS, P.W.; QUIRK, G.J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learning and Memory**, 16:279-288, 2009.
- PHELPS, E.A.; DELGADO, M.R.; NEARING, K.I.; LEDOUX, J.E. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. **Neuron**, 43:897-905, 2004.
- PIGOTT, T.A. Anxiety disorders in women. **The Psychiatric Clinics of North America**, 26:621-672, 2003.
- PLAPPERT, C.F.; PILZ, P.K.; SCHNITZLER, H.U. Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. **Behavioral Neuroscience**, 107:981-987, 1993.
- POLTER, A.M.; LI, X. 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. **Cellular Signalling**, 22:1406-1412, 2010.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for sht_{1a} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. **The Journal of Neuroscience**, 12: 440-453, 1992.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2c} receptors. **Molecular Brain Research**, 23:163-178, 1994.

- POPOVA, N.K.; NAUMENKO, V.S. 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. **Reviews Neuroscience**, 24:191-204, 2013.
- PRICE, J.L. Prefrontal cortical networks related to visceral function and mood. **Annals New York Academy of Sciences**, 877:383-396, 1999.
- PRICE, J.L. Free will versus survival: brain systems that underlie intrinsic constraints on behavior. **The Journal of Comparative Neurology**, 493:132-139, 2005.
- PUIG, M.V.; CELADA, P.; DIAZ-MATAIX, L.; ARTIGAS, F. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. **Cerebral Cortex**, 13:870-882, 2003.
- PUIG M.V.; ARTIGAS, F.; CELADA, P. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. **Cerebral Cortex**, 15:1-14, 2005.
- PUIG, M.V.; WATAKABE, A.; USHIMARU, M.; YAMAMORI, T.; KAWAGUCHI, Y. Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. **The Journal of Neuroscience**, 30:2211-2222, 2010.
- QUIRK, G.J.; BEER, J.S. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. **Current Opinion in Neurobiology**, 16:723-727, 2006.
- QUIRK, G.J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology Reviews**, 33:56-72, 2008.
- RAY, W.J.; MOLNAR, C.; AIKINS, D.; YAMASAKI, A.; NEWMAN, M.G.; CASTONGUAY, L.; BORKOVEC, T.D. Startle response in generalized anxiety disorder. **Depression and Anxiety**, 26:147-154, 2009.
- REIMER, A.E.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. **Brain Research Bulletin**, 76:545-550, 2008.
- REZNIKOV, A.G.; NOSENKO, N.D. Early postnatal changes in sexual dimorphism of catecholamine and indoleamine content in the brain of prenatally stressed rats. **Neuroscience**, 70:547-551, 1996.
- RICHTER-LEVIN, G.; SEGAL, M. Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. **Brain Research**, 477:404-407, 1989.
- ROBINSON, O.J.; OVERSTREET, C.; LETKIEWICZ, A.; GRILLON, C. Depressed mood enhances anxiety to unpredictable threat. **Psychological Medicine**, 42:1397-1407, 2012.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DAVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30:289-304, 1997.
- ROOZENDAAL, B.; VAN DER ZEE, E.A.; HENSBOEK, R.A.; MAAT, H.; LUITEN, P.G.M.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the amygdala-II. Fear-induced plasticity. **Neuroscience**, 76:75-83, 1997.
- ROSEN, J.B. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, 3:23-41, 2004.

- SALOMÉ, N.; SALCHNER, P.; VILTART, O.; SEQUEIRA, H.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. Neurobiological correlates of high (hab) versus low anxiety-related behavior (lab): differential fos expression in hab and lab rats. **Biological Psychiatry**, 55:715-723, 2004.
- SANGER, G.J. 5-hydroxytryptamine and the gastrointestinal tract: where next? **Trends in Pharmacological Sciences**, 29:465-471, 2008.
- SANTOS, J.M.; MARTINEZ, R.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European Journal of Pharmacology**, 542:121-128, 2006.
- SCHUTZ, M.T.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology (Berl)**, 85:340-345, 1985.
- SEAMANS, J.K.; LAPISH, C.C.; DURSTEWITZ, D. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. **Neurotoxicity Research**, 14:249-262, 2008.
- SHEETS, L.P.; COOK, L.L.; REITER, L.W. Serotonergic modulation of the acoustic startle response in rats during preweaning development. **Pharmacological, Biochemistry and Behavior**, 33:415-422, 1989.
- SHERWIN, B.B. Estrogen and cognitive functioning in women. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 217:17-22, 1998.
- SHIN, L.M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, 35:169-191, 2010.
- SIERRA-MERCADO, D.; PADILLA-COREANO, N.; QUIRK, G.J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, 36:529-538, 2011.
- SIMONDS, V.M.; WHIFFEN, V.E. Are gender differences in depression explained by gender differences in co-morbid anxiety? **Journal of Affective Disorders**, 77:197-202, 2003.
- SMITH, S.S.; GONG, Q.H.; HSU, F.C.; MARKOWITZ, R.S.; FFRENCH-MULLEN, J.M.; LI, X. GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. **Nature**, 392:926-930, 1998.
- SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G.J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, 20:231-235, 2010.
- SPAMPINATO, M.V.; WOOD, J.N.; DE SIMONE, V.; GRAFMAN, J. Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, 21:199-205, 2009.
- STEIN, C.; DAVIDOWA, H.; ALBRECHT, D. 5-HT (1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. **Synapse**, 38:328-337, 2000.
- STENZEL-POORE, M.P.; HEINRICHS, S.C.; RIVES, S.; KOOB, G.F.; VALE, W.W. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. **The Journal of Neuroscience**, 14:2579-2584, 1994.

STEPHENSON-JONES, M.; SAMUELSSON, E.; ERICSSON, J.; ROBERTSON, B.; GRILLNER, S. Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. **Current Biology**, 21:1081-1091, 2011.

STEVENSON, C.W. Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 96:315-323, 2011.

STROBEL, A.; GUTKNECHT, L.; ROTHE, C.; REIF, A.; MÖSSNER, R.; ZENG, Y.; BROCKE, B.; LESCH, K.P. Allelic variation in 5-HT_{1A} receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. **Journal of Neural Transmission**, 110:1445-1453, 2003.

SULLIVAN, R.M.; GRATTON, A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. **Psychoneuroendocrinology**, 27:99-114, 2002.

TERRY, A.V. JR.; BUCCAFUSCO, J.J.; WILSON, C. Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. **Behavioural Brain Research**, 195:30-38, 2008.

TOMKINS, D.M.; SELLERS, E.M.; FLETCHER, P.J. Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. **Neuropharmacology**, 33:349-358, 1994.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. **Gender Medicine**, 6:300-311, 2009.

WALKER, D.L.; DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. **Behavioral Neuroscience**, 111:692-702, 1997.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25:275-286, 2001.

WEISSTAUB, N.V.; ZHOU, M.; LIRA, A.; LAMBE, E.; GONZALEZ-MAESO, J.; HORNING, J.P.; SIBILLE, E.; UNDERWOOD, M.; ITOHARA, S.; DAUER, W.T.; ANSORGE, M.S.; MORELLI, E.; MANN, J.J.; TOTH, M.; AGHAJANIAN, G.; SEALFON, S.C.; HEN, R.; GINGRICH, J.A. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. **Science**, 313:536-540, 2006.

WITTCHEN, H.U.; FUETSCH, M.; SONNTAG, H.; MÜLLER, N.; LIEBOWITZ, M. Disability and quality of life in pure and comorbid social phobia. Findings from a controlled study. **European Psychiatry**, 15:46-58, 2000.

WITTCHEN, H.U. Generalized anxiety disorder: prevalence, burden, and cost to society. **Depression and Anxiety**, 16:162-171, 2002.

YONKERS, K.A.; ELLISON, J.M. Anxiety disorders in women and their pharmacological treatment. In: Psychopharmacology and women: sex, gender and hormones. **American Psychiatric Press, Washington D.C.**, pp 43-71, 1996.

YOSHIOKA, M.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H.; SAITO, H. Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. **Pharmacological, Biochemistry and Behavior**, 51:515-519, 1995.

ZANGROSSI, JR.H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25:637-645, 2001.

ZANOVELI, J.M.; CARVALHO, M.C.; CUNHA, J.M.; BRANDÃO, M.L. Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, 1294:106-115, 2009.

ZIMMERBERG, B.; FARLEY, M.J. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. **Physiology and Behavior**, 54:1119-1124, 1993.

10. ANEXOS

**Peripheral vs central effects of 5-HT depletion on the expression of
unconditioned and conditioned fear in low- and high-anxiety phenotype
rats**

Renata Ferreira ^{a,c}, and Manoel Jorge Nobre ^{a,b,c}

^a Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^b Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135, Franca, SP, Brasil.

^c Instituto de Neurociências e Comportamento-INEC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Corresponding author: M.J. Nobre

Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: 551636023788

Fax: 551636024830

E-mail: mjnes@usp.br

ABSTRACT

Extensive data in the literature have signalled the importance of serotonin (5-HT) on the modulation of fear and anxiety-like behaviors in rodents. In the present study, we have analyzed the influence of peripheral and central 5-HT neurotransmission on the expression of the unconditioned and conditioned fear in rats that were previously selected as low- (LA) or high-anxiety (HA). For this we used the fear-potentiated startle (FPS) test. The global and central influence of 5-HT was evaluated by using the acute systemic or intraventricular administration of the irreversible tryptophan hydroxylase inhibitor PCPA (p-chlorophenylalanine - 200mg/kg). Dependent variables recorded was the amplitude of unconditioned (USR) and fear-potentiated startle (FPS). Based on previous studies, we hypothesized that the pharmacological manipulation of 5-HT neurotransmission could cause differential effects in LA and HA rats, depending upon the route of administration. Data obtained has amassed new information about the 5-HT modulation on the unconditioned and conditioned fear response in LA and HA rats showing that the peripheral inhibition of 5-HT have an effect on the expression of the learned but not on the unconditioned fear response.

Keywords: Trait anxiety; serotonin; PCPA, unconditioned fear, conditioned fear, startle.

1. INTRODUCTION

When an individual is faced with dangerous stimuli or environmental cues that signal a threat, a coordinated response is quickly engaged in order to avoid this aversive situation, which ends with the expression of an adaptive response. As soon as the danger is no longer perceived the neural systems that underlie this response are switched-off, and the expression of the defensive behavior is ceased. However, in subjects who present a pathological anxiety trait this sustained abnormal state is maintained, even after the threat signal has disappeared (Etkin & Wager, 2007; Shin & Liberzon, 2010), a phenomenon also observed in laboratory animals. In fact, studies using previously selected genotypic or phenotypic low-anxiety (LA) and high-anxiety (HA) rats have shown that the reactivity of LA animals to diverse challenges differs from that of HA ones (Ezequiel Leite & Nobre, 2012; Henniger et al., 2000; Liebsch, Montkowski, Holsboer, & Landgraf, 1998).

Serotonin (5-HT) is an ancient molecule that has an important role in the modulation of mood, sleep, cognition, learning and memory, reward and emotion (Meneses & Liy-Salmeron, 2012). Regarding emotional features, classical ideas about the function of 5-HT involve the assumption that the aversive processing leads to behavioral inhibition, in spite of these functions seem to be unrelated (Deakin, 1991; Thornton & Goudie, 1978). In line with this idea, 5-HT acute depletion induced by systemic administration of para-chlorophenylalanine (PCPA), a drug that inhibits the 5-HT production by irreversibly blocking the enzyme tryptophan hydroxylase, increases the punished response in conflict models (Geller & Blum, 1970; Robichaud & Sledge, 1969). It is supposed that 5-HT-inhibition of aversive thoughts may allow individuals to cope with the aversive events, as punishment prediction reduces its impact.

The conditioned fear response is a discriminative learning based on Pavlovian, or classically, aversive conditioning, where earlier neutral stimuli acquire the property to

elicit a conditioned aversive response (Delamater, 2012; Landeira-Fernandez, 1996). The role of 5-HT on fear conditioning is to help the individual to adjust behavior towards specific elements of the environment as, for instance, the conditioned stimuli. This statement is supported by studies showing that 5-HT levels in the amygdala increase in response to cued conditioned fear (Zanoveli, Carvalho, Cunha, & Brandao, 2009). Moreover, increases in extracellular 5-HT were found in the mPFC (Hashimoto, Inoue, & Koyama, 1999; Yoshioka, Matsumoto, Togashi, & Saito, 1995) and amygdala (Kawahara, 1995) after contextual fear conditioning. This is not true, however, for unconditioned fear stimuli.

In subjects with different levels of anxiety, processing of fear responses may be influenced by their innate predisposition to respond (or vice-versa) and the basal endogenous levels of 5-HT could account for the dissimilarities observed between low- (LA) and high-anxiety (HA) individuals. In the present study, we aimed to understand the influence of 5-HT neurotransmission on the expression of unconditioned and conditioned fear in rats that were previously selected as LA or HA, as defined by the baseline amplitude of the unconditioned startle response (USR). The study focused mainly on the peripheral and central effects of 5-HT inhibition through systemic (IP) or intraventricular (IV) injections of PCPA, respectively, by using the behavioral paradigm of fear-potentiated startle (FPS). Taking into account the widely known role of 5-HT on anxiety, we predict that 5-HT depletion will cause differential effects in LA and HA rats, depending upon the method of administration (systemic vs central), resulting in the expression of an anxiolytic-like behavior in HA but not in LA rats.

2. MATERIALS AND METHODS

Animals

One-hundred and six male Wistar rats, from the campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, weighing $200 \pm 10\text{g}$ at the beginning of the experiments. The animals remain undisturbed for 1 week, in order to be acclimatized to the living conditions in the Laboratory of Neuropsychopharmacology. They were housed in groups of 4 in Plexiglas-walled cages ($45 \times 35 \times 15\text{cm}$) with free access to food and water, in a 12/12-hour light/dark cycle (lights on at 7 a.m.).

Ethical Requirements

This study received the formal approval of the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA – process 12.1.144.53.7) of the University of São Paulo. It was performed according to the recommendations of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior and the U. S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The number of animals used was the minimum required to ensure reliability of the results, and every effort was made to minimize animal suffering.

Experimental apparatus

Potentiated startle was recorded by using four sound-attenuating chambers (45cm deep x 48cm high x 48cm wide) within which there was a testing cage (16.5 x 7.5 x 7.5cm) made of Plexiglas, with the floor consisting of 6 stainless-steel bars spaced every 15mm among them. This testing cage was fixed to a stabilimeter (Insight, São Paulo, Brazil) by four thumb screws. Inside the stabilimeter, a load-cell captured the pressure on the response platform during startle reaction generating analogue signals that were analyzed by a software (Startle Reflex, Insight, São Paulo, Brazil). The sound stimuli (50ms burst of white noise) and background noise (55dB) were delivered through a loudspeaker located 10cm behind the testing cage. The startle reaction was recorded within a time window of 200ms after the onset of the startle stimulus. For the fear conditioning training an electrical

stimulator (scrambler) was linked to 18 stainless-steel bars, spaced every 15mm, that compose the floor of four different conditioning boxes (20cm deep x 21cm high x 23cm wide). This apparatus allows the foot-shocks to be delivered during fear-conditioning sessions. Rats were conditioned to light-CS, with these conditioning boxes located inside two small Plexiglas chambers (25cm deep x 35cm high x 34cm wide) whose walls and ceiling were composed of horizontal black and white stripes (4cm wide). An opening in the rear wall allowed the presentation of the conditioned stimulus used (light). This chamber was located inside a sound-attenuating shell, as described above.

Experimental groups

Groups were formed as follows: LA x IP injections: PBS (n=9), PCPA 24h (n=9), 48h (n=8), 72h (n=8). HA x IP injections: PBS (n=9), PCPA 24h (n=9), 48h (n=7), 72h (n=7). LA and HA x IV injections: n=10 by group.

Experimental procedure

Selection of low-anxiety (LA) and high-anxiety (HA) related behavior rats

Rats were allocated to the LA or HA groups according to the amplitude of USR recorded on the second day of matching, in such a way that animals presenting low startle amplitude were allocated to the LA group and rats presenting high unconditioned startle amplitude were allocated to the HA group. This procedure was adapted to this study taking into account that it was shown that increases in the auditory startle response correlate with innate levels of anxiety in both human and laboratory subjects (Krystal et al., 1997; Plappert, Pilz, & Schnitzler, 1993; Ray et al., 2009).

Fear-potentiated startle

Matching sessions: baseline

During the 2 days of matching, the animals were placed in the testing cage for a 5-min habituation period and, after that, were presented with a series of 30 startle-eliciting

noise bursts (10 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB), with a 30-sec mean inter-trial interval (ITI). Startle stimuli were presented in a quasi-random order with the restriction that each intensity occurring once within each successive block of three stimuli. The mean startle amplitude across the 30 test trials for each rat was used for matching the animals into LA and HA groups. Each matching session was 20-min in duration, including the habituation period.

Training sessions: fear conditioning

Twenty-four hours after the second matching session, the animals underwent the stereotaxic surgery. Five days after, LA and HA animals were submitted to the fear-conditioning procedure. The animals were placed in the training cage for a habituation-phase of 5min. After this, each rat received 10 pairings of a light (conditioned stimulus – CS, 4sec of duration, 6W) co-terminating with a foot-shock (unconditioned stimuli – US, 1sec of duration, 0.6 mA of intensity). The inter-stimulus interval (ISI) varied randomly between 60 and 180sec. Two fear-conditioning trainings were conducted, with a 24 hour interval between them. The duration of each training session was about 25min, including the habituation time.

Test sessions: fear-potentiated startle (FPS)

On the day after the aversive learning, the FPS was evaluated. For these testing sessions the contexts used during training (striped context) were removed from the sound-attenuating chambers. Sessions were conducted without foot-shock presentation in the context as the same way as used for matching. During test sessions independent groups of rats were challenged with IP injections of saline or PCPA (peripheral effects) and were tested on 24, 48 and 72 time intervals. The most effective dose of PCPA was used by another group that received the drug right into the third ventricle (central effects), in order to test its effects without the influence of the blood-brain barrier. Animals were placed into

the testing cages and, after additional 5min of habituation, they were exposed to 60 startle stimuli (20 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB) with a 30sec ISI. Half of the startle stimulus intensity was presented in the absence of the CS (noise-alone trials - USR) and the other half were presented in the presence of the CS (light-noise trials - FPS). In the light-noise trials, rats were exposed to a 4s presentation of light-CS, co-terminating with the startle stimulus. The noise-alone and light-noise trials were intermingled at random. The duration of the test session, including habituation time, was 37-min. Dependent variable recorded was the amplitude of startle in both USR and FPS trials.

Surgery

Twenty-four hours after matching 2 (except for the animals belonging to the groups tested with PCPA IP), the animals were anesthetized with a 0.1ml ketamine hydrochloride + 0.1ml xylazine mixture (60/10mg/kg), and mounted in a digital stereotaxic frame (Insight, São Paulo, Brazil). A cannula made from a stainless steel needle (24 gauges, 14mm length) was implanted aimed to the lateral ventricle (anterior/posterior: 0.6mm; medial/lateral: ± 1.4 mm, dorsal/ventral: -4.3 mm). The upper incisor bar was set 2.5mm below the inter-aural line, such that the skull was horizontal between bregma and lambda. The cannula was introduced vertically according the Paxinos and Watson's atlas (2008). Cannulae were fixed to the skull by acrylic resin and three stainless steel screws. At the end of surgery, each animal received an intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (120.000UI, 0.2ml) followed by an injection of the anti-inflammatory and analgesic drug Banamine (flumixin meglumine, 2.5 mg/kg). Then, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from blockage. The animals were allowed five days of post-surgery recovery. After this time had elapsed the FPS experiments began. At the end of the experiments, the animals that presented problems upon surgery (death, prosthesis infection, etc.) were removed from the study.

Drug and doses

In this study, we used the irreversibly 5-HT synthesis blocker parachlorophenylalanine-PCPA (200mg/kg IP, 200µg/5µl IV, Sigma - USA). The doses of PCPA were used based on the studies of Koe and Weissman (1966), Richter-Levin and Segall (1989), Izquierdo et al., (2012), and Hritcu et al., (2007) which showed peripheral and central lowered stores of 5-HT after PCPA systemic administration. PCPA was diluted in phosphate-buffer saline (PBS - pH 7.0). PBS was also used as a control solution. The animals were tested 24, 48 and 72 hours after a single IP injection. The most effective dose of IP PCPA was used for IV injection.

Microinjection procedure

A volume of 0.5µl of PBS or PCPA (IV) was delivered at a rate of 0.1µl/min through a 30-gauge stainless steel cannula connected by PE10 tubing to a 5.0µl Hamilton syringe mounted on a syringe pump (Harvard, USA). The injection cannula needle ends were located 2mm below the guide cannulae. After the end of the infusion, the injection cannulae were left in place for 1 min to allow diffusion. The displacement of an air bubble inside the polyethylene tubing was used to monitor the microinjection. Figure 1 detailed the site of drug injections, according with the Atlas of Paxinos & Watson (2008).

Euthanasia, perfusion and histology

The animals were deeply anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (60mg/kg). Ten minutes later, death was determined by the loss of the righting reflex, spontaneous respiration and lack of response to tail pinch. They were then placed in a holding freezer. For histological purposes, IV pre-treated groups were perfused intracardially with phosphate-buffer saline (pH 7.0) followed by a solution of paraformaldehyde (4%). After decapitation, the brains were removed and immersed for 3

hours in fresh 4% formaldehyde. The brains were then removed and transferred to a 30% sucrose solution for cryoprotection. Coronal sections of 60µm were cut on a freezing microtome (Leyca, Nussloch, Germany), mounted on gelatine-coated slides, and stained with neutral-red (Sigma, SL, USA).

Experiment 1

This experiment aimed to analyze the effects of 5-HT depletion induced by a systemic (IP) administration of the tryptophan hydroxylase inhibitor PCPA on the USR and FPS of LA and HA phenotype male rats. Startle was assessed 24, 48 or 72 hours after a single IP injection of PCPA.

Statistical analysis

In order to achieve the baseline difference between LA and HA groups, data from LA and HA controls (PBS injections) were compared using a two-way ANOVA with repeated-measures (RM). Comparisons were made across groups (LA and HA) x trials (noise/light-noise pairings), being the trials were the repeated factor. Following this first statistical comparison, the effects of PCPA were analyzed separately in LA and HA groups. In both cases similar analysis was performed (two-way RM ANOVA) across group treatments (PBS and PCPA – 24, 48 and 72 h) x conditions (dependent variable recorded during noise alone or light-noise trials – the repeated measures). In the case of ANOVA detecting any significant difference between factors, comparisons a posteriori was made using the Tukey HSD post-hoc test for unequal N. The probability of significance was set at 5% ($P \leq 0.05$) for all comparisons.

Results

The statistical analysis showed significant differences within (noise x light-noise; $F_{1,16}=136.57$; $p<0.0001$) and between groups (LA x HA; $F_{1,16}=17.70$; $p<0.0005$). Tukey post-hoc revealed that HA rats tended to exhibit increased USR and FPS, comparing with

the LA rats (figure 1 – PBS columns). Moreover, in addition to the high level of startle sensitivity, HA rats also showed decreased latency to respond (data not showed).

The second analysis showed that the effects of an acute injection of PCPA on unconditioned and conditioned fear in LA rats were time dependent. In fact, in spite of no differences were noted in factor treatment ($F_{3,30}=0.09$; $p>0.05$), the main differences were obtained within trials ($F_{1,30}=72.31$; $p<0.00001$) and a significant interaction between factors were also observed ($F_{3,30}=5.09$; $p<0.005$). This difference was on the temporal effects of PCPA on startle, with the drug affecting the FPS 24 and 48 hours, but not 72 hours after a single injection (Figure 1, left).

Regarding the HA groups ANOVA detected significant differences on factor treatments ($F_{3,28}=3.52$; $p<0.05$) and trials ($F_{1,28}=100.03$; $p<0.0001$) but no interaction between them ($F_{3,28}=1.82$; $p>0.05$). Tukey post-hoc revealed that this difference was mainly due to a trend of PCPA in attenuating the startle response when injected 24 hours before the test. Nonetheless, the aversive learning was preserved (Figure 1, right).

Experiment 2

Taking into account the data obtained in experiment 1, involving the influence of the peripheral effects of PCPA on the expression of unconditioned and conditioned fear, in this part of our study we evaluated the central effects of 5-HT inhibition, following an acute IV administration of PCPA, on the same variables in LA and HA phenotype male rats. FPS was assessed 24 hours after a single IV injection of PCPA (200 μ g, 0.5 μ l) as this delay proved more effective in significantly reducing the startle response.

Statistical analysis

The main differences between LA and HA groups on USR and FPS were compared using a three-way RM ANOVA. Statistical analysis was conducted across groups (LA and

HA) x treatments (PBS x PCPA) x trials (noise/light-noise pairings – the repetition). Post-hoc comparisons were made through Tukey HSD *post-hoc* test for unequal N. The probability of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

ANOVA revealed main differences on factor groups ($F_{1,36}=15.66$; $p<0.0005$) and trials ($F_{1,36}=69.23$; $p<0.0001$). Post-hoc test showed that HA rats presented strong USR and FPS amplitudes, comparing with the LA group, but FPS startle was the only variable affected by treatment (Figure 2).

3. DISCUSSION

Overall, data from our study highlight two main points. First, with regard to the amplitude of the USR, reductions in the global amount of 5-HT induced by a systemic injection of PCPA was not able to change this measure in LA or HA animals, but decrease significantly the amplitude of FPS of LA rats. Second, IV injections of PCPA showed the ability to decrease the FPS (but not the USR) in HA animals, without altering these measures in the LA group. Thus, the amplitude of FPS of LA rats to an auditory stimulus was affected by systemic but not central PCPA injections. Conversely, the central 5-HT inhibition showed greater effectiveness in reducing the FPS amplitude but only in HA animals.

Data from the literature have shown that PCPA, a drug that blocks the synthesis of 5-HT, has none or little influence on the amplitude of unconditioned startle (Fechter, 1974; Sheets, Cook, & Reiter, 1989). When changes are found, however, they seem to emerge from exposure to several test trials, and it appears to be due to drug sensitization (Conner, Stolk, Barchas, & Levine, 1970), or to an attenuation of habituation (Carlton & Advokat, 1973). Thus, regarding the USR of LA and HA rats our data suited partially to these

preliminary findings since no changes were found by previous IP PCPA injections. However, 5-HT depletion disturbs the expression of FPS in LA rats. This effect followed a time dependent fashion, being effective after 24 and 48 hours of PCPA administration. Regarding the HA group depletion of 5-HT showed no influence on the startle despite the drug showed a trend of reducing the USR and FPS amplitude. These results corroborate the previous hypothesis of the influence of 5-HT on fear and anxiety, but deserves attention the differential effects PCPA promoted on LA and HA rats. With respect to this point, data from previous studies highlighted the influence 5-HT lesions have in rat strains displaying low or high endogenous anxiety; anxiogenic effects in low- and anxiolytic effects in high-anxious rats (Mechan et al., 2002; Morley, Gallate, Hunt, Mallet, & McGregor, 2001). To some extent, these data support our predictions of differential effects of 5-HT tonus underlying anxiety-like behavior in laboratory animals. Thus, endogenous anxiety showed by HA rats, which is supposed to be due to increased 5-HT levels they show, is attenuated by systemic injections of PCPA and, as it will demonstrate in rats that received IV of PCPA, part of this effect may be due to its action in the periphery. On the other hand, LA rats, which are supposed to present low 5-HT tonus, have decreased still more their 5-HT levels, perhaps changing their low-anxiety profile to a depressive-like one. As an example, in humans, inductions of sad mood, a characteristic feature of depression, can enhance anxiety but do not change fear-potentiated startle. More specifically, anxiety induced by aversive unpredictable cues, as contextual signs, increases anxiety-induced startle. In contrast, fear induced by predictable aversive stimuli, as tone or light, decreases startle in humans experiencing depressive-like symptoms (Robinson, Overstreet, Letkiewicz, & Grillon, 2012). Generally, in spite of great controversy in this matter, it is well established that general increases in 5-HT tonus facilitates the emergence of an anxiety-like state in mammals (Graeff, Guimaraes, De Andrade, & Deakin, 1996; Graeff, Viana, & Mora,

1997). Taking into account the peripheral administration of PCPA our results are in line with this assumption as the global reduction in the 5-HT release induced by PCPA administered systemically disrupts the FPS in LA. However, one point deserves attention, in the second experiment of our study, in which reduction of 5-HT neurotransmission was obtained through an IV injection of PCPA. Data collected showed that the treatment was not able to change startle in LA animals but significant reduction was obtained in the FPS of HA rats. This could mean that part of the effects observed after systemic PCPA may be due to the reduced levels of 5-HT on the periphery, mainly in LA animals. On the other hand, the anxiolytic-like effect of PCPA when injected right into the third ventricle affected only HA subjects.

It makes sense to be so as it is supposed that HA rats present high levels of fear. With regard to this point, and according to the dual role theory of 5-HT, the expression of fear response can be enhanced by increasing 5-HT neurotransmission in the amygdala, and effect opposed to that observed in the dorsal midbrain (Graeff, 1994, 2004; Graeff, Brandao, Audi, & Schutz, 1986; Schutz, de Aguiar, & Graeff, 1985). It is supposed that high amounts of circulating 5-HT could be responsible for the increased natural anxiety the HA animals showed, as revealed by their higher USR and FPS amplitude. This was possibly in function of exacerbated bottom-up processes that are supposed to underlie anxiety-like responses in HA individuals. Accordingly, in an earlier study using a different approach, Myers and Cicero (Myers & Cicero, 1969) showed that intragastric infusions of PCPA reduces voluntary alcohol intake in pre-stressed high alcohol drinkers without affecting alcohol intake in low drinkers (Ezequiel Leite & Nobre, 2012; Hayton, Mahoney, & Olmstead, 2012).

4. CONCLUSION

Taking into account all of the data obtained here, our study aggregated new information about the influence of 5-HT neurotransmission on the expression of unconditioned and conditioned fear responses in rats that naturally presented different levels of anxiety. Rats previously classified as LA showed significant impairment on the expression of learning fear responses after an IP PCPA injection. On the other hand, HA rats were more affected by central 5-HT repletion. These data indicate that involvement of peripheral 5-HT on the expression of emotional response. This makes sense as, for instance, functional intestinal disorders are frequently co-morbid with depression and anxiety (Gros, Antony, McCabe, & Swinson, 2009) and 5-HT is one of the key neurotransmitters regulating gastrointestinal function (Sanger, 2008). Whether this involvement is linked to anxiety or depression-like behavior is a matter of future investigations.

Financial Support

This research was supported by FAPESP (Proc. No. 2013/10834/6). M. J. Nobre is a researcher from CNPQ. R. Ferreira holds a doctoral scholarship from CNPq (Proc. No. 142608/2010-6).

Figures

Figure1

Figure 2

Figure 3

Legends

Figure 1. The figure depicts the sites of drug injections into the lateral ventricle (LV). Cg1: cingulate cortex - area 1, Cg2: cingulate cortex – area 2, cc: corpus callosum. Adapted from Paxinos & Watson's atlas (2008).

Figure 2. Histograms show the effects of different intervals of systemic (IP) administration of the irreversible 5-HT inhibitor p-chlorophenylalanine (PCPA) on the amplitude (g=grams) of unconditioned (USR) or conditioned (FPS) startle response in low (left) and high anxiety (left) rats. Arrows indicate statistical significance between control groups (PBS) within each variable (USR or FPS). * Main difference between USR x FPS within each group (PBS or PCPA). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analyzes were conducted separately for baseline startle (low x high) and drug effects (PCPA x PBS) using a two-way RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* was made using the Tukey HSD test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

Figure 3. Histograms show the effects of different intervals of IV injections of the irreversible 5-HT inhibitor p-chlorophenylalanine (PCPA) on the amplitude (g=grams) of unconditioned (USR) or conditioned (FPS) startle response in low (left) and high anxiety (left) rats. Independent groups were used. Arrows indicate statistical significance between control groups (PBS) within each variable (USR or FPS). * Main difference between USR x FPS within each group (PBS or PCPA). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analyzes were conducted using a three-way RM with groups (low x high), drug effects (PCPA x PBS) and trials (USR x FPS) as the factors. Trials were the repeated measure. Comparisons *a posteriori* was made using the Tukey HSD test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

References

- Carlton, P. L., & Advokat, C. (1973). Attenuated habituation due to parachlorophenylalanine. *Pharmacol Biochem Behav*, 1(6), 657-663.
- Conner, R. L., Stolk, J. M., Barchas, J. D., & Levine, S. (1970). Parachlorophenylalanine and habituation to repetitive auditory startle stimuli in rats. *Physiol Behav*, 5(11), 1215-1219.
- Deakin, J. F. (1991). Depression and 5HT. *Int Clin Psychopharmacol*, 6 Suppl 3, 23-28; discussion 29-31.
- Delamater, A. R. (2012). On the nature of CS and US representations in Pavlovian learning. *Learning & behavior*, 40(1), 1-23. doi: 10.3758/s13420-011-0036-4
- Etkin, A., & Wager, T. D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *The American journal of psychiatry*, 164(10), 1476-1488. doi: 10.1176/appi.ajp.2007.07030504
- Ezequiel Leite, L., & Nobre, M. J. (2012). The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.009
- Fechter, L. D. (1974). Central serotonin involvement in the elaboration of the startle reaction in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2(2), 161-171.
- Geller, I., & Blum, K. (1970). The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *European journal of pharmacology*, 9(3), 319-324.
- Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27(4), 811-829.
- Graeff, F. G. (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(3), 239-259.
- Graeff, F. G., Brandao, M. L., Audi, E. A., & Schutz, M. T. (1986). Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res*, 22(2), 173-180.
- Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G., & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1), 129-141.
- Graeff, F. G., Viana, M. B., & Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(6), 791-799.
- Gros, D. F., Antony, M. M., McCabe, R. E., & Swinson, R. P. (2009). Frequency and severity of the symptoms of irritable bowel syndrome across the anxiety disorders and depression. *J Anxiety Disord*, 23(2), 290-296. doi: 10.1016/j.janxdis.2008.08.004
- Hashimoto, S., Inoue, T., & Koyama, T. (1999). Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *European journal of pharmacology*, 378(1), 23-30.
- Hayton, S. J., Mahoney, M. K., & Olmstead, M. C. (2012). Behavioral traits predicting alcohol drinking in outbred rats: an investigation of anxiety, novelty seeking, and cognitive flexibility. *Alcohol Clin Exp Res*, 36(4), 594-603. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01668.x
- Henniger, M. S., Ohl, F., Holter, S. M., Weissenbacher, P., Toschi, N., Lorsch, P., . . . Landgraf, R. (2000). Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*, 111(1-2), 153-163.

- Hritcu, L., Clicinschi, M., & Nabeshima, T. (2007). Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology & behavior*, 91(5), 652-657. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.028
- Izquierdo, A., Carlos, K., Ostrander, S., Rodriguez, D., McCall-Craddolph, A., Yagnik, G., & Zhou, F. (2012). Impaired reward learning and intact motivation after serotonin depletion in rats. *Behavioural brain research*, 233(2), 494-499. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.032
- Kawahara, H., Kawahara, Y., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., Tanaka, M. . (1995). Serotonin release in the rat amygdala during exposure to emotional stress. In Elsevier (Ed.), *Serotonin in the central nervous system and periphery* (pp. 89-96). Amsterdam: Elsevier.
- Koe, B. K., & Weissman, A. (1966). p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 154(3), 499-516.
- Krystal, J. H., Webb, E., Grillon, C., Cooney, N., Casal, L., Morgan, C. A., 3rd, . . . Charney, D. S. (1997). Evidence of acoustic startle hyperreflexia in recently detoxified early onset male alcoholics: modulation by yohimbine and m-chlorophenylpiperazine (mCPP). *Psychopharmacology*, 131(3), 207-215.
- Landeira-Fernandez, J. (1996). Context and Pavlovian conditioning. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, 29(2), 149-173.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., & Landgraf, R. (1998). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*, 94(2), 301-310.
- Mechan, A. O., Moran, P. M., Elliott, M., Young, A. J., Joseph, M. H., & Green, R. (2002). A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. *Psychopharmacology (Berl)*, 159(2), 167-175. doi: 10.1007/s002130100900
- Meneses, A., & Liy-Salmeron, G. (2012). Serotonin and emotion, learning and memory. *Rev Neurosci*, 23(5-6), 543-553. doi: 10.1515/revneuro-2012-0060
- Morley, K. C., Gallate, J. E., Hunt, G. E., Mallet, P. E., & McGregor, I. S. (2001). Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol*, 433(1), 91-99.
- Myers, R. D., & Cicero, T. J. (1969). Effects of serotonin depletion on the volitional alcohol intake of rats during a condition of psychological stress. *Psychopharmacologia*, 15(5), 373-381.
- Paxinos, G; Watson, C. (2008). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). New York: Academic Press.
- Plappert, C. F., Pilz, P. K., & Schnitzler, H. U. (1993). Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. *Behavioral neuroscience*, 107(6), 981-987.
- Ray, W. J., Molnar, C., Aikins, D., Yamasaki, A., Newman, M. G., Castonguay, L., & Borkovec, T. D. (2009). Startle response in generalized anxiety disorder. *Depression and anxiety*, 26(2), 147-154. doi: 10.1002/da.20479
- Richter-Levin, G., & Segal, M. (1989). Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. *Brain research*, 477(1-2), 404-407.

- Robichaud, R. C., & Sledge, K. L. (1969). The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life sciences*, 8(17), 965-969.
- Robinson, O. J., Overstreet, C., Letkiewicz, A., & Grillon, C. (2012). Depressed mood enhances anxiety to unpredictable threat. *Psychol Med*, 42(7), 1397-1407. doi: 10.1017/S0033291711002583
- Sanger, G. J. (2008). 5-hydroxytryptamine and the gastrointestinal tract: where next? *Trends Pharmacol Sci*, 29(9), 465-471. doi: 10.1016/j.tips.2008.06.008
- Schutz, M. T., de Aguiar, J. C., & Graeff, F. G. (1985). Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology (Berl)*, 85(3), 340-345.
- Sheets, L. P., Cook, L. L., & Reiter, L. W. (1989). Serotonergic modulation of the acoustic startle response in rats during preweaning development. *Pharmacol Biochem Behav*, 33(2), 415-422.
- Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 169-191. doi: 10.1038/npp.2009.83
- Thornton, E. W., & Goudie, A. J. (1978). Evidence for the role of serotonin in the inhibition of specific motor responses. *Psychopharmacology (Berl)*, 60(1), 73-79.
- Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., & Saito, H. (1995). Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 51(2-3), 515-519.
- Zanoveli, J. M., Carvalho, M. C., Cunha, J. M., & Brandao, M. L. (2009). Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 1294, 106-115.

CONDITIONED FEAR IN LOW- AND HIGH-ANXIOUS RATS IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY CORTICAL SUBCORTICAL AND MIDBRAIN 5-HT_{1A} RECEPTORS

R. FERREIRA^{a,c} AND M. J. NOBRE^{a,b,c,*}

^a Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135 Franca, SP, Brazil

^c Instituto de Neurociências e Comportamento-INeC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Abstract—Interactions between the prelimbic cortex and the basolateral amygdala underlie fear memory processing, mostly through acquiring and consolidating the learning of a conditioned fear. More recently, studies highlighted the role of the dorsal periaqueductal gray (DPAG) in the modulation of learning fear responses. In addition, extensive data in the literature have signaled the importance of serotonin (5-HT) on fear and anxiety. In the present study, the role of 5-HT neurotransmission of the prelimbic cortex, basolateral amygdala or the DPAG on the unconditioned and conditioned fear responses in rats previously selected as low- (LA) or high-anxious (HA) were assessed through local infusions of 5-HT itself (10 nmol/0.2 µl) or the selective 5-HT_{1A} agonist 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT – 0.3 µg/0.2 µl). Behavioral analysis was conducted using the fear-potentiated startle (FPS) procedure. Dependent variables recorded were the latency and amplitude of the unconditioned startle response and FPS. Our findings suggest that, on the prelimbic cortex, 5-HT modulates the expression of conditioned fear response in HA rats and this modulation is dependent on 5-HT_{1A} receptors. This is not true, however, for the basolateral amygdala or the DPAG. In these regions LA but not HA rats were susceptible to the anxiolytic-like effect of 5-HT_{1A} receptor activation. It is thought that the expression of conditioned fear in HA subjects may be dependent on other 5-HT receptors, as the 5-HT_{1B} subtype, and/or changes in other systems such as the GABA and glutamate neurotransmitters. These results increase our understanding of the rostrocaudal influence of 5-HT on the unconditioned and conditioned fear responses in LA and HA subjects and, to some extent, are in

disagreement with the theoretical current that emphasizes the role of 5-HT on anxiety, mainly at the subcortical and midbrain levels. © 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: trait anxiety, prelimbic cortex, basolateral amygdala, periaqueductal gray, serotonin, startle.

INTRODUCTION

The medial prefrontal cortex (mPFC), through its medial (prelimbic) and ventral (infralimbic) subdivisions, is commonly engaged in the conditioned fear paradigm (Lauzon and Laviolette, 2010; Pape and Pare, 2010), a discriminative learning system based on Pavlovian, or classically, aversive conditioning (Delamater, 2012). To date, it has been well established that interactions between the prelimbic cortex and basolateral amygdala underlie fear memory processing, mainly through acquiring and consolidating the learning of the conditioned fear (Stevenson, 2011). In addition, the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) has been involved in the modulation of conditioned fear responses (Lauzon and Laviolette, 2010; Pape and Pare, 2010), particularly in the processing of high levels of fear (Mobbs et al., 2007). The inactivation of DPAG by means of the full GABA_A agonist muscimol blocks a potentiated startle response, induced by exposure to an aversive context (Reimer et al., 2008). Lesions of the dorsal or lateral aspect of the periaqueductal gray have the ability to prevent the fear-potentiated startle (FPS) (Fendt et al., 1996), although such lesions do not have an effect on the unconditioned startle response (reflex response to a loud noise) (Fendt et al., 1994).

Connections between the mPFC and amygdala are known to be critical in regulating anxiety (Akirav and Maroun, 2007), in which serotonin (5-HT) has a fundamental role (Olivier et al., 2013). Increases in extracellular 5-HT were found in the mPFC (Yoshioka et al., 1995; Hashimoto et al., 1999) and amygdala (Kawahara et al., 1995) after contextual fear conditioning. Exposure to conditioned fear stimuli increases 5-HT metabolism in the mPFC; an effect counteracted by the benzodiazepine diazepam (Yoshioka et al., 1995). Furthermore, 5-HT mechanisms exert an inhibitory influence on brain regions belonging

*Correspondence to: M. J. Nobre, Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55-1636023788; fax: +55-1636024830.

E-mail address: mjnes@usp.br (M. J. Nobre).

Abbreviations: 5-HT, serotonin; 8-OH-DPAT, 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin; ANOVA, analysis of variance; CS, conditioned stimulus; DPAG, dorsal periaqueductal gray; FPS, fear-potentiated startle; HA, high-anxious; ISI, inter-stimulus interval; LA, low-anxious; mPFC, medial prefrontal cortex; PBS, phosphate-buffered saline.

to the brain aversive system (Graeff, 1981; Graeff and Zangrossi, 2010), such as the hypothalamus and the DPAG (Moreira et al., 2013).

In subjects who present a pathological anxiety trait, a sustained abnormal state of defensive behavior is maintained, even after the threat signal has disappeared (Etkin and Wager, 2007; Shin and Liberzon, 2010); a pattern of response is also observed in rodents (Liebsch et al., 1998; Henniger et al., 2000; Ezequiel Leite and Nobre, 2012). It is supposed that this innate predisposition to respond may result from changes in 5-HT neurotransmission into the prelimbic cortex, basolateral amygdala and DPAG. This could account for the dissimilarities observed between low- (LA) and high-anxiety (HA) individuals. Importantly, changes in the activity of the brain's 5-HT system have been implicated in a wide range of behavioral disorders, including anxiety. In addition, the 5-HT_{1A} receptor has been reputed as a modulator of anxiety in its normal and pathological forms (Altieri et al., 2013; Popova and Naumenko, 2013).

To our knowledge, studies on the role of 5-HT neurotransmission on the expression of a conditioned fear response in LA or HA subjects are lacking. Thus, in the present study, we aimed to go one step further in understanding how conditioned fear is processed in subjects that were previously phenotypically selected as LA or HA, as defined by the baseline amplitude of the unconditioned startle response. The present study focused on the role of the rostrocaudal regulation of the unconditioned and learned fear response (FPS). We used the pharmacological manipulation of the 5-HT neurotransmission in cortical (prelimbic), subcortical (basolateral nucleus of the amygdala) and midbrain (DPAG) areas, using the 5-HT itself or the full 5-HT_{1A} agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT). Taking into account the widely known function of 5-HT on anxiety we hypothesized that the unconditioned startle response and FPS of HA rats is more susceptible to 5-HT modulation, mainly after basolateral amygdala and DPAG infusions, promoting an anxiolytic-like effect in this group of animals.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Two-hundred and twenty-four male Wistar rats (200 ± 10 g) were obtained from the campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Following arrival, the animals remained undisturbed for 1 week, for acclimatization. They were housed in groups of four in Plexiglas-walled cages (45 × 35 × 15 cm), lined with wood shavings that were changed every 3 days, and maintained in a 12/12-light/dark cycle (lights on at 7 am) at 24 ± 1 °C, with free access to food and water.

Ethical statement

We hereby declare that the experiments received formal approval from the Committee on Animal Research and Ethics of the University of São Paulo (CEUA – process

12.1.144.53.7), and were conducted in compliance with the recommendations of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNEC), which are in accordance with the U.S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Enough animals were used to ensure reliability of the result, and every effort was made to minimize animal suffering.

Startle response apparatus

Potentiated startle analysis was conducted in four sound-attenuating chambers (45 × 48 × 48 cm). Inside each chamber there was a testing cage (16.5 × 7.5 × 7.5 cm) made of Plexiglas, with a floor consisting of six stainless-steel bars spaced every 15 mm, fixed to a stabilimeter by four thumb screws (Insight, São Paulo, Brazil). Inside the stabilimeter, a load-cell captured the pressure on the response platform during startle reaction (Insight, São Paulo, Brazil). Startle stimuli (50-ms burst of white noise) and a continuous background noise (55 dB) were delivered by a loudspeaker located 10 cm behind the testing cage. The startle reaction was recorded within a time window of 200 ms. Animals were conditioned to fear a visual stimulus (light) through consecutive combinations of this stimulus with a foot-shock. For this test, we used an electrical stimulator (scrambler) linked to the 18 stainless steel bars that comprised the floor of the conditioning box (20 × 21 × 23 cm). This apparatus allows the foot-shocks to be delivered during fear-conditioning sessions. Rats were conditioned to light-conditioned stimulus (CS) using four individual conditioning boxes, located inside four small Plexiglas chambers (25 × 35 × 34 cm), whose walls and ceiling were composed of horizontal black and white stripes interspersed (4 cm wide). An opening in the rear wall allowed for presentation of the conditioning stimulus (light). This chamber was located within the sound-attenuating shell described previously.

Selection of LA and HA rats

Rats were allocated to the LA- or HA-like groups according to the data recorded on the second day of matching, as described below. Thus, animals presenting low startle amplitude were allocated to the LA group. In contrast, rats presenting high unconditioned startle response amplitude were allocated to the HA group. This procedure was adapted to this study taking into account that increases in the auditory startle response correlate with innate levels of anxiety in both human and laboratory subjects (Plappert et al., 1993; Krystal et al., 1997; Ray et al., 2009). Animals with an unconditioned startle response below 120 g or above 1200 g were discarded, in order to avoid excessive variability. However, throughout all experiments, only three animals met this criterion.

Startle response: matching

Matching sessions were conducted during two daily sessions of 20 min each. The animals were placed in

the testing cage for a 5-min habituation period and subsequently presented with a series of 30 startle-eliciting noise bursts (10 of each of three intensities, 90, 95, and 105 dB), with a 30-s inter-stimulus interval (ISI). Startle stimuli were presented in a quasi-random order with the restriction that each intensity occurs once within each successive block of three stimuli. The mean startle amplitude across the 30 test trials was used for matching the animals into LA and HA groups.

Surgery

Twenty-four hours after the second matching session the animals were anesthetized with a 0.1-ml ketamine hydrochloride + 0.1 ml xylazine mixture (60/10 mg/kg), and a cannula made from a stainless steel needle (24 gauges, 14-mm length) was implanted into the prelimbic cortex (anterior/posterior: 3.0 mm; medial/lateral: ± 0.5 mm, dorsal/ventral: -1.5 mm), basolateral amygdala (anterior/posterior: -2.4 mm; medial/lateral: ± 5.0 mm, dorsal/ventral: -6.6 mm) or DPAG (anterior/posterior: -6.96 mm; medial/lateral: ± 0.2 mm, dorsal/ventral: -3.0 mm) according to the Paxinos and Watson's Atlas (2008). At the end of surgery, each animal received an intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (120.000 UI, 0.2 ml) followed by an injection of the anti-inflammatory and analgesic drug Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg). The animals were allowed 5 days of post-surgery recovery. Fig. 1 shows a photomicrograph with representative drug injection sites for each of the three regions in the study. Animals that presented problems during or after surgery (death, prosthesis infection, etc.), and those in which the sites of cannulae were out of the boundaries of the region of interest, were removed from the study.

Potentiated startle

Training sessions: fear conditioning. Twenty-four hours after the second matching session, the animals underwent stereotaxic surgery. Five days after surgery, LA and HA animals were submitted to the fear-conditioning procedure. They were conditioned to light-CS, in the apparatus already described, after a 5-min habituation phase. Each rat received 10 pairings of light (CS, 4-s duration, 6 W) with consecutive foot-shock (unconditioned stimuli – US, 1-s duration, 0.6-mA intensity). The ISI varied randomly between 60 and 180 s. Two fear-conditioning exercises were conducted, with a 24-h interval between them. The duration of each training session was approximately 25 min, including the habituation time.

Test sessions: fear-potentiated startle. Twenty-four hours after training, FPS was evaluated. For these sessions, the conditions used during training (stripes) were removed from the sound-attenuating chambers. Sessions were conducted without foot-shock, similarly to the matching sessions. The local modulation of 5-HT neurotransmission on unconditioned and conditioned fear was assessed, in independent groups of rats, 5 min

Fig. 1. Photomicrograph showing the main regions of interest in our study. Arrows point out the sites of drug injections into prelimbic (top), basolateral amygdala (middle) or DPAG (bottom). PrL, prelimbic cortex; fmi, forceps minor; IL, infralimbic cortex; Opt, optical tract; MeA, amygdala - medial nucleus; CeA, amygdala - central nucleus; BLA, amygdala - basolateral nucleus; SC, superior colliculus; DpWh, deep white matter; DMPAG, dorsomedial periaqueductal gray; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; LPAG, lateral periaqueductal gray; Aq, Sylvius aqueduct.

after an intra-prelimbic, basolateral amygdala or DPAG infusion of 5-HT itself or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. Animals were placed into the testing cages and, after an additional 5 min of habituation, were exposed to 60 startle stimuli (20 of each of three intensities, 90, 95, and 105 dB) with a 30 s ISI. Half of the startle stimulus intensity was presented in the absence of the CS (noise-only trials – unconditioned startle response) and

the other half were presented in the presence of the CS (light-noise trials – fear-potentiated startle). In the light-noise trials, rats were exposed to 4 s of light-CS with a consecutive startle stimulus. The noise-only and light-noise trials were performed at random. The duration of the test session, including habituation time, was 37 min. Dependent variables recorded were the latency and the amplitude of startle in both unconditioned startle response and FPS trials.

Drugs, doses and groups

In this study, we used the 5-HT (10 nmol/0.2 μ l, Sigma, St. Louis, MO, USA) and the selective 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (0.3 μ g/0.2 μ l, Sigma, USA). The doses of 5-HT and 8-OH-DPAT were based on the studies of Graeff et al. (1986) and Tomkins et al. (1994). Drugs were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7) shortly before microinjections. PBS was also used as a control solution. Drug effects were evaluated 24 h after the second training session. The waiting time for drug

effects was 5 min for both drugs. Independent groups were used, with each animal receiving only one drug infusion, as follows: Prelimbic LA: PBS ($n = 10$), 5-HT ($n = 10$), 8-OH-DPAT ($n = 10$); Prelimbic HA: PBS ($n = 15$), 5-HT ($n = 15$), 8-OH-DPAT ($n = 15$); Basolateral amygdala LA: PBS ($n = 11$), 5-HT ($n = 11$), 8-OH-DPAT ($n = 11$); Basolateral amygdala HA: PBS ($n = 11$), 5-HT ($n = 10$), 8-OH-DPAT ($n = 11$); DPAG LA: PBS ($n = 13$), 5-HT ($n = 13$), 8-OH-DPAT ($n = 13$); DPAG HA: PBS ($n = 15$), 5-HT ($n = 15$), 8-OH-DPAT ($n = 15$).

Microinjection

A volume of 0.2 μ l of PBS, 5-HT or 8-OH-DPAT was delivered at a rate of 0.1 μ l/min through a 30-gauge stainless steel cannula connected by PE10 tubing to a 5- μ l Hamilton syringe mounted on a syringe pump (Harvard, Holliston, MA, USA). Fig. 2 details the sites of drug injections, according to the Atlas of Paxinos and Watson (2008).

Fig. 2. The figure depicts the sites of drug injections into prelimbic (PrL) (left), basolateral amygdala (BLA) (middle) or the dorsal aspects of periaqueductal gray (PAG) (right). Open circles referred to low anxiety animals and closed circles referred to high anxiety ones. Adapted from Paxinos and Watson's Atlas (2008).

Euthanasia, perfusion and histology

Ten minutes after an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/kg) death was determined by the loss of the righting reflex, spontaneous respiration and lack of response to tail pinch. Then, the animals were perfused intracardially with PBS (pH 7) followed by a solution of paraformaldehyde (4%). After decapitation, the brains were removed, immersed for 3 h in fresh 4% formaldehyde and later transferred to a 30% sucrose solution for cryoprotection. Coronal sections of 60 μ m were cut on a cryomicrotome (Leyca, Nussloch, Germany), mounted on gelatin-coated slides and stained with neutral red (Sigma SL, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using a two-way repeated measures analysis of variance (RM ANOVA). Comparisons were made across treatment $\times$ trials for each region in the study, within each group. A one-way ANOVA was used for the analysis of main differences among groups in the percentage of FPS. Comparisons *a posteriori* were made using the Tukey HSD post hoc test for unequal *N*. The probability of significance was set at $p \leq 0.05$ for all comparisons.

RESULTS

Prelimbic

With regard to the basal differences (PBS effects) between LA and HA groups, ANOVA showed main effects on factor groups ($F_{1,23} = 11.04$; $P < 0.0005$) and trials ($F_{1,23} = 21.87$; $P < 0.0005$), but no interaction between them (Fig. 3). Comparisons *a posteriori* showed that rats increase startle amplitude during light/

noise pairings in both groups. In addition, startle response in HA rats was more pronounced than in LA animals, especially for fear-potentiated startle. Comparisons performed with the data obtained in LA rats showed main interaction between factors ($F_{1,30} = 28.69$; $P < 0.0001$) in the absence of other effects. Regarding the date of HA group ANOVA point out significant differences between groups (LA $\times$ HA: $F_{1,42} = 4.05$; $P < 0.05$), trials ($F_{1,42} = 31.30$; $P < 0.0001$) and also a significant interaction (group $\times$ trials: $F_{1,42} = 9.29$; $P < 0.0005$). Post-hoc analysis showed that 5-HT disrupts the startle potentiation of LA. Regarding the HA animals, both 5-HT and 8-OH-DPAT were able to alter fear-potentiated startle but no changes were observed in unconditioned startle response. Data from a one-way ANOVA point out statistical significance among HA ($F_{2,42} = 13.18$; $P < 0.0001$) but not LA group on the percentage of FPS. This difference was due to the dampening effects of 5-HT and 8-OH on the amplitude of startle.

Basolateral amygdala

Statistical significance was achieved regarding the basal startle response (PBS effects) between LA and HA groups (groups: $F_{1,20} = 22.05$; $P < 0.0005$, trials: $F_{1,20} = 25.98$; $P < 0.0005$). Significant interaction between factors was noted ($F_{1,20} = 22.05$; $P < 0.0005$) (Fig. 4). Tukey post hoc showed that rats increase startle amplitude when facing light/noise pairings in both groups, since this response is more pronounced in HA rats. Regarding the effects of the drugs on the startle response of LA rats, no significant difference was obtained on factor groups or trials. Nonetheless, a significant interaction was noted ($F_{1,30} = 28.69$; $P < 0.0005$). This result was mainly due to the effects of

Fig. 3. Histograms show the effects of prelimbic infusions of 5-HT or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (8-OH) on the amplitude (g = grams) of unconditioned (USR) or conditioned startle response (FPS) in low (LA – left) and high anxiety (HA – right) rats. Insets show the latency for startle. Independent groups were used. Arrows indicate statistical significance between control groups (PBS) within each variable (USR or FPS). *Main difference between USR $\times$ FPS within each group (PBS, 5-HT or 8-OH-DPAT), or among treatments $\times$ control regarding the percentage of FPS. #Main difference between startle trials (USR or FPS) among treatments (PBS $\times$ 5-HT $\times$ 8-OH-DPAT). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were conducted separately for baseline startle (LA $\times$ HA) and drug effects using a two-way RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* were made using the Tukey HSD test for unequal *N*. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

Fig. 4. Histograms show the effects of intra-basolateral amygdala (BLA) infusions of serotonin (5-HT) or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (8-OH) on the amplitude (g = grams) of unconditioned (USR) or conditioned (FPS) startle response in low- (LA – left) and high-anxiety (HA – left) rats. Insets show the latency for startle. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Independent groups were used. Arrows indicate statistical significance between control groups (PBS) within each variable (USR or FPS). *Main difference between USR $\times$ FPS within each group (PBS, 5-HT or 8-OH-DPAT). Statistical analyses were conducted separately for baseline startle (LA $\times$ HA) and drug effects using a two-way RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* were made using the Tukey HSD test for unequal *N*. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

5-HT and 8-OH-DPAT in disturbing the fear-potentiated startle in this group. Regarding the HA animals, similar data were found with significant interaction between factors ($F_{1,29} = 62.29$; $P < 0.0001$). Unlike the data that were collected from LA rats, the drugs were not able to change the unconditioned startle response or fear-potentiated startle. No changes were noted on the percentage of startle.

DPAG

An ANOVA stated that LA and HA groups differ in basal startle response (groups: $F_{1,26} = 18.00$; $P < 0.0005$, trials: $F_{1,26} = 35.46$; $P < 0.0005$), but the factors do not

interact ($P < 0.05$) (Fig. 5). These results reveal basal differences between unconditioned startle response and fear-potentiated startle in LA and HA groups, as shown by Tukey post hoc test. Concerning the drug effects on LA animals, an ANOVA revealed only statistical interactions between factors (group $\times$ trials: $F_{1,36} = 16.30$; $P < 0.0005$). Again, both drugs decreased fear-potentiated startle when injected directly into the DPAG. In HA rats, main interaction was the only change detected by an ANOVA. Once again, drug effects were absent. Finally, a one-way ANOVA showed main differences in the percentage of startle response in the LA animals ($F_{2,36} = 4.21$; $P < 0.05$). HA animals were not affected by the treatments.

Fig. 5. Histograms show the effects of intra-DPAG administration of serotonin (5-HT) or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (8-OH) on the amplitude (g = grams) of unconditioned (USR) or conditioned (FPS) startle response in low (LA – left) and high-anxiety (HA – left) rats. Insets show the latency for startle. Independent groups were used. Arrows indicate statistical significance between control groups (PBS) within each variable (USR or FPS). *Main difference between USR $\times$ FPS within each group (PBS $\times$ 5-HT $\times$ 8-OH-DPAT), or among treatments $\times$ control regarding the percentage of FPS. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were conducted separately for baseline startle (LA $\times$ HA) and drug effects using a two-way RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* were made using the Tukey HSD test for unequal *N*. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

DISCUSSION

The mPFC plays a dual role in fear regulation through its infra- and prelimbic subdivisions. The infralimbic cortex supposedly influences fear inhibition, whereas the prelimbic plays a role in the expression of fear and anxiety (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Sotres-Bayon and Quirk, 2010). In our study, the local infusion of 5-HT in the prelimbic cortex disrupts fear-potentiated startle in LA; an effect not observed after injections of the 5-HT_{1A} receptors agonist 8-OH-DPAT. In contrast, 5-HT and 8-OH-DPAT blocked fear-potentiated startle in HA animals. In both groups the drugs were not able to change the unconditioned startle response. A similar result was obtained in the study by Corcoran and Quirk (2007), who showed that the prelimbic activity is necessary for the expression of learned but not for innate fears, as is the unconditioned startle response. Data obtained from the HA group indicate that the anxiolytic-like effects promoted by local prelimbic infusions of 5-HT were through its action on 5-HT_{1A}-like receptors for which 8-OH-DPAT has more affinity.

It should be noted that, among the 5-HT receptors present in the PFC of primates and rodents, the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} subtypes are by far the most abundant (Martinez et al., 2001; Arango et al., 2002). However, unlike 5-HT_{2A} receptors, which are excitatory in nature, the activation of the 5-HT_{1A} receptors hyperpolarizes the PFC neurons, which could account for the data obtained in our study. The prelimbic cortex facilitates the expression of fear through its excitatory effects on the basolateral and central amygdala nuclei (Sierra-Mercado et al., 2011). Indeed, the amygdala plays a crucial role in learning fear and the mPFC, and the prelimbic sub region in particular, is important in the modulation of amygdala activity (Quirk and Beer, 2006; Sierra-Mercado et al., 2011). This region receives heavy 5-HT innervation from the dorsal and median raphe nuclei and contains several 5-HT receptors, among them the 5-HT_{1A} subtype that, when activated, significantly inhibits the firing rate (Stein et al., 2000; Lowry et al., 2005; Puig et al., 2005). At the prefrontal cortex, both the inhibitory 5-HT_{1A} and the excitatory 5-HT_{2A} receptors are co-localized in glutamatergic neurons (Puig et al., 2003; Amargos-Bosch et al., 2004). The main role of 5-HT_{1A} receptors, which are located in the axon hillock of glutamatergic pyramidal cells in the prelimbic cortex, is to modulate the excitatory drive of 5-HT_{2A} receptors located in the soma and dendrites of these neurons that project into the basolateral amygdala, which in turn activates the medial division of the central nucleus to produce the conditioned fear responses (Puig et al., 2005). Supporting these data, it was shown that mice genetically modified with disrupted 5HT_{2A} function exhibit an anxiolytic-like profile when exposed to a variety of anxiety-like paradigms; a change which is abolished by the cortical 5-HT_{2A} restoration (Weisstaub et al., 2006). Furthermore, blocking 5-HT_{2A} receptors leads to the disruption of the conditioned defeat response in hamsters (Harvey et al., 2012). Thus, the

inhibitory action of 5-HT_{1A} activation on the prelimbic cortex could decrease excitation of basolateral amygdala neurons, leading to consequent decreases in the fear conditioning, as seen here.

Taking into account these previous reports, one would expect that microinjection of 5-HT_{2A} agonists into the mPFC would enhance fear-potentiated startle. However, to our knowledge, no study demonstrated the enhancement of startle response or fear-potentiated startle following mPFC 5-HT_{2A} receptor activation. Nonetheless, it was shown that the 5-HT_{2A} antagonism prevented the enhancement of acoustic startle induced by inescapable stress (Jiang et al., 2014). Other studies showed that these receptors, when activated, induce a negative affective state. For example, the agonism of the 5-HT_{2A} of the mPFC increases the intracellular Ca²⁺ concentration, leading to subsequent neuronal excitation that is commonly associated with retention of fear memory after fear conditioning (Aznar and Klein, 2013). Moreover, disruption of the 5-HT_{2A} mPFC system has been linked to the heightened affective response associated with depression, suicidal behavior, and aggression (Frokjaer et al., 2008).

From the data obtained after drug infusions into the prelimbic cortex, the reason as to why 5-HT modulation affects HA more intensely than LA remains to be explained. With reference to this point, it is recognized that the excessive sustained fear trait presented by HA subjects shares subjacent changes in the normal structure and function of prelimbic neurons in humans and rodents (Quirk and Beer, 2006; Klumpers et al., 2010). Healthy human adults, who score higher on anxiety traits, present decreased PFC volumes (Spampinato et al., 2009), and HA rats had significantly shorter apical dendrites of prelimbic neurons than LA animals (Miller et al., 2012). The study of Mallo et al. (2008) reported higher levels of the 5-HT transporter in the mPFC of rats selected as a function of their low exploratory behavior; a characteristic anxiety-like symptom in rodents (Hendrie et al., 1996). In addition, it was shown that 5-HT_{1A} receptor knockout mice exhibit typical anxiety-like behavior in the elevated plus-maze, in the open field and in conflict tests compared to wild-type controls (Overstreet et al., 2003). These anatomical and physiological differences may help to increase our understanding of the more intense effects of 5-HT modulation in HA rats obtained in our study.

In the second phase of our experiments, we tested the effects of 5-HT and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT when administered directly into the basolateral amygdala. Contrary to the data from the prelimbic cortex, the basolateral amygdala infusions of 5-HT were not able to change the fear-potentiated startle in HA subjects, but were able to in LA subjects. Data recorded from trials with 8-OH-DPAT proved to be similar. Both drugs disrupted fear-potentiated startle without affecting the unconditioned startle response. These data are opposed to the traditional view that 5-HT in the amygdala enhances conditioned fear states. For instance, one study showed that bilateral intra-basolateral amygdala injection of 8-OH-DPAT promotes anxiogenic effects in

the social interaction test (Gonzalez et al., 1996). Additionally, behavioral studies using the microdialysis technique showed the increased 5-HT release in stressed animals (Kawahara et al., 1995), and basolateral amygdala injections of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine increased the contextual conditioned fear response (Martinez et al., 2007). Other studies reported that infusions of 8-OH-DPAT into the basolateral amygdala proved ineffective on the elevated plus-maze (Gonzalez et al., 1996). In contrast, an opposite-like action was found (anxiolytic-like) in the elevated T-maze (Zangrossi et al., 2001). Moreover, injections into the basolateral amygdala of the selective reuptake inhibitor citalopram result in the reduction of the contextual conditioned freezing; an effect observed in rats that were previously foot-shocked (Inoue et al., 2004). In the present study, the 5-HT receptor agonism was effective in blocking the conditioned startle response in rats exhibiting a state-like anxiety, but not in those who showed high levels of anxiety-like behavior. Importantly, exposure to stimuli (contextual) previously paired with foot-shocks has the ability to increase extracellular 5-HT levels in the amygdala (Kawahara et al., 1995) and in the prefrontal cortex (Yoshioka et al., 1995; Hashimoto et al., 1999). This increase could reflect a coping rather than an emotional response to an aversive event. As an example, it was shown that the extracellular concentrations of 5-HT did not increase when rats expressed freezing behavior, but this increase was noted after freezing recovery (Hashimoto et al., 1999). Following this logical sequence, it makes sense that 5-HT facilitation induced by 5-HT_{1A} agonism of basolateral amygdala neurons exerts an anxiolytic-like action, as observed in our report. However, it should be noted that increases in 5-HT_{1B} auto receptor expression in the dorsal raphe of rats were found to decrease conditioned fear, but only in those animals that had not undergone a prior uncontrollable stress procedure (Clark et al., 2004). Assuming that anxious rats are more predisposed to respond to stress and stress-related stimuli (Liebsch et al., 1998; Henniger et al., 2000), the previous result shares some similarities with the present report since, in our study, 5-HT manipulation on amygdala has been shown to be ineffective in changing the learned startle response in HA animals.

The last phase of our experiments was aimed at evaluating the effects of the drugs used when infused locally at the DPAG, a midbrain region mainly involved in the expression of unconditioned fear and anxiety (Brandao et al., 1999, 2005). Overall, intra-DPAG administration of 5-HT or 8-OH-DPAT reduced the amplitude of fear-potentiated startle of LA rats to control levels, but was not able to promote any kind of effect on the fear-potentiated startle of HA animals. Once again, the treatments did not alter the unconditioned startle response.

A vast amount of literature on this subject has implicated the periaqueductal gray on the modulation and expression of several fear-related behaviors (Bandler and Carrive, 1988; Carrive, 1993; Graeff et al.,

1993; De Oca et al., 1998; Brandao et al., 1999), including the modulation/expression of the unconditioned and conditioned fear response. For example, infusions of 5-HT_{1A} agonist DP increased the aversive threshold of electrical stimulation of this region; an effect that was antagonized by the 5-HT_{1A} antagonist WAY (Broiz et al., 2008). Similar results were obtained using the non-selective 5-HT serotonin receptor agonist α -methyl 5-HT or the highly selective antagonist of 5-HT_{2A} receptors ketanserin (Oliveira et al., 2007). The contextual fear-conditioning response also seems to be mediated by 5-HT_{1A} receptors within the DPAG (Aguar et al., 2013). In addition, the acquisition of inhibitory avoidance of rats submitted to the T-maze test was blocked by previous injections of 5-HT or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (de Paula Soares and Zangrossi, 2004). Therefore, our results corroborate the well-known role of 5-HT neurons of the DPAG on the modulation of conditioned fear, in LA rats. Moreover, our data also highlighted the influence of 5-HT_{1A} receptors on the modulation of learning fear in LA rats as 8-OH-DPAT disrupted the fear-potentiated startle. The absence of drug effects on the unconditioned startle response and fear-potentiated startle of HA rats could mean that trait anxiety may be a result of the imbalance in other systems of neurotransmitters, such as GABA and glutamate, at this midbrain level. Supporting this assumption, changes in 5-HT contents in brain regions involved in emotional behaviors, such as the periaqueductal gray and frontal cortex were evaluated in NR2C-2B mice (De Souza Silva et al., 2007). Correlational analysis reveals that mice showing high levels of fear-induced immobility also had high levels of 5-HT in the frontal cortex. The levels of dopamine and acetylcholine in periaqueductal gray were significantly altered, but no significant change on 5-HT concentrations was detected. Nonetheless, the more traditional view accepts that, in the forebrain, 5-HT facilitates fear-related information processing, while on the brainstem, 5-HT has a largely inhibitory function (Graeff and Zangrossi, 2010). It should be noted that the majority of the studies cited in the present report used mixed groups of rats, without differentiating therefore between the animals' anxiety levels. This methodological difference can by itself explain the divergences obtained between our study and other studies.

CONCLUSIONS

Overall, our results showed that 5-HT has differential effects on the learned fear response and these effects are relatively dependent on the innate levels of anxiety of the animals. In the prelimbic cortex, 5-HT modulates the expression of conditioned fear response in HA rats and this modulation was dependent on 5-HT_{1A} receptors. Contrary to our presumptions, however, the same was not true for the basolateral amygdala or the DPAG. In these regions, LA but not HA rats were susceptible to the anxiolytic-like effect of 5-HT_{1A} receptor activation. In addition, no changes were observed in the expression of unconditioned fear response, no matter the region being studied. It is

presumed that the expression of conditioned fear in HA subjects may be dependent on other 5-HT receptors, as the 5-HT_{1B} subtype, and/or changes in other systems such as the GABA and glutamate neurotransmitters. These results provide new information on the rostrocaudal influence of 5-HT on the unconditioned and conditioned fear response in LA and HA subjects and, to some extent, are in disagreement with the theoretical current that emphasizes the role of 5-HT on anxiety, mainly at the subcortical and midbrain levels.

FINANCIAL SUPPORT

This research received financial support from FAPESP (Proc. No. 2010/15157-4) and CNPQ (Proc. No. 479546/2010-0). M.J. Nobre is a researcher from CNPQ. R. Ferreira holds a doctoral scholarship from CNPq (Proc. No. 142608/2010-6).

REFERENCES

- Aguiar DC, Hott SC, Deolindo MV, Guimaraes FS, Resstel LB (2013) The dorsolateral periaqueductal grey *N*-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. *J Psychopharmacol*. <http://dx.doi.org/10.1177/02669881113504012>.
- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast* 2007:30873.
- Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM (2013) Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci* 4:72–83.
- Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14:281–299.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ (2002) Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res* 136:443–453.
- Aznar S, Klein AB (2013) Regulating prefrontal cortex activation: an emerging role for the 5-HT_{2A} serotonin receptor in the modulation of emotion-based actions? *Mol Neurobiol* 48:841–853.
- Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439:95–106.
- Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23:863–875.
- Brandao ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC (2005) GABAergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1299–1311.
- Breiz AC, Oliveira LC, Brandao ML (2008) Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav* 89:76–84.
- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27–47.
- Clark MS, Vincow ES, Sexton TJ, Neumaier JF (2004) Increased expression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus decreases fear-potentiated startle in a stress dependent manner. *Brain Res* 1007:86–97.
- Corcoran KA, Quirk GJ (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci* 27:840–844.
- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998) Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18:3426–3432.
- de Paula Soares V, Zangrossi Jr H (2004) Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull* 64:181–188.
- De Souza Silva MA, Marchetti L, Eisel UL, Huston JP, Dere E (2007) NR2C by NR2B subunit exchange in juvenile mice affects emotionality and 5-HT in the frontal cortex. *Genes Brain Behav* 6:465–472.
- Delamater AR (2012) On the nature of CS and US representations in Pavlovian learning. *Learn Behav* 40:1–23.
- Etkin A, Wager TD (2007) Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* 164:1476–1488.
- Ezequiel Leite L, Nobre MJ (2012) The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience* 28:93–105.
- Fendt M, Koch M, Schnitzler HU (1994) Lesions of the central gray block the sensitization of the acoustic startle response in rats. *Brain Res* 661:163–173.
- Fendt M, Koch M, Schnitzler HU (1996) Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav Brain Res* 74:127–134.
- Frokjaer VG, Mortensen EL, Nielsen FA, Haugbol S, Pinborg LH, Adams KH, Svarer C, Hasselbalch SG, Holm S, Paulson OB, Knudsen GM (2008) Frontolimbic serotonin 2A receptor binding in healthy subjects is associated with personality risk factors for affective disorder. *Biol Psychiatry* 63:569–576.
- Gonzalez LE, Andrews N, File SE (1996) 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res* 732:145–153.
- Graeff FG (1981) Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 14:239–265.
- Graeff FG, Zangrossi Jr H (2010) The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10:207–217.
- Graeff FG, Brandao ML, Audi EA, Schutz MT (1986) Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res* 22:173–180.
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res* 58:123–131.
- Harvey ML, Swallows CL, Cooper MA (2012) A double dissociation in the effects of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors on the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. *Behav Neurosci* 126:530–537.
- Hashimoto S, Inoue T, Koyama T (1999) Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 378:23–30.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15049–15054.
- Hendrie CA, Weiss SM, Eilam D (1996) Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacol Biochem Behav* 54:13–20.
- Henniger MS, Ohl F, Holter SM, Weissenbacher P, Toschi N, Lorsch P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111:153–163.
- Inoue T, Li XB, Abekawa T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T (2004) Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *Eur J Pharmacol* 497:311–316.

- Jiang X, Zhang Z, Zhang S, Gamble EH, Jia M, Ursano RJ, Li H (2014) 5-HT_{2A} receptor antagonism by MDL 11,939 during inescapable stress prevents subsequent exaggeration of acoustic startle response and reduced body weight in rats. *J Psychopharmacol* 25.
- Kawahara H, Kawahara Y, Yoshida M, Yokoo H, Nishi M, Tanaka M (1995) Serotonin release in the rat amygdala during exposure to emotional stress. In: Elsevier, editor. *Serotonin in the central nervous system and periphery*. Amsterdam: Elsevier. p. 89–96.
- Klumpers F, Raemaekers MAHL, Ruigrok ANV, Hermans EJ, Kenemans JL, Baas JMP (2010) Prefrontal mechanisms of fear reduction after threat offset. *Biol Psychiatry* 68:1031–1038.
- Krystal JH, Webb E, Grillon C, Cooney N, Casal L, Morgan 3rd CA, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1997) Evidence of acoustic startle hyperreflexia in recently detoxified early onset male alcoholics: modulation by yohimbine and m-chlorophenylpiperazine (mCPP). *Psychopharmacology* 131:207–215.
- Lauzon NM, Laviolette SR (2010) Dopamine D₄-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: implications for neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res* 208:12–22.
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94:301–310.
- Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A (2005) Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress* 8:233–246.
- Mallo T, Koiv K, Koppel I, Raudkivi K, Uustare A, Rinken A, Timmusk T, Harro J (2008) Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain Res* 1194:110–117.
- Martinez D, Hwang D, Mawlawi O, Slifstein M, Kent J, Simpson N, Parsey RV, Hashimoto T, Huang Y, Shinn A, Van Heertum R, Abi-Dargham A, Caltabiano S, Malizia A, Cowley H, Mann JJ, Laruelle M (2001) Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology* 24:209–229.
- Martinez RC, Ribeiro de Oliveira A, Brandao ML (2007) Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:717–724.
- Miller MM, Morrison JH, McEwen BS (2012) Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. *Behav Brain Res* 229:280–288.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079–1083.
- Moreira FA, Gobira PH, Viana TG, Vicente MA, Zangrossi H, Graeff FG (2013) Modeling panic disorder in rodents. *Cell Tissue Res* 354:119–125.
- Oliveira LC, Broiz AC, de Macedo CE, Landeira-Fernandez J, Brandao ML (2007) 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacology* 191:253–262.
- Olivier JD, Vinkers CH, Olivier B (2013) The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Front Pharmacol* 4:74.
- Overstreet DH, Commissaris RC, De La Garza 2nd R, File SE, Knapp DJ, Seiden LS (2003) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress* 6:101–110.
- Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 90:419–463.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10734–10739.
- Paxinos GW, Watson C (2008) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Plappert CF, Pilz PK, Schnitzler HU (1993) Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. *Behav Neurosci* 107:981–987.
- Popova NK, Naumenko VS (2013) 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev Neurosci* 24:191–204.
- Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003) In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13:870–882.
- Puig MV, Artigas F, Celada P (2005) Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15:1–14.
- Quirk GJ, Beer JS (2006) Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723–727.
- Ray WJ, Molnar C, Aikins D, Yamasaki A, Newman MG, Castonguay L, Borkovec TD (2009) Startle response in generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* 26:147–154.
- Reimer AE, Oliveira AR, Brandao ML (2008) Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. *Brain Res Bull* 76:545–550.
- Shin LM, Liberzon I (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 35:169–191.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529–538.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231–235.
- Spampinato MV, Wood JN, De Simone V, Grafman J (2009) Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21:199–205.
- Stein C, Davidowa H, Albrecht D (2000) 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. *Synapse* 38:328–337.
- Stevenson CW (2011) Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 96:315–323.
- Tomkins DM, Sellers EM, Fletcher PJ (1994) Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. *Neuropharmacology* 33:349–358.
- Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, Gonzalez-Maeso J, Hornung JP, Sibille E, Underwood M, Itohara S, Dauer WT, Ansorge MS, Morelli E, Mann JJ, Toth M, Aghajanian G, Sealfon SC, Hen R, Gingrich JA (2006) Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science* 313:536–540.
- Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Saito H (1995) Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 51:515–519.
- Zangrossi Jr H, Viana MB, Zanoveli J, Bueno C, Nogueira RL, Graeff FG (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 25:637–645.

**The role of the 5-HT system of the prelimbic cortex in mediating the
ovulatory cycle influence on fear behavior in low- and high-anxious
female rats**

Renata Ferreira ^{a,c}, Marcus Lira Brandão ^{a,c}, and Manoel Jorge Nobre ^{a,b,c}

^a Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^b Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135, Franca, SP, Brasil.

^c Instituto de Neurociências e Comportamento-INEC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Corresponding author: M.J. Nobre

Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: 551636023788

Fax: 551636024830

E-mail: mjnes@usp.br

ABSTRACT

In spite of considerable progress has been achieved in the study of fear and fear-memory formation little is known about fear learning in females. This omission has been proved to be surprising as normal and pathological behaviors are highly influenced by ovarian hormones in females, in particular estradiol and progesterone. Activity within the prelimbic cortex (PrL) mediates the expression of conditioned fear, particularly through interactions with the basolateral amygdala, and seems to underlie the learning of the conditioned fear. These connections are known to be critical in regulating anxiety (Akirav and Maroun, 2007) in which serotonin (5-HT) has a fundamental role. In fact, in anxious individuals the innate predisposition to respond may result from changes on 5-HT levels and could underlie the emotional and behavioral differences between low- (LA) and high-anxiety (HA) subjects. In addition, in females, ovarian hormone fluctuations can greatly influence anxiety in humans and anxiety-related behavior in rodents. The present study was conducted in order to determine whether hormonal fluctuation along the estrous cycle would influence the level of anxiety in female rats previously selected as low- (LA) or high-anxious (HA). Furthermore, we conducted an investigation on the role of the 5-HT system of the PrL as a possible modulator of estrous cycle influence on fear using intra-PrL infusions of 5-HT or the full 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in female rats tested in the fear-potentiated startle (FPS) test. For methodological reasons females have their estrous cycle divided in proestrous/estrous phase (Pro-Est) or Diestrous 1/Diestrous 2 phase (Die 1-2) based on the high or low hormonal levels, respectively. Our results highlight the influence of estrous cycle on the conditioned fear response as HA rats showed significant increase of the FPS during the Pro-Est phase, in relation to the Die 1-2 phase. This increase is assumed to be an enhancement in the performance allowed by the reduction in fear promoted by higher levels of progesterone/estradiol and this enhancement showed to be actively and selectively modulated by the 5-HT neurotransmission in the PrL as HA and LA female rats tested on higher or low hormonal phase, respectively showed to be more susceptible to the drug effects.

Keywords: Trait anxiety; Prelimbic cortex; Female rats, Ovarian hormones; Serotonin; Conditioned fear.

1. INTRODUCTION

Fear conditioning is the most widely used behavioral models in the study of the mechanisms underlying the associative memory constitution (Orsini and Maren, 2012). In spite of considerable progress has been achieved in the study of fear and fear-memory formation little is known about fear learning in females. The reason why this happens relies on one main factor: the majority of research in both humans and laboratory animals have not considered gender or hormonal status. This omission has been proved to be surprising as normal and pathological behaviors are highly influenced by hormones in females, in particular estradiol and progesterone. As an example, in rats and monkeys estradiol substantially impacts cell signaling, excitability and morphology of both hippocampal formation (Woolley and McEwen, 1993) and medial prefrontal cortex neurons (Hao et al., 2006, Chen et al., 2009).

The medial prefrontal cortex (mPFC), through its medial (prelimbic - PrL) and ventral (infralimbic - IL) subdivisions, is commonly engaged in conditioned fear (Lauzon and Laviolette, 2010, Pape and Pare, 2010). Activity within the PrL mediates the expression of conditioned fear. In contrast, activity in the infralimbic cortex (IL) is critical for inhibiting conditioned fear after the animals underwent extinction (Sierra-Mercado et al., 2011). Interactions among these regions with the amygdala seems to underlie the process of acquiring and consolidate the learning of the conditioned fear (Stevenson, 2011). These connections are known to be critical in regulating anxiety (Akirav and Maroun, 2007), in which serotonin (5-HT) has a fundamental role (Olivier et al., 2013). In fact, increases in extracellular 5-HT were found in the medial prefrontal cortex (Yoshioka et al., 1995, Hashimoto et al., 1999) and amygdala (Kawahara, 1995) after contextual fear conditioning.

In anxious subjects a sustained abnormal anxiety state is maintained, even after the threat signal has disappeared (Etkin and Wager, 2007, Shin and Liberzon, 2010); a pattern of response commonly observed in rodents (Liebsch et al., 1998, Henniger et al., 2000, Ezequiel Leite and Nobre, 2012). This innate predisposition to be anxious may result from changes on 5-HT neurotransmission and could underlie the emotional and behavioral dissimilarities between low- (LA) and high-anxiety (HA) subjects. Changes in the activity of the brain 5-HT system has been implicated in a wide range of behavioral disorders, including anxiety. In addition, the 5-HT_{1A} receptor has been reputed as a modulator of anxiety in its physiological and adaptative forms (Altieri et al., 2013, Popova and Naumenko, 2013).

Ovarian hormones may contribute to the vulnerability to emotional and humoral disorders. For instance, depression is more common in women than men (Hyde et al., 2008) and women with low estradiol levels seems to be more predisposed to acquire depression (Pearlstein, 1995). In addition, ovarian hormone fluctuations can greatly influence anxiety in humans (Arpels, 1996) and anxiety-related behavior in rodents (Mora et al., 1996, Lund et al., 2005). As shown by neurochemical and electrophysiological studies changes related to estrous cycle seem to involve the functioning of the GABA (Pericic et al., 1986, Mackenzie and Maguire, 2014) and 5-HT brain systems (Williams and Uphouse, 1989), both neurotransmitters actively implicated in the control of anxiety (Griebel and Holmes, 2013).

The present investigation was conducted in order to determine whether fluctuation of ovarian hormones along the estrous cycle would influence the level of anxiety in female rats previously selected as low- (LA) or high-anxious (HA). Furthermore, we investigate the role of the 5-HT system of the PrL as a possible modulator of estrous cycle influence. The pharmacological manipulation of the 5-HT neurotransmission was made by using the

5-HT itself or the full 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. The procedure used for behavior analysis was the fear-potentiated startle test. For methodological reasons females have their estrous cycle divided in proestrou/estrous phase (Pro-Est) or Diestrous 1/Diestrous 2 phase (Die 1-2) regarding the high or low hormonal levels, respectively.

In a recent experiment we showed that the amplitude of FPS follow a non-monotonic function as this response is greatly facilitated in LA but reduced in HA subjects (Ferreira and Nobre, 2014). On the basis of this and other previous reports we predict that HA female rats tested during Pro-Est phase will show less fear. This reduction will be counteracted by low levels of estrogen on HA Die 1-2 group. In this group, it is expected that 5-HT agonism of PrL neurons promotes an anxiolytic-like action.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Animals

One hundred and eighty-three female Wistar rats (200 ± 10 g), obtained from the animal house of the campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Following arrival the animals remained undisturbed for one week, for acclimatization. They were housed in groups of two in standard plastic cages (45 (35 (15cm) with wood chip bedding under a 12 hour light/12 hour dark cycle (lights off at 7 p.m.) at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, with free access to food and water all the time. Experiments were conducted during the light phase.

2.2. Ethical statement

The procedures used in this study received the formal approval of the Committee on Animal Research and Ethics of the University of Sao Paulo (CEUA – process 12.1.144.53.7) and adhered to the recommendations of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNEC), which are in accordance with the U. S. National

Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize pain and suffering.

2.3. Vaginal Cytology

Two days after arriving at the laboratory of Neuropsychopharmacology the animals were assessed for phases of the estrous cycle by vaginal smears. For this, a cotton tipped applicator was dipped in 0.9% physiological saline and inserted into the vaginal canal. The cells collected were placed onto slides and stained with 1% toluidine for estrous phase identification, as follows. Estrus is characterized as dense clusters of non-nucleated blue cornified cells. Diestrus 1 (also known as metestrus) is identified by a combination of leucocytes and few cornified epithelial cells. Diestrus 2 is identified by very sparse leukocyte and nucleated epithelial cell types. Finally, proestrus is evident by its dark purple-stained nucleated epithelial cells. Vaginal cytology at the day of the experiments was conducted immediately after finishing the tests. In order to assess the influence of the estrous cycle on the different phases of the experiment we grouped the four different phases of the cycle in two, namely: the Proestrus/Estrus phase (Pro-Est) and the Diestrus 1/Diestrus 2 phase (Die 1-2). The former characterized by elevated estradiol and progesterone levels. The latter characterized by low estradiol and progesterone levels (Becker et al., 2005).

2.4. Startle response apparatus

Potentiated startle analysis was conducted in four sound-attenuating chambers (45cm deep x 48cm high x 48cm wide). Inside each chamber there was a testing cage (16.5 x 7.5 x 7.5cm) made of Plexiglas, the floor consisting of 6 stainless-steel bars spaced every 15mm among them, fixed to a stabilimeter by four thumb screws (Insight, São Paulo, Brazil). Inside the stabilimeter, a load-cell captured the pressure on the response platform during startle reaction (Insight, São Paulo, Brazil). Startle stimuli (50ms burst of white

noise) and a continuous background noise (55 dB) were delivered by a loudspeaker located 10cm behind the testing cage. The startle reaction was recorded within a time window of 200ms. Animals were conditioned to fear a visual stimulus (light) through consecutive pairings of these stimuli with a foot-shock. For this, we used an electrical stimulator (scrambler) linked to 18 stainless-steel bars that compose the floor of the conditioning box (20cm deep x 21cm high x 23cm wide). This apparatus allows the foot-shocks to be delivered during fear-conditioning sessions. Rats were conditioned to light-CS using four individual conditioning boxes, located inside four small Plexiglas chambers (25cm deep x 35cm high x 34cm wide), whose walls and ceiling were composed of horizontal black and white stripes (4cm wide). An opening in the rear wall allowed the presentation of the conditioned stimulus used (light). This chamber was located, in turn, within the sound-attenuating shell described above.

2.5. Selection of low-anxiety (LA) and high-anxiety (HA) rats

Rats were allocated to the LA- or HA-like groups according to the data recorded on the second day of matching, as described below. Thus, animals presenting low startle amplitude were allocated to the LA group. On the other hand, rats presenting high unconditioned startle amplitude were allocated to the HA group. This procedure was adapted to this study taking into account that increases in the auditory startle response correlate with innate levels of anxiety in both human and laboratory subjects (Plappert et al., 1993, Krystal et al., 1997, Ray et al., 2009). Animals with an amplitude of unconditioned startle response below of 120g or above 1200g was discarded. This was accomplished in order to avoid excessive variability. However, throughout all experiments just three animals met this criterion.

2.6. Startle response: Matching

Matching was conducted along two daily sessions of 20min. The animals were placed in the testing cage for a 5min habituation period and, after that, were presented with a series of 30 startle-eliciting noise bursts (10 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB), with a 30sec inter-stimulus interval (ISI). Startle stimuli were presented in a quasi-random order with the restriction that each intensity occurring once within each successive block of three stimuli. The mean startle amplitude across the 30 test trials was used for matching the animals into LA and HA groups.

2.7. Surgery

Twenty-four hours after the second matching session the animals were anesthetized with a 0.1ml ketamine hydrochloride + 0.1ml xylazine mixture (60/10mg/kg) and a cannula made from a stainless steel needle (24 gauges, 14mm length) was implanted aimed to the prelimbic cortex (anterior/posterior: 3.0mm; medial/lateral: ± 0.5 mm, dorsal/ventral: -1.5 mm) according to the Paxinos and Watson's atlas (2008). At the end of surgery, each animal received an intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (120.000UI, 0.2ml) followed by an injection of the anti-inflammatory and analgesic drug Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg). The animals were allowed five days of post-surgery recovery. **Figure 1** shows a photomicrograph with representative sites of drug injections in the PrL. Animals that presented problems during or after surgery (death, prosthesis infection, cannulae obstruction, etc.), and those in which the sites of cannulae were out of the boundaries of the region of interest, were removed from the study.

2.8. Potentiated Startle

Training sessions: fear conditioning

Twenty-four hours after the second matching session, the animals underwent the stereotaxic surgery. Five days after surgery, LA and HA animals were submitted to the fear-conditioning procedure. They were conditioned to light-CS, in the apparatus already

described, after a habituation-phase of 5min. Each rat received 10 pairings of a light (conditioned stimulus – CS, 4sec of duration, 6W) co-terminating with a foot-shock (unconditioned stimuli – US, 1sec of duration, 0.6 mA of intensity). The ISI varied randomly between 60 and 180sec. Two fear-conditioning trainings were conducted, with a 24 hour interval between them. The duration of each training session was about 25min, including the habituation time.

Test sessions: fear-potentiated startle

Twenty-four hours after training, the fear-potentiated startle was evaluated. For these sessions the contexts used during training (striped context) were removed from the sound-attenuating chambers. Sessions were conducted without foot-shock presentation in the context as the same way as used for matching. The local modulation of 5-HT neurotransmission on unconditioned and conditioned fear was assessed, in independent groups of rats, five minutes after an intra-PrL infusion of 5-HT or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. Animals were placed into the testing cages and, after additional 5min of habituation, they were exposed to 60 startle stimuli (20 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB) with a 30s ISI. Half of the startle stimulus intensity was presented in the absence of the CS (noise-alone trials - unconditioned startle response) and the other half were presented in the presence of the CS (light-noise trials - fear-potentiated startle). In the light-noise trials, rats were exposed to a 4sec presentation of light-CS, co-terminating with the startle stimulus. The noise-alone and light-noise trials were intermingled at random. The duration of the test session, including habituation time, was 37min. Dependent variables recorded were the latency and the amplitude of startle in both unconditioned startle response and fear-potentiated startle trials.

2.9. Drugs, doses and groups

In this study, we used the 5-HT (10nmol/0.2µl, Sigma - USA) and the selective 5-HT_{1A} agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT – 0.3µg/0.2µl, Sigma - USA). The doses of 5-HT and 8-OH-DPAT were based on the studies of Graeff et al., (1986) and Tomkins et al., (1994). Drugs were diluted in phosphate-buffer saline (PBS - pH 7.0) shortly before microinjections. PBS was also used as a control solution. Drug effects were evaluated 24 hours after the second training session. The waiting time for drug effects was 5min for both drugs. Independent groups were used with each animal received only one drug infusion, as follows: LA/PBS/Pro-Est (n=18), LA/5-HT/Pro-Est (n=18), LA/8-OH/Pro-Est (n=18), HA/PBS/Pro-Est (n=14), HA/5-HT/Pro-Est (n=13), HA/8-OH/Pro-Est (n=14), LA/PBS/Die 1-2 (n=14), LA/5-HT/Die 1-2 (n=14), LA/8-OH/Die 1-2 (n=15), HA/PBS/Die 1-2 (n=15), HA/5-HT/Die 1-2 (n=15) and HA/8-OH/Die 1-2 (n=15).

2.10. Microinjection

A volume of 0.2µl of PBS, 5-HT or 8-OH-DPAT was delivered at a rate of 0.1µl/min through a 30-gauge stainless steel cannula connected by PE10 tubing to a 5.0µl Hamilton syringe mounted on a syringe pump (Harvard, USA).

2.11. Euthanasia, perfusion and histology

Ten minutes after an overdose of sodium pentobarbital (60mg/kg) death was determined by the loss of the righting reflex, spontaneous respiration and lack of response to tail pinch. Then, the animals were perfused intracardially with phosphate-buffer saline (pH 7.0) followed by a solution of paraformaldehyde (4%). After decapitation, the brains were removed, immersed for 3 hours in fresh 4% formaldehyde and later transferred to a 30% sucrose solution for cryoprotection. Coronal sections of 60µm were cut on a freezing microtome (Leyca, Nussloch, Germany), mounted on gelatin-coated slides, and stained with neutral red (Sigma, SL, USA).

2.12. Statistical analysis

First comparisons aimed to evaluate the influence of hormonal factors on startle and FPS. To this end, a mixed analysis of variance, with two “between” variables (anxiety levels: LA x HA and estrous cycle: Pro-Est x Die 1-2) and one “within” variable (condition: noise alone x light/noise) and post-hoc Newman-Keuls tests were carried out for the following measures: latency for startle, the amplitude of startle response to noise alone and light/noise pairings and the percentage of startle response. The percentage of startle was calculated using the following formula: $(\text{light/noise} \times 100) / \text{noise alone} - 100$. The second level of analysis aimed to evaluate the drug effects on the dependent variables already described. For this purpose, we used a multifactorial repeated measures ANOVA with the anxiety levels (LA x HA), drugs (PBS x 5-HT x 8-OH) and estrous cycle (Pro-Est x Die 1-2) as the main “between” variables, and trials (noise alone x light/noise trials) as the “within” variable. Comparisons *a posteriori* were made using the Newman-Keuls post-hoc test. The probability of significance was set at $p \leq 0.05$ for all comparisons.

3. RESULTS

Our first goal was to assess the influence of the estrous cycle on the startle response and FPS of rats belonging to one of the two groups named the Pro-Est and the Die 1-2 group. This was accomplished by comparing the data obtained after PBS infusion in both groups.

The amplitude of startle response was greatly affected in function of hormonal phase (**Figura 2**). ANOVA revealed significant differences in anxiety levels ($F_{1,57}=26.07$; $p<0.0001$). The factor trials was also affected ($F_{1,57}=175.04$; $p<0.0001$) and interaction between anxiety level x trials ($F_{1,57}=14.94$; $p<0.0005$) and anxiety level x trials x hormonal phase was detected ($F_{1,57}=11.57$; $p<0.005$). Regarding the FPS amplitude only a

significant interaction between factors was detected by ANOVA ($F_{1,57}=24.78$; $p<0.0001$). No changes were observed between groups in the variable latency of startle. Post-hoc analysis showed the trivial effects of anxiety and conditioning on gross startle response, in spite of no changes induced by the hormonal variable. Nonetheless, the FPS amplitude, a variable that best describes the establishment of a conditioned fear, was greatly influenced by the estrous cycle, since the Pro-Est and Die 1-2 groups showed an inverse profile.

Drug effects were analyzed, as previously described, separately in Pro-Est and Die groups (Figure 3, top and bottom, respectively). In the former case, ANOVA detected the effects of the treatments on all variables (anxiety levels: $F_{1,89}=87.54$; $p<0.0001$; drugs: $F_{1,89}=5.61$; $p<0.005$; trials: $F_{1,89}=125.17$; $p<0.0001$). Anxiety was a factor that significantly influenced both trials ($F_{1,89}=39.16$; $p<0.0001$) and drug effects ($F_{2,89}=13.50$; $p<0.0001$). Data from latency showed that the groups differed regarding anxiety levels ($F_{1,89}=21.08$; $p<0.0001$). The ANOVA showed that the FPS amplitude was significantly affected by anxiety levels ($F_{1,89}=7.24$; $p<0.005$) and drug effects ($F_{2,89}=9.10$; $p<0.0005$). Post-hoc Newman-Keuls showed that LA anxiety rats were more affected by drug effects have reduced amplitude of conditioned startle response (startle during light/noise trials). In relation to the FPS, 5-HT and 8-OH-DPAT were efficient in reducing the FPS amplitude, being 8-OH-DPAT more effective than 5-HT.

Regarding the startle response of Die 1-2 groups, ANOVA showed statistical significant effects on factors anxiety levels ($F_{1,82}=21.66$; $p<0.0001$) and trials ($F_{1,82}=74.87$; $p<0.0001$). Significant interaction between drugs x trials was obtained ($F_{2,82}=10.35$; $p<0.0001$). The latency of startle and FPS amplitude were both affected by drug treatments ($F_{2,82}=5.17$; $p<0.005$ and $F_{2,82}=11.07$; $p<0.0001$, respectively) but no additional changes have been noted. Overall, post-hoc test revealed that the effects of the drugs were on the LA groups, only.

4. DISCUSSION

The first part of our study was directed to analyze the influence of ovarian hormones on the latency and amplitude of startle response and FPS in female rats. This goal was achieved by previously sorting out our experimental subjects on the basis of their high (Pro-Est) or low (Die 1-2) estradiol/progesterone levels. In our study, the possible influence of estrous cycle on the conditioned fear response can be detected by the opposite effects on startle of female rats tested on high or low hormonal levels. High-anxious rats showed an increase in the amplitude of FPS when tested during the Pro-Est phase, contrasting with their low amplitude of startle noted on the Die phase. This enhance on startle is assumed to be not an increase, but a decrease in fear levels in this group, taking into account the non-monotonic effects of fear on startle response, in other words, an increase in the performance of female rats on startle, allowed by the reduction in fear promoted by higher levels of progesterone/estradiol.

Older studies have suggested that high fear levels interfere with FPS in such a way that moderate fear, as those showed by LA rats in our study, may maximize FPS whereas the higher levels of fear response of HA rats switch the behavior of these animals to a different mode of defensive strategy that does not include FPS as a component behavior (Davis and Astrachan, 1978, Walker and Davis, 1997). This proposition, initially postulated by data collected from male rats and taken as a change in performance rather than a failure of learning, fits to our results as HA Die 1-2 females have reduced amplitude of fear, comparing with the LA Die 1-2 group. The data obtained from the rats belonging to the Pro-Est group reaffirm the importance of ovarian hormones in maintaining the adaptative emotional balance. In fact, changes in the level of these hormones, commonly occurring over estrous cycle have been implicated in triggering affective and emotional

disorders (Campbell and Whitehead, 1977, Arpels, 1996). As an example, the main target of progesterone metabolite allopregnanolone is the GABA_A receptor where it shown an anticonvulsant, sedative, analgesic, anesthetic and anxiolytic action (Belelli et al., 2009, Lambert et al., 2009). In addition, the 5-HT neural system, which is linked to a variety of psychopathological processes including anxiety and depression, is modulated throughout life by ovarian hormones (Krajnak et al., 2003).

Gender differences are frequently seen in a variety of psychiatric conditions including depression and anxiety disorders (Simonds and Whiffen, 2003). Regarding the latter, panic disorder, post-traumatic stress disorder and generalized anxiety disorder occur three times more frequently in women than in men (Yonkers, 1996). This difference it is supposed to rely on the ability of gonadal hormones and estrous cycle to modulate anxiety responses (Zimmerberg and Farley, 1993, Arpels, 1996, Mora et al., 1996). In our study, it is supposed that ovarian hormones influence conditioned fear in a very different manner and this influence is dependent from the previous disposition of animal to behave. HA female rats showed elevated startle response during the Pro-Est. We assume that, for this group, increases in the startle amplitude denounces a reduction in fear, bringing back the animal from the panic-like state that the HA animals exhibit, an emotional state for which the startle response is incompatible. On the other hand, the decreases in startle showed by LA rats during the Pro-Est phase reflects an attenuation of the normal levels of anxiety these animal are supposed to be, an effect occurring on the left-side of the non-monotonic inverted-U curve. In this context, in the field of human emotions, several theorists have proposed the idea that primitive reflexes, as the startle response is, are the basis for emotion's physiological mobilization and action (Lang and Bradley, 2010). Older reports from animal studies showed that changes in stressor intensity, duration and recurrence result in dampened defensive responses (Chalmers et al., 1974, Davis and Astrachan, 1978)

and a recent clinical study showed a similar pattern with attenuated fear potentiation concomitant with enduring broad negative affectivity (McTeague and Lang, 2012).

In subjects suffering from anxiety disorders an overall arousal state is held and this state is maintained even after the aversive signal has disappeared (Etkin and Wager, 2007, Shin and Liberzon, 2010). This sustained anxiety state, commonly observed in rodents (Liebsch et al., 1998, Henniger et al., 2000, Ezequiel Leite and Nobre, 2012), results from a homeostatic unbalance in several systems of neurotransmitters. We supposed *a priori* that the 5-HT system could be one of them, arguing that changes of 5-HT neurotransmission could underlie the emotional and behavioral dissimilarities commonly noted between LA and HA subjects. This is assumed to be on the basis that changes in the activity of the brain 5-HT has been implicated in a wide range of pathological forms of anxiety, especially through the 5-HT_{1A} receptor (Altieri et al., 2013, Popova and Naumenko, 2013). The second phase of our study address the effects of pharmacological manipulation of 5-HT system of the PrL on amplitude of startle response of female rats tested during lower or higher hormonal levels. Statistical analysis were accomplished independently for each cycle (Pro-Est or Die 1-2). Overall, the agonism of 5-HT receptors of the PrL leads to an attenuation of the amplitude of FPS of HA female rats but no changes on the FPS of LA female. Contrary, this effects was consistently observed in LA female rats during the Die 1-2 phase, but not in the HA group.

Previous studies have highlighted the role of the mPFC plays in fear regulation. Specifically, its IL subdivision is supposed to influence fear inhibition, whereas the PrL plays a role in the expression of fear and anxiety (Heisler et al., 1998, Parks et al., 1998, Sotres-Bayon and Quirk, 2010). Corroborating with a previous study of our group (Ferreira and Nobre, 2014), the local infusion of 5-HT in the PrL dampened FPS in LA female rats tested on the low hormonal period (Die 1-2), and this effect seems to be mediated by the

1a-type receptor as revealed by the effects of 8-OH-DPAT. On the other hand, 5-HT and 8-OH-DPAT blocked the FPS in HA animals but this effects was dependent of the estrous cycle since it was observed only in the rats tested during the Pro-Est phase. Changes in fear levels induced by the treatments were absent in both LA Pro-Est and HA Die 1-2 groups.

5-HT is an ubiquitous neurotransmitter produced and released by a neuronal system arising mainly from the mesencephalic raphe nuclei, being modulated throughout life by ovarian hormones (Krajnak et al., 2003, Lowry et al., 2008). The action of oestrogens on the central nervous system during development leads to sexual differentiation of 5-HT system, resulting in different density of 5-HT innervation in males and females (Gonzalez and Leret, 1992, Reznikov and Nosenko, 1996). Besides, neuronal 5-HT is highly influenced by changes in the estrogen and progesterone commonly occurring along the estrous cycle during adult hood (Maswood et al., 1995, Maswood et al., 1999). These ovarian hormones are reported to maintain the health and viability of 5-HT neurons (Bethea et al., 2002), and health and viability of 5-HT are necessary conditions for preserving emotional and affective integrity (Graeff et al., 1996).

In humans and rodents it is well recognized that HA subjects, in which a excessive sustained fear trait is prevalent, present subjacent changes in the normal structure and function of PrL neurons (Quirk and Beer, 2006, Klumpers et al., 2010). Healthy human adults, who score higher on anxiety traits present decreased PFC volumes (Spampinato et al., 2009), and HA rats had significantly shorter apical dendrites of PrL neurons than LA animals (Miller et al., 2012). The study of Mällo et al. (2008) reported higher levels of the 5-HT transporter in the mPFC of rats selected in function of their low exploratory behavior, a characteristic anxiety-like symptom in rodents (Hendrie et al., 1996). In addition, it was shown that 5-HT_{1A} receptor knockout mice exhibit typical anxiety-like behavior in the elevated plus-maze, in the open field and in conflict tests compared to wild-

type controls (Overstreet et al., 2003). These anatomical and physiological differences may help to understand the more intense effects of 5-HT modulation in HA rats obtained in our study.

In women during menopause and in ovariectomized rats increases on the anxiety-like behavior is a phenomenon commonly reported (Walf and Frye, 2009), an effect counteracted by estrogen replacement therapy (Sherwin, 1998) or by administration of a single dose of estradiol (Diaz-Veliz et al., 1991), respectively. In our study LA anxious rats tested on Die 1-2, which we assume to be an hormonal condition similar to ovariectomized animals, showed more susceptible to the effects of 5-HT and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT and this is supposed to be an anxiolytic effect. Data from a recent study are in line with our presumption as chronic fluoxetine administration reduce fear responses of female rats underwent low estrogen levels (Lebron-Milad et al., 2013). Drug influence were absent on HA Die 1-2 rats probably in function of floor effects. HA female rats tested on the Pro-Est phase showed more susceptible to the effects of 5-HT modulation as demonstrated by decreases in the amplitude of FPS after PrL infusions of 5-HT itself or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. In ovariectomized rats treated with estradiol or progesterone, or its combination, fluvoxamine, a 5-HT reuptake inhibitor, have reduced its ability to induce an antidepressant-like effect, which is consistent with these hormones blocking fluvoxamine capability to slower 5-HT clearance (Benmansour et al., 2012). In our study, we propose a similar mechanism operating resulting in decreases in the FPS amplitude, and this decrease is supposed to reflect an anxiogenic-like effect. However, the question how ovarian hormones and 5-HT differentially interact to modulate conditioned fear in female rats still remains unclear. Some studies highlight that the influence of gonadal hormones on the expression of fear is dependent of the behavioral paradigm used suggesting that these hormones may modulate the formation and/or expression of fear memories (Lebron-Milad

and Milad, 2012). Interestingly, estrogen normally regulates the expression of 5-HT_{1A} receptors and 5-HT turnover in the fear circuitry, including amygdala, hippocampus and prefrontal cortex (Amin et al., 2005). Based on these results, it is concluded that 5-HT mediates fear and anxiety mainly in the LA rats in the DiE 1-2 phase. The 5-HT also mediates fear in HA rats tested during the Pro-Est phase. This makes sense when we look at the premenstrual syndrome in women, in which hormonal levels are low and SSRI drugs have been shown to be ineffective in this condition.

Financial Support

This research received financial support from FAPESP (Proc. no. 2013/10834-6). M. J. Nobre is a researcher from CNPQ. R. Ferreira holds a doctoral scholarship from CNPq (Proc. no. 142608/2010-6).

Figures

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Legends

Figure 1. Photomicrograph showing the region of interest. Arrows point out the sites of drug injections. PrL: prelimbic cortex; fmi: forceps minor; IL: infralimbic cortex; Opt: optical tract.

Figure 2. Columns represent the effects of hormonal cycles (Pro-Est x Die) on the latency (A), on the amplitude of unconditioned (noise) or conditioned startle response (light/noise) (B), and on the fear-potentiated startle - FPS (C). Regarding the gross startle amplitude, * main difference between trials within each group (LA-Pro-Est, LA-Die, HA-Pro-Est, HA-Die) and # main difference between groups, in the same trial (Noise or light/noise). Regarding the FPS, * main differences between groups (Pro-Est x Die) in the same anxiety level (LA or HA), and # main differences between anxiety levels in the same hormonal phase. Statistical analyzes were conducted using a two-way RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* was made using the Newman-Keuls test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

Figure 3. Columns represent the effects of 5-HT and 8-OH on the latency (A,D), startle response (B,E) and FPS (C,F) of rats previously divided as LA or HA. Above is showed the data of female rats of the Pro-Est group. Below is showed the data collected from the female rats. Regarding the latency of startle and the amplitude of startle response * is related to the main difference between trials within each group (LA-PBS, 5-HT or 8-OH, HA-PBS, 5-HT or 8-OH. # Is related to the main difference between groups, in the same trial (noise or light/noise). + Significant difference between drug and control groups, in the same trial, and in the same anxiety level (LA or HA). Regarding the FPS, * main differences between drugs and control group in the same anxiety level (LA or HA). + Main differences between anxiety levels in the same drug treatment. Statistical analyzes were conducted using a multifactorial RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* was made using the Newman-Keuls test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

References

- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural plasticity* 2007:30873.
- Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM (2013) Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS chemical neuroscience* 4:72-83.
- Amin Z, Canli T, Epperson CN (2005) Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews* 4:43-58.
- Arpels JC (1996) The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. *The Journal of reproductive medicine* 41:633-639.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E (2005) Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 146:1650-1673.
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic GABA_A receptors: form, pharmacology, and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12757-12763.
- Benmansour S, Weaver RS, Barton AK, Adeniji OS, Frazer A (2012) Comparison of the effects of estradiol and progesterone on serotonergic function. *Biological psychiatry* 71:633-641.
- Bethea CL, Lu NZ, Gundlach C, Streicher JM (2002) Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Frontiers in neuroendocrinology* 23:41-100.
- Campbell S, Whitehead M (1977) Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clinics in obstetrics and gynaecology* 4:31-47.
- Chalmers DV, Hohf JC, Levine S (1974) The effects of prior aversive stimulation on the behavioral and physiological responses to intense acoustic stimuli in the rat. *Physiology & behavior* 12:711-717.
- Chen JR, Yan YT, Wang TJ, Chen LJ, Wang YJ, Tseng GF (2009) Gonadal hormones modulate the dendritic spine densities of primary cortical pyramidal neurons in adult female rat. *Cereb Cortex* 19:2719-2727.
- Davis M, Astrachan DI (1978) Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 4:95-103.
- Diaz-Veliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S (1991) Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiology & behavior* 50:61-65.
- Etkin A, Wager TD (2007) Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *The American journal of psychiatry* 164:1476-1488.
- Ezequiel Leite L, Nobre MJ (2012) The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*.
- Ferreira R, Nobre MJ (2014) Conditioned fear in low- and high-anxious rats is differentially regulated by cortical subcortical and midbrain 5-HT_{1A} receptors. *Neuroscience* 268:159-168.

- Gonzalez MI, Leret ML (1992) Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 41:329-332.
- Graeff FG, Brandao ML, Audi EA, Schutz MT (1986) Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behavioural brain research* 22:173-180.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54:129-141.
- Griebel G, Holmes A (2013) 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 12:667-687.
- Hao J, Rapp PR, Leffler AE, Leffler SR, Janssen WG, Lou W, McKay H, Roberts JA, Wearne SL, Hof PR, Morrison JH (2006) Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2571-2578.
- Hashimoto S, Inoue T, Koyama T (1999) Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *European journal of pharmacology* 378:23-30.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15049-15054.
- Hendrie CA, Weiss SM, Eilam D (1996) Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54:13-20.
- Henniger MS, Ohl F, Holter SM, Weissenbacher P, Toschi N, Lorsch P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behavioural brain research* 111:153-163.
- Hyde JS, Mezulis AH, Abramson LY (2008) The ABCs of depression: integrating affective, biological, and cognitive models to explain the emergence of the gender difference in depression. *Psychological review* 115:291-313.
- Kawahara H, Kawahara, Y., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., Tanaka, M. (1995) Serotonin release in the rat amygdala during exposure to emotional stress. In: *Serotonin in the central nervous system and periphery*(Elsevier, ed), pp 89-96 Amsterdam: Elsevier.
- Klumpers F, Raemaekers MAHL, Ruigrok ANV, Hermans EJ, Kenemans JL, Baas JMP (2010) Prefrontal Mechanisms of Fear Reduction After Threat Offset. *Biological psychiatry* 68:1031-1038.
- Krajnak K, Rosewell KL, Duncan MJ, Wise PM (2003) Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. *Brain research* 990:87-94.
- Krystal JH, Webb E, Grillon C, Cooney N, Casal L, Morgan CA, 3rd, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1997) Evidence of acoustic startle hyperreflexia in recently detoxified early onset male alcoholics: modulation by yohimbine and m-chlorophenylpiperazine (mCPP). *Psychopharmacology* 131:207-215.
- Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RD, Weir CJ, Belelli D (2009) Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S48-58.

- Lang PJ, Bradley MM (2010) Emotion and the motivational brain. *Biological psychology* 84:437-450.
- Lauzon NM, Laviolette SR (2010) Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: Implications for neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research* 208:12-22.
- Lebron-Milad K, Milad MR (2012) Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of mood & anxiety disorders* 2:3.
- Lebron-Milad K, Tsareva A, Ahmed N, Milad MR (2013) Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction. *Behavioural brain research* 253:217-222.
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural brain research* 94:301-310.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148:86-94.
- Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ (2005) Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146:797-807.
- Mackenzie G, Maguire J (2014) The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABA receptors in affective disorders. *Psychopharmacology*.
- Mallo T, Koiv K, Koppel I, Raudkivi K, Uustare A, Rinken A, Timmusk T, Harro J (2008) Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain research* 1194:110-117.
- Maswood S, Stewart G, Uphouse L (1995) Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, on hypothalamic serotonin. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 51:807-813.
- Maswood S, Truitt W, Hotema M, Caldarola-Pastuszka M, Uphouse L (1999) Estrous cycle modulation of extracellular serotonin in mediobasal hypothalamus: role of the serotonin transporter and terminal autoreceptors. *Brain research* 831:146-154.
- McTeague LM, Lang PJ (2012) The anxiety spectrum and the reflex physiology of defense: from circumscribed fear to broad distress. *Depression and anxiety* 29:264-281.
- Miller MM, Morrison JH, McEwen BS (2012) Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. *Behavioural brain research* 229:280-288.
- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:609-620.
- Olivier JD, Vinkers CH, Olivier B (2013) The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Frontiers in pharmacology* 4:74.
- Orsini CA, Maren S (2012) Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36:1773-1802.
- Overstreet DH, Commissaris RC, De La Garza R, 2nd, File SE, Knapp DJ, Seiden LS (2003) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress* 6:101-110.

- Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological reviews* 90:419-463.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10734-10739.
- Paxinos GW, C. (2008) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Pearlstein TB (1995) Hormones and depression: what are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? *American journal of obstetrics and gynecology* 173:646-653.
- Pericic D, Manev H, Geber J (1986) Sex related differences in the response of mice, rats and cats to administration of picrotoxin. *Life sciences* 38:905-913.
- Plappert CF, Pilz PK, Schnitzler HU (1993) Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. *Behavioral neuroscience* 107:981-987.
- Popova NK, Naumenko VS (2013) 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Reviews in the neurosciences* 24:191-204.
- Quirk GJ, Beer JS (2006) Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723-727.
- Ray WJ, Molnar C, Aikins D, Yamasaki A, Newman MG, Castonguay L, Borkovec TD (2009) Startle response in generalized anxiety disorder. *Depression and anxiety* 26:147-154.
- Reznikov AG, Nosenko ND (1996) Early postnatal changes in sexual dimorphism of catecholamine and indoleamine content in the brain of prenatally stressed rats. *Neuroscience* 70:547-551.
- Sherwin BB (1998) Estrogen and cognitive functioning in women. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:17-22.
- Shin LM, Liberzon I (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35:169-191.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*.
- Simonds VM, Whiffen VE (2003) Are gender differences in depression explained by gender differences in co-morbid anxiety? *Journal of affective disorders* 77:197-202.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current opinion in neurobiology* 20:231-235.
- Spampinato MV, Wood JN, De Simone V, Grafman J (2009) Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 21:199-205.
- Stevenson CW (2011) Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. *Neurobiology of learning and memory* 96:315-323.
- Tomkins DM, Sellers EM, Fletcher PJ (1994) Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. *Neuropharmacology* 33:349-358.
- Walf AA, Frye CA (2009) Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gender medicine* 6:300-311.

- Walker DL, Davis M (1997) Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behavioral neuroscience* 111:692-702.
- Williams J, Uphouse L (1989) Serotonin binding sites during proestrus and following estradiol treatment. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 33:615-620.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology* 336:293-306.
- Yonkers KA, Ellison, J. M. (1996) Anxiety disorders in women and their pharmacological treatment. In: *Psychopharmacology and women: sex, gender and hormones*(Jensvold, M. F., Halbreich, U., Hamilton, J. A., ed), pp 43-71 Washington D. C.: American Psychiatric Press.
- Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Saito H (1995) Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 51:515-519.
- Zimmerberg B, Farley MJ (1993) Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiology & behavior* 54:1119-1124.

**The role of 5-HT system of the dorsal periaqueductal gray and
basolateral amygdala in mediating the ovulatory cycle influence on
conditioned fear in low and high anxious-like female rats**

Renata Ferreira ^{a,c}, Marcus Lira Brandão ^{a,c}, and Manoel Jorge Nobre ^{a,b,c}

^a Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^b Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135, Franca, SP, Brasil.

^c Instituto de Neurociências e Comportamento-INEC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Corresponding author: M.J. Nobre

Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: 551636023788

Fax: 551636024830

E-mail: mjnes@usp.br

ABSTRACT

The non-adaptative response to psychological stress, a prevalent condition and a major health hazard most commonly verified in women than in men, is supposed to occurring as a result of the production of female sex hormones during the menstrual or estrous cycle in women and laboratory animals, respectively. Changes on mood, aggressive behavior and altered responses triggered by minor stressfull situations are the most prevalent symptoms. In spite of considerable progress has been achieved in the study of fear and fear-memory formation, little is known about fear learning and fear expression in females. The reason for the discrepancy between genders relies on one main factor: the majority of research in both, humans and laboratory animals, have not considered hormonal status. Interactions between the medial prefrontal cortex (mPFC) and amygdala (AM) underlie the conditioned fear memory processing. However, the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) has also been involved in the modulation of conditioned fear responses, particularly in the processing of high levels of fear. Importantly, as the GABAergic system, 5-HT mechanisms also plays an inhibitory influence on brain regions belonging to the brain aversive system such as the DPAG. This is important to note as clinical anxious subjects present a sustained abnormal and increased anxiety/fear state a pattern of response commonly observed in rodents. Ovarian hormone fluctuations can greatly influence anxiety in humans and anxiety-related behavior in rodents. Changes related to estrous cycle also seems to involve the functioning of the GABA and 5-HT brain systems. The current study aims to further explore how natural hormonal variations affect the expression of conditioned fear in female rats that were previously selected by its anxiety-like phenotype - low- (LA) or high-anxious (HA) and the the influence of 5-HT on the modulatory effects of ovarian hormones on fear response, as measured by the fear potentiated startle test, focusing on the 5-HT_{1A} receptors type. Groups were divided based on high or low levels of ovarian hormones (proestrous/estrous phase - Pro-Est, or Diestrous 1/Diestrous 2 phase - Die 1-2), respectively.

Keywords: Trait anxiety; Prelimbic cortex; Female rats, Ovarian hormones; Serotonin; Conditioned fear.

1. INTRODUCTION

The non-adaptative response to psychological stress is a prevalent condition and a major health hazard most commonly verified in women than in men (Legato, 2010).

This is possible by cyclical natural chemical changes that occurring as a result of the production of female sex hormones during the menstrual or estrous cycle in women and laboratory animals, respectively. Among the symptoms elicited by these hormonal oscillations changes on mood, aggressive behavior and altered responses triggered by minor stressfull situations are the most prevalent (O'Brien et al., 2011). This is important to note as, in spite of considerable progress has been achieved in the study of fear and fear-memory formation, little is known about fear learning and fear expression in females. The reason for the discrepancy between genders relies on one main factor: the majority of research in both, humans and laboratory animals, have not considered hormonal status. This omission has been proved to be surprising as female behaviors are highly influenced by ovarian hormones, in particular estradiol and progesterone. As an example, the premenstrual syndrome does not occurs in the presence of higher progesterone/estrogen levels (Hammarback et al., 1991). This influence seems to go beyond the hormonal effects *per se* since, in laboratory animals, cell signaling, excitability and morphology of the neurons of hippocampal formation are greatly influenced by estradiol (Woolley and McEwen, 1993).

Fear conditioning is the most widely used behavioral models in the study of the mechanisms underlying the associative memory constitution (Orsini and Maren, 2012). To date, it has been well established that interactions between the medial prefrontal cortex and amygdala underlie conditioned fear memory processing (Stevenson, 2011). However, the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) has also been involved in the modulation of conditioned fear responses (Lauzon and Laviolette, 2010, Pape and Pare,

2010), particularly in the processing of high levels of fear (Mobbs et al., 2007) in which the GABA_A receptors plays fundamental role (Brandao et al., 2005, Reimer et al., 2008). The major functions of the mesencephalic periaqueductal gray (PAG) include the modulation of vocalization, lordosis and cardiovascular responses, and the control of pain, analgesia, fear and anxiety (Behbehani, 1995). It has been shown that hormonal alterations during estrous cycle promote differential effects on neuronal excitability in the PAG as revealed by upregulation of GABA_A receptor subunit expression in this midbrain region (Griffiths and Lovick, 2005a, Griffiths and Lovick, 2005b). Importantly, as the GABAergic system, 5-HT mechanisms plays an inhibitory influence on brain regions belonging to the brain aversive system (Graeff, 1981, Graeff and Zangrossi, 2010), such as the hypothalamus and the DPAG (Moreira et al., 2013). This is important to note as clinical anxious subjects present a sustained abnormal anxiety state (Etkin and Wager, 2007, Shin and Liberzon, 2010); a pattern of response commonly observed in rodents (Liebsch et al., 1998, Henniger et al., 2000, Ezequiel Leite and Nobre, 2012). The basis of this innate sustained anxiety may rest on changes of 5-HT neurotransmission and could underlie the emotional and behavioral dissimilarities between low- (LA) and high-anxiety (HA) subjects. In fact, changes in the activity of the brain 5-HT system has been implicated in a wide range of behavioral disorders, including anxiety.

Ovarian hormones may contribute to the vulnerability to emotional and humoral disorders. Depression, for example, is more common in women than men (Hyde et al., 2008). In addition, ovarian hormone fluctuations can greatly influence anxiety in humans (Arpels, 1996) and anxiety-related behavior in rodents (Mora et al., 1996, Lund et al., 2005). As shown by neurochemical and electrophysiological studies changes related to estrous cycle seems to involve the functioning of the GABA (Pericic et al.,

1986, Mackenzie and Maguire, 2014) and 5-HT brain systems (Williams and Uphouse, 1989), both neurotransmitters actively implicated in the control of anxiety (Griebel and Holmes, 2013). Importantly, changes in the activity of the brain 5-HT system has been implicated in a wide range of behavioral disorders, including anxiety. In this disorder the 5-HT_{1A} receptor has been reputed as its main modulator in its normal and pathological forms (Altieri et al., 2013, Popova and Naumenko, 2013). Estradiol and progesterone also affect neuronal plasticity in several other brain areas including amygdala, an important modulator of the expression of fear-related behaviors (Woolley and McEwen, 1993, McEwen and Woolley, 1994, Tang et al., 2004, Hao et al., 2006, Foy et al., 2008). This is possible by the extrinsic connections the central amygdala nuclei (CeA) share with the DPAG, the mesencephalic effector of fear response (McNaughton and Corr, 2004, Oliveira et al., 2004).

Taking into account the information cited above and the data from a recent report of our laboratory conducted in male rats (Ferreira and Nobre, 2014) the current study aims to further explore how natural hormonal variations affect the expression of conditioned fear in female rats that were previously selected by its anxiety-like phenotype - low- (LA) or high-anxious (HA) and the influence of 5-HT on the modulatory effects of ovarian hormones on fear response, as measured by the fear potentiated startle test, focusing on the 5-HT_{1A} receptors type. Groups were divided based on high or low levels of ovarian hormones (proestrous/estrous phase - Pro-Est, or Diestrous 1/Diestrous 2 phase - Die 1-2), respectively.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Animals

Two-hundred and sixty-nine female Wistar rats ($200 \pm 10\text{g}$), obtained from the animal house of the campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Following arrival the animals remained undisturbed for one week, for acclimatization. They were housed in groups of two in standard plastic cages (45 (35 (15cm) with wood chip bedding under a 12 hour light/12 hour dark cycle (lights off at 7 p.m.) at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, with free access to food and water all the time. Experiments were conducted during the light phase.

2.2. Ethical statement

The procedures used in this study received the formal approval of the Committee on Animal Research and Ethics of the University of Sao Paulo (CEUA – process 12.1.144.53.7) and adhered to the recommendations of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNEC), which are in accordance with the U. S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize pain and suffering.

2.3. Vaginal Cytology

Two days after arriving at the laboratory of Neuropsychopharmacology the animals were assessed for phases of the estrous cycle by vaginal smears. For this, a cotton tipped applicator was dipped in 0.9% physiological saline and inserted into the vaginal canal. The cells collected were placed onto slides and stained with 1% toluidine for estrous phase identification, as follows. Estrus is characterized as dense clusters of non-nucleated blue cornified cells. Diestrus 1 (also known as metestrus) is identified by a combination of leucocytes and few cornified epithelial cells. Diestrus 2 is identified by very sparse leukocyte and nucleated epithelial cell types. Finally, proestrus is evident by its dark purple-stained nucleated epithelial cells. Vaginal cytology at the day of the experiments was conducted immediately after finishing the tests. In order to assess the influence of the estrous cycle on the different phases of the experiment we grouped the

four different phases of the cycle in two, namely: the Proestrus/Estrus phase (Pro-Est) and the Diestrus 1/Diestrus 2 phase (Die 1-2). The former characterized by elevated estradiol and progesterone levels. The later characterized by low estradiol and progesterone levels (Becker et al., 2005).

2.4. Startle response apparatus

Potentiated startle analysis was conducted in four sound-attenuating chambers (45cm deep x 48cm high x 48cm wide). Inside each chamber there was a testing cage (16.5 x 7.5 x 7.5cm) made of Plexiglas, the floor consisting of 6 stainless-steel bars spaced every 15mm among them, fixed to a stabilimeter by four thumb screws (Insight, São Paulo, Brazil). Inside the stabilimeter, a load-cell captured the pressure on the response platform during startle reaction (Insight, São Paulo, Brazil). Startle stimuli (50ms burst of white noise) and a continuous background noise (55 dB) were delivered by a loudspeaker located 10cm behind the testing cage. The startle reaction was recorded within a time window of 200ms. Animals were conditioned to fear a visual stimulus (light) through consecutive pairings of these stimuli with a foot-shock. For this, we used an electrical stimulator (scrambler) linked to 18 stainless-steel bars that compose the floor of the conditioning box (20cm deep x 21cm high x 23cm wide). This apparatus allows the foot-shocks to be delivered during fear-conditioning sessions. Rats were conditioned to light-CS using four individual conditioning boxes, located inside four small Plexiglas chambers (25cm deep x 35cm high x 34cm wide), whose walls and ceiling were composed of horizontal black and white stripes (4cm wide). An opening in the rear wall allowed the presentation of the conditioned stimulus used (light). This chamber was located, in turn, within the sound-attenuating shell described above.

2.5. Selection of low-anxiety (LA) and high-anxiety (HA) rats

Rats were allocated to the LA- or HA-like groups according to the data recorded on the second day of matching, as described below. Thus, animals presenting low startle amplitude were allocated to the LA group. On the other hand, rats presenting high unconditioned startle amplitude were allocated to the HA group. This procedure was adapted to this study taking into account that increases in the auditory startle response correlate with innate levels of anxiety in both human and laboratory subjects (Plappert et al., 1993, Krystal et al., 1997, Ray et al., 2009). Animals with an amplitude of unconditioned startle response below of 120g or above 1200g was discarded. This was accomplished in order to avoid excessive variability. However, throughout all experiments just three animals met this criterion.

2.6. Startle response: Matching

Matching was conducted along two daily sessions of 20min. The animals were placed in the testing cage for a 5min habituation period and, after that, were presented with a series of 30 startle-eliciting noise bursts (10 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB), with a 30sec inter-stimulus interval (ISI). Startle stimuli were presented in a quasi-random order with the restriction that each intensity occurring once within each successive block of three stimuli. The mean startle amplitude across the 30 test trials was used for matching the animals into LA and HA groups.

2.7. Surgery

Twenty-four hours after the second matching session the animals were anesthetized with a 0.1ml ketamine hydrochloride + 0.1ml xylazine mixture (60/10mg/kg) and a cannula made from a stainless steel needle (24 gauges, 14mm length) was implanted aimed to basolateral amygdala (anterior/posterior: -2.4mm; medial/lateral: ± 5.0 mm, dorsal/ventral: -6.6mm) or DPAG (anterior/posterior: -6.96mm; medial/lateral: ± 0.2 mm, dorsal/ventral: -3.0mm) according to the Paxinos and

Watson's atlas (2008). At the end of surgery, each animal received an intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (120.000UI, 0.2ml) followed by an injection of the anti-inflammatory and analgesic drug Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg). The animals were allowed five days of post-surgery recovery. **Figure 1** shows a photomicrograph with representative sites of drug injections on the region in study. Animals that presented problems during or after surgery (death, prosthesis infection, etc.), and those in which the sites of cannulae were out of the boundaries of the region of interest, were removed from the study.

2.8. Potentiated Startle

Training sessions: fear conditioning

Twenty-four hours after the second matching session, the animals underwent the stereotaxic surgery. Five days after surgery, LA and HA animals were submitted to the fear-conditioning procedure. They were conditioned to light-CS, in the apparatus already described, after a habituation-phase of 5min. Each rat received 10 pairings of a light (conditioned stimulus – CS, 4sec of duration, 6W) co-terminating with a foot-shock (unconditioned stimuli – US, 1sec of duration, 0.6 mA of intensity). The ISI varied randomly between 60 and 180sec. Two fear-conditioning trainings were conducted, with a 24 hour interval between them. The duration of each training session was about 25min, including the habituation time.

Test sessions: fear-potentiated startle

Twenty-four hours after training, the fear-potentiated startle was evaluated. For these sessions the contexts used during training (striped context) were removed from the sound-attenuating chambers. Sessions were conducted without foot-shock presentation in the context as the same way as used for matching. The local modulation of 5-HT neurotransmission on unconditioned and conditioned fear was assessed, in independent

groups of rats, five minutes after an intra-PrL infusion of 5-HT or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. Animals were placed into the testing cages and, after additional 5min of habituation, they were exposed to 60 startle stimuli (20 of each of three intensities, 90dB, 95dB, and 105dB) with a 30s ISI. Half of the startle stimulus intensity was presented in the absence of the CS (noise-alone trials - unconditioned startle response) and the other half were presented in the presence of the CS (light-noise trials - fear-potentiated startle). In the light-noise trials, rats were exposed to a 4sec presentation of light-CS, co-terminating with the startle stimulus. The noise-alone and light-noise trials were intermingled at random. The duration of the test session, including habituation time, was 37min. Dependent variables recorded were the latency and the amplitude of startle in both unconditioned startle response and fear-potentiated startle trials.

2.9. Drugs, doses and groups

In this study, we used the 5-HT (10nmol/0.2μl, Sigma - USA) and the selective 5-HT_{1A} agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT – 0.3μg/0.2μl, Sigma - USA). The doses of 5-HT and 8-OH-DPAT were based on the studies of Graeff et al., (1986) and Tomkins et al., (1994). Drugs were diluted in phosphate-buffer saline (PBS - pH 7.0) shortly before microinjections. PBS was also used as a control solution. Drug effects were evaluated 24 hours after the second training session. The waiting time for drug effects was 5min for both drugs. Independent groups were used with each animal received only one drug infusion (BLA or DPAG), as follows: LA/PBS/Pro-Est (n=18), LA/5-HT/Pro-Est (n=18), LA/8-OH/Pro-Est (n=18), HA/PBS/Pro-Est (n=14), HA/5-HT/Pro-Est (n=13), HA/8-OH/Pro-Est (n=14), LA/PBS/Die 1-2 (n=14), LA/5-HT/Die 1-2 (n=14), LA/8-OH/Die 1-2 (n=15), HA/PBS/Die 1-2 (n=15), HA/5-HT/Die 1-2 (n=15) and HA/8-OH/Die 1-2 (n=15).

2.10. Microinjection

A volume of 0.2µl of PBS, 5-HT or 8-OH-DPAT was delivered at a rate of 0.1µl/min through a 30-gauge stainless steel cannula connected by PE10 tubing to a 5.0µl Hamilton syringe mounted on a syringe pump (Harvard, USA).

2.11. Euthanasia, perfusion and histology

Ten minutes after an overdose of sodium pentobarbital (60mg/kg) death was determined by the loss of the righting reflex, spontaneous respiration and lack of response to tail pinch. Then, the animals were perfused intracardially with phosphate-buffer saline (pH 7.0) followed by a solution of paraformaldehyde (4%). After decapitation, the brains were removed, immersed for 3 hours in fresh 4% formaldehyde and later transferred to a 30% sucrose solution for cryoprotection. Coronal sections of 60µm were cut on a freezing microtome (Leyca, Nussloch, Germany), mounted on gelatin-coated slides, and stained with neutral red (Sigma, SL, USA).

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted independently for each region in study (BLA ou DPAG). Emotional reactivity, hormonal influence and drug effects were analysed by a multifactorial repeated measures ANOVA with the anxiety levels (LA x HA), drugs (PBS x 5-HT x 8-OH) and estrous cycle (Pro-Est x Die 1-2) as the main “between” variables, and trials (noise alone x light/noise trials) as the “within” variable. The percentage of startle was calculated using the following formula: $(\text{light/noise} \times 100) / \text{noise alone} - 100$. Comparisons *a posteriori* was made using the Newman-Keuls post-hoc test. The probability of significance was set at $p \leq 0.05$ for all comparisons.

3. RESULTS

Drugs x BLA (Pro-Est): Drug effects were found as infusion of 5-HT or 8-OH-DPAT into BLA disrupts startle in HA rats ($F_{1,41}=10,10$; $p<0.005$). This effect is

dependent on the trials ($F_{1,41}=108.07$; $p<0.0001$) and these factors significantly interact with treatments ($F_{2,41}=6.28$; $p<0.005$). No changes were noted on variable latency for startle. ANOVA also showed that only 8-OH-DPAT has influenced the amplitude of FPS ($F_{2,41}=9.70$; $p<0.0005$), as determined by Newman-Keuls post-hoc test. Drugs x BLA (Die 1-2): ANOVA detected significant drug effects on factors anxiety ($F_{1,34}=28.67$; $p<0.0001$) and trials ($F_{1,34}=55.20$; $p<0.0001$) but drugs did not change the amplitude of FPS or latency. Drugs x DPAG (Pro-Est): Main differences promoted by treatment on gross startle response were achieved on anxiety levels ($F_{1,85}=38.94$; $p<0.0001$) and trials ($F_{1,85}=69.15$; $p<0.0001$). FPS ($F_{1,85}=6.70$; $p<0.05$) and latency ($F_{1,85}=12.03$; $p<0.005$) was also affected by anxiety factor. Drugs x DPAG (Die 1-2): ANOVA detected significant changes on startle induced by anxiety levels ($F_{1,85}=64.81$; $p<0.0001$) and this change was dependent upon trials ($F_{1,85}=82.03$; $p<0.0001$) as the factors significantly interact between them and with treatments ($F_{1,85}=5.44$; $p<0.01$). In spite of no effect has been found on FPS amplitude a trend to decrease this measure promoted by intra-DPAG infusions of 5-HT and 8-OH-DPAT were noted in HA Pro-Est and Die 1-2 groups.

4. DISCUSSION

In the present report we analyze the influence of 5-HT and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT administered directly into the basolateral amygdala or the DPAG of LA and HA female rats tested under different phases of estrous cycle (low or high estradiol/progesterone levels). Data from BLA groups showed that the gross startle amplitude is affected by both drugs but only 5-HT_{1A} receptors agonism proved to be effective in change FPS. This decrease denounces an anxiolytic-like action of the drug on the fear levels of HA subjects. Supporting this assumption data from latency clearly

show a tendency of HA during the Pro-Est phase to startling slower during drug effects, in spite of the absence of statistical significance. This effect is different from that observed in male rats tested under similar conditions meaning that 5-HT effects covary with hormonal status. These data are opposed to the traditional view that 5-HT in the amygdala enhances conditioned fear states. For example, data from the study of Gonzalez et al. (1996) showed that bilateral intra-BLA injection of 8-OH-DPAT promotes anxiogenic effects in the social interaction test. Increased 5-HT release in stressed animals were found in behavioral studies using the microdialysis technique showed the (Kawahara, 1995). In addition, intra-BLA injections of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, increase the contextual conditioned fear response (Martinez et al., 2007). Other studies, however, reported absence of effects of 5-HT agonists, using the plus-maze as the behavioral model (Gonzalez et al., 1996), and even contrary results (anxiolytic-like) in rats tested in the elevated T-maze (Zangrossi et al., 2001). However, different from us, these studies were conducted using male rats as experimental subjects, a gender that does not experience the influence of hormonal variations on behavior.

The amygdala is a subcortical bilateral brain region that shows increased reactivity to conditioned cues during both fear acquisition and extinction learning (Phelps et al., 2004, Knight et al., 2005). Functional activation of amygdala in response to emotional stimuli varies across the menstrual cycle (Goldstein et al., 2005). It is worth noting that amygdala contain high levels of estrogen receptors compared with other brain regions (Ostlund et al., 2003). However, increased responsiveness to stress is associated with a rapid fall only in plasma concentration of progesterone but not estrogen, that remains at stable levels (Butcher et al., 1974) and the main target of progesterone metabolite allopregnanolone is the GABA_A receptor where it shown an

anticonvulsant, sedative, analgesic, anesthetic and anxiolytic action (Belelli et al., 2009, Lambert et al., 2009). Our data are supported by these findings as startle response of control groups were facilitated during Pro-Est phase but showed to be decreased during the Die 1-2 phase. Regarding these data and previous reports from our laboratory (Nobre et al., 2003, Santos et al., 2006) we assume that increases in the startle amplitude in HA animals denounces a reduction in fear, bringing back the animal from a panic-like feature to an emotional state for which the startle response is compatible. In this context, previous reports from clinical and animal studies showed that changes in stressor intensity, duration and recurrence result in dampened defensive responses (Chalmers et al., 1974, Davis and Astrachan, 1978, McTeague and Lang, 2012). Moreover, the 5-HT neural system, which is linked to a variety of psychopathological processes including anxiety and depression, is also modulated throughout life by ovarian hormones (Krajnak et al., 2003). This is important for the present study in which BLA-5-HT system influence on conditioned fear was assessed by local 5-HT itself or 5-HT_{1A} agonist infusions. No changes were noted among groups tested during Die 1-2 phase (low estrogen/progesterone), data similar to that found with male rats. However, significant reduction of FPS was achieved when the HA Pro-Est group was challenged with 8-OH-DPAT.

5-HT is an ubiquitous neurotransmitter produced and released by a neuronal system arising mainly from the mesencephalic raphe nuclei, being modulated throughout life by ovarian hormones (Krajnak et al., 2003, Lowry et al., 2008). The action of oestrogens on the central nervous system during development leads to sexual differentiation of 5-HT system, resulting in different density of 5-HT innervation in males and females (Gonzalez and Leret, 1992, Reznikov and Nosenko, 1996). Besides, neuronal 5-HT is highly influenced by changes in the estrogen and progesterone

commonly occurring along the estrous cycle during adult hood (Maswood et al., 1995, Maswood et al., 1999). These ovarian hormones are reported to maintain the health and viability of 5-HT neurons (Bethea et al., 2002), and health and viability of 5-HT are necessary conditions for preserving emotional and affective integrity (Graeff et al., 1996). We assume that this is the reason for the anxiolytic-like action promoted by 8-OH-DPAT in HA rats tested during the Pro-Est phase of the cycle. The same data also substantiate the data collected from HA Die 1-2 group in which both drugs were ineffective in changing the conditioned fear measures.

The second part of the present experiments addressed the effects of the drugs used when infused locally at the DPAG, a well-known midbrain region mainly involved in the expression of unconditioned fear and anxiety (Brandao et al., 1999, Brandao et al., 2005). The DPAG administration of 5-HT or 8-OH-DPAT did not change startle measures, no matter hormonal phase or anxiety-like behavior levels. Data found on Die 1-2 phase resembling those found on male rats in a previous published report (Ferreira and Nobre, 2014)

A vast literature highlights the role of the periaqueductal gray on the modulation and expression of several fear-related behaviors (Bandler and Carrive, 1988, Carrive, 1993, Graeff et al., 1993, De Oca et al., 1998, Brandao et al., 1999). Increases of the aversive threshold of electrical stimulation of this region has been shown after 5-HT_{1A} agonism (Broiz et al., 2008) and with the use of the non-selective 5-HT serotonin receptor agonist α -methyl 5-HT or the highly selective antagonist of 5-HT_{2A} receptors ketanserin (Oliveira et al., 2007). In our study conditioned fear as measure by the amplitude of FPS remains unchanged after drug challenge, in spite of a clear tendency of reduction in this measure has been noted in HA rats. Once again, data from gross startle response of LA and HA females tested on Die 1-2 phase showed a similar profile

as those seen in male rats (Ferreira and Nobre, 2014). This reinforces the idea that data from male rats can be used as a control of estrous cycle in female rats.

The changes induced by estrous cycle in the brain of female rats promote differential effects on the neural excitability of the neurons of the periaqueductal gray (Brack and Lovick, 2007). For instance, during the late diestrous phase the fall in the levels of progesterone is associated with the upregulation of the $\alpha 4\beta 1$ GABA_A receptors subunit da expressão da subunidade dos receptores GABA_A da SCP (Griffiths and Lovick, 2005a), leading to a disinhibition of these circuits, turning it more excitable. This could explain the differences in the emotional reactivity observed between males and females. The absence of effects of the serotonergic agents when locally applied into DPAG could mean that, as in males, other neuronal systems could underlie the emotional differentiation induced during the different phases of the hormonal cycle as, for example, the GABAergic and glutamatergic systems.

Financial Support

This research received financial support from FAPESP (Proc. no. 2013/10834-6). M. J. Nobre is a researcher from CNPQ. R. Ferreira holds a doctoral scholarship from CNPq (Proc. no. 142608/2010-6).

Figures

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Legends

Figure 1. Photomicrograph showing the region of interest. Arrows point out the sites of drug injections. BLA: basolateral amygdala, DPAG: dorsal periaqueductal gray, Aq: Aqueduct.

Figure 2. BLA x drug effects - Columns represent the effects of 5-HT and 8-OH on the latency, startle response and FPS of rats previously divided as LA or HA. Above is showed the data of female rats of the Pro-Est group. Below is showed the data collected from the female rats of the Die 1-2 groups. Regarding the latency of startle and the amplitude of startle response * is related to the main difference between trials within each group (LA-PBS, 5-HT or 8-OH, HA-PBS, 5-HT or 8-OH. # Is related to the main difference between groups, in the same trial (noise or light/noise). + Significant difference between drug and control groups, in the same trial, and in the same anxiety level (LA or HA). Regarding the FPS, * main differences between drugs and control group in the same anxiety level (LA or HA). + Main differences between anxiety levels in the same drug treatment. Statistical analyzes were conducted using a multifactorial RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* was made using the Newman-Keuls test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

Figure 3. DPAG x drug effects - Columns represent the effects of 5-HT and 8-OH on the latency, startle response and FPS of rats previously divided as LA or HA. Above is showed the data of female rats of the Pro-Est group. Below is showed the data collected from the female rats. Regarding the latency of startle and the amplitude of startle response * is related to the main difference between trials within each group (LA-PBS, 5-HT or 8-OH, HA-PBS, 5-HT or 8-OH. # Is related to the main difference between groups, in the same trial (noise or light/noise). + Significant difference between drug and control groups, in the same trial, and in the same anxiety level (LA or HA). Regarding the FPS, * main differences between drugs and control group in the same anxiety level (LA or HA). + Main differences between anxiety levels in the same drug treatment. Statistical analyzes were conducted using a multifactorial RM ANOVA. Comparisons *a posteriori* was made using the Newman-Keuls test for unequal N. The level of *p* was set at 5% (≤ 0.05).

References

- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural plasticity* 2007:30873.
- Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM (2013) Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS chemical neuroscience* 4:72-83.
- Amin Z, Canli T, Epperson CN (2005) Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews* 4:43-58.
- Arpels JC (1996) The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. *The Journal of reproductive medicine* 41:633-639.
- Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain research* 439:95-106.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E (2005) Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 146:1650-1673.
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in neurobiology* 46:575-605.
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic GABA_A receptors: form, pharmacology, and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12757-12763.
- Benmansour S, Weaver RS, Barton AK, Adeniji OS, Frazer A (2012) Comparison of the effects of estradiol and progesterone on serotonergic function. *Biological psychiatry* 71:633-641.
- Bethea CL, Lu NZ, Gundlach C, Streicher JM (2002) Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Frontiers in neuroendocrinology* 23:41-100.
- Brack KE, Lovick TA (2007) Neuronal excitability in the periaqueductal gray matter during the estrous cycle in female Wistar rats. *Neuroscience* 144:325-335.
- Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23:863-875.
- Brandao ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC (2005) Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:1299-1311.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708.
- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural brain research* 58:27-47.
- Chalmers DV, Hohf JC, Levine S (1974) The effects of prior aversive stimulation on the behavioral and physiological responses to intense acoustic stimuli in the rat. *Physiology & behavior* 12:711-717.
- Davis M, Astrachan DI (1978) Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 4:95-103.

- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998) Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:3426-3432.
- De Souza Silva MA, Marchetti L, Eisel UL, Huston JP, Dere E (2007) NR2C by NR2B subunit exchange in juvenile mice affects emotionality and 5-HT in the frontal cortex. *Genes, brain, and behavior* 6:465-472.
- Diaz-Veliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S (1991) Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiology & behavior* 50:61-65.
- Etkin A, Wager TD (2007) Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *The American journal of psychiatry* 164:1476-1488.
- Ezequiel Leite L, Nobre MJ (2012) The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*.
- Ferreira R, Nobre MJ (2014) Conditioned fear in low- and high-anxious rats is differentially regulated by cortical subcortical and midbrain 5-HT1A receptors. *Neuroscience* 268:159-168.
- Foy MR, Akopian G, Thompson RF (2008) Progesterone regulation of synaptic transmission and plasticity in rodent hippocampus. *Learn Mem* 15:820-822.
- Goldstein JM, Jerram M, Poldrack R, Ahern T, Kennedy DN, Seidman LJ, Makris N (2005) Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9309-9316.
- Gonzalez LE, Andrews N, File SE (1996) 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain research* 732:145-153.
- Gonzalez MI, Leret ML (1992) Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 41:329-332.
- Graeff FG (1981) Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 14:239-265.
- Graeff FG, Brandao ML, Audi EA, Schutz MT (1986) Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behavioural brain research* 22:173-180.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54:129-141.
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural brain research* 58:123-131.
- Graeff FG, Zangrossi H, Jr. (2010) The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 10:207-217.
- Griebel G, Holmes A (2013) 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 12:667-687.
- Griffiths J, Lovick T (2005a) Withdrawal from progesterone increases expression of $\alpha 4$, $\beta 1$, and δ GABA(A) receptor subunits in neurons in the

- periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *The Journal of comparative neurology* 486:89-97.
- Griffiths JL, Lovick TA (2005b) GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience* 136:457-466.
- Hammarback S, Ekholm UB, Backstrom T (1991) Spontaneous anovulation causing disappearance of cyclical symptoms in women with the premenstrual syndrome. *Acta endocrinologica* 125:132-137.
- Hao J, Rapp PR, Leffler AE, Leffler SR, Janssen WG, Lou W, McKay H, Roberts JA, Wearne SL, Hof PR, Morrison JH (2006) Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2571-2578.
- Hendrie CA, Weiss SM, Eilam D (1996) Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54:13-20.
- Henniger MS, Ohl F, Holter SM, Weissenbacher P, Toschi N, Lorsch P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behavioural brain research* 111:153-163.
- Hyde JS, Mezulis AH, Abramson LY (2008) The ABCs of depression: integrating affective, biological, and cognitive models to explain the emergence of the gender difference in depression. *Psychological review* 115:291-313.
- Kawahara H, Kawahara, Y., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., Tanaka, M. (1995) Serotonin release in the rat amygdala during exposure to emotional stress. In: *Serotonin in the central nervous system and periphery*(Elsevier, ed), pp 89-96 Amsterdam: Elsevier.
- Klumpers F, Raemaekers MAHL, Ruigrok ANV, Hermans EJ, Kenemans JL, Baas JMP (2010) Prefrontal Mechanisms of Fear Reduction After Threat Offset. *Biological psychiatry* 68:1031-1038.
- Knight DC, Nguyen HT, Bandettini PA (2005) The role of the human amygdala in the production of conditioned fear responses. *NeuroImage* 26:1193-1200.
- Krajnak K, Rosewell KL, Duncan MJ, Wise PM (2003) Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. *Brain research* 990:87-94.
- Krystal JH, Webb E, Grillon C, Cooney N, Casal L, Morgan CA, 3rd, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1997) Evidence of acoustic startle hyperreflexia in recently detoxified early onset male alcoholics: modulation by yohimbine and m-chlorophenylpiperazine (mCPP). *Psychopharmacology* 131:207-215.
- Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RD, Weir CJ, Belelli D (2009) Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S48-58.
- Lauzon NM, Laviolette SR (2010) Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: Implications for neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research* 208:12-22.
- Lebron-Milad K, Milad MR (2012) Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of mood & anxiety disorders* 2:3.

- Lebron-Milad K, Tsareva A, Ahmed N, Milad MR (2013) Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction. *Behavioural brain research* 253:217-222.
- Legato MJ (2010) The skewed sex distribution in affective disorders--a diagnostic, social, or biological problem? *Progress in brain research* 186:159-166.
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural brain research* 94:301-310.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148:86-94.
- Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ (2005) Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146:797-807.
- Mackenzie G, Maguire J (2014) The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABA receptors in affective disorders. *Psychopharmacology*.
- Mallo T, Koiv K, Koppel I, Raudkivi K, Uustare A, Rinken A, Timmusk T, Harro J (2008) Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain research* 1194:110-117.
- Martinez RC, Ribeiro de Oliveira A, Brandao ML (2007) Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 17:717-724.
- Maswood S, Stewart G, Uphouse L (1995) Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, on hypothalamic serotonin. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 51:807-813.
- Maswood S, Truitt W, Hotema M, Caldarola-Pastuszka M, Uphouse L (1999) Estrous cycle modulation of extracellular serotonin in mediobasal hypothalamus: role of the serotonin transporter and terminal autoreceptors. *Brain research* 831:146-154.
- McEwen BS, Woolley CS (1994) Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Experimental gerontology* 29:431-436.
- McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:285-305.
- McTeague LM, Lang PJ (2012) The anxiety spectrum and the reflex physiology of defense: from circumscribed fear to broad distress. *Depression and anxiety* 29:264-281.
- Miller MM, Morrison JH, McEwen BS (2012) Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. *Behavioural brain research* 229:280-288.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079-1083.
- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:609-620.

- Moreira FA, Gobira PH, Viana TG, Vicente MA, Zangrossi H, Graeff FG (2013) Modeling panic disorder in rodents. *Cell and tissue research* 354:119-125.
- Nobre MJ, Sandner G, Brandao ML (2003) Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hearing research* 184:82-90.
- O'Brien S, Rapkin A, Dennerstein L, Nevatte T (2011) Diagnosis and management of premenstrual disorders. *BMJ* 342:d2994.
- Oliveira LC, Broiz AC, de Macedo CE, Landeira-Fernandez J, Brandao ML (2007) 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacology* 191:253-262.
- Oliveira LC, Nobre MJ, Brandao ML, Landeira-Fernandez J (2004) Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport* 15:2281-2285.
- Orsini CA, Maren S (2012) Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36:1773-1802.
- Ostlund H, Keller E, Hurd YL (2003) Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007:54-63.
- Overstreet DH, Commissaris RC, De La Garza R, 2nd, File SE, Knapp DJ, Seiden LS (2003) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress* 6:101-110.
- Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological reviews* 90:419-463.
- Paxinos GW, C. (2008) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Pericic D, Manev H, Geber J (1986) Sex related differences in the response of mice, rats and cats to administration of picrotoxin. *Life sciences* 38:905-913.
- Phelps EA, Delgado MR, Nearing KI, LeDoux JE (2004) Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron* 43:897-905.
- Plappert CF, Pilz PK, Schnitzler HU (1993) Acoustic startle response and habituation in freezing and nonfreezing rats. *Behavioral neuroscience* 107:981-987.
- Popova NK, Naumenko VS (2013) 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Reviews in the neurosciences* 24:191-204.
- Quirk GJ, Beer JS (2006) Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Current opinion in neurobiology* 16:723-727.
- Ray WJ, Molnar C, Aikins D, Yamasaki A, Newman MG, Castonguay L, Borkovec TD (2009) Startle response in generalized anxiety disorder. *Depression and anxiety* 26:147-154.
- Reimer AE, Oliveira AR, Brandao ML (2008) Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. *Brain research bulletin* 76:545-550.
- Reznikov AG, Nosenko ND (1996) Early postnatal changes in sexual dimorphism of catecholamine and indoleamine content in the brain of prenatally stressed rats. *Neuroscience* 70:547-551.
- Santos JM, Martinez RC, Brandao ML (2006) Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate

- and high-intensity contextual conditioning. *European journal of pharmacology* 542:121-128.
- Sherwin BB (1998) Estrogen and cognitive functioning in women. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:17-22.
- Shin LM, Liberzon I (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35:169-191.
- Spampinato MV, Wood JN, De Simone V, Grafman J (2009) Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 21:199-205.
- Stevenson CW (2011) Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. *Neurobiology of learning and memory* 96:315-323.
- Tang Y, Janssen WG, Hao J, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH (2004) Estrogen replacement increases spinophilin-immunoreactive spine number in the prefrontal cortex of female rhesus monkeys. *Cereb Cortex* 14:215-223.
- Tomkins DM, Sellers EM, Fletcher PJ (1994) Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. *Neuropharmacology* 33:349-358.
- Walf AA, Frye CA (2009) Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gender medicine* 6:300-311.
- Williams J, Uphouse L (1989) Serotonin binding sites during proestrus and following estradiol treatment. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 33:615-620.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology* 336:293-306.
- Zangrossi H, Jr., Viana MB, Zanoveli J, Bueno C, Nogueira RL, Graeff FG (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25:637-645.