

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

**Efeitos da microinjeção intra-hipocampal de substância P sobre as
respostas inatas e condicionadas de medo e sua interação com
mecanismos serotoninérgicos**

Milene Cristina de Carvalho

Ribeirão Preto - SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**Efeitos da microinjeção intra-hipocampal de substância P sobre as
respostas inatas e condicionadas de medo e sua interação com
mecanismos serotoninérgicos**

Milene Cristina de Carvalho

Tese de Doutorado 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 de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Ribeirão Preto - SP
2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Milene Cristina de.

Efeitos da microinjeção intra-hipocampal de substância P sobre as respostas inatas e condicionadas de medo e sua interação com os mecanismos serotoninérgicos/ Milene Cristina de Carvalho; orientador Marcus Lira Brandão.

--Ribeirão Preto, 2009.

85 f.: 29cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.

1. Rato. 2. Hipocampo. 3. Ansiedade. 4. Medo contextual. 5. Substância P. 6. Serotonina.

*Aos meus pais Railda e Oswaldo,
grandes incentivadores.*

Dedico.

Agradecimentos

*Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão por contribuir,
grandiosamente, para o meu crescimento profissional.*

*À Profa. Dra Maria Angélica de Souza Silva por co-
orientar este projeto de pesquisa.*

*Às pessoas que direta e indiretamente contribuíram
para a realização deste trabalho.*

*Cérebro Eletrônico
(Gilberto Gil)*

*O cérebro eletrônico faz tudo
Faz quase tudo
Faz quase tudo
Mas ele é mudo*

*O cérebro eletrônico comanda
Manda e desmanda
Ele é quem manda
Mas ele não anda*

*Só eu posso pensar
Se Deus existe
Só eu
Só eu posso chorar
Quando estou triste
Só eu*

*Eu cá com meus botões
De carne e osso
Eu falo e ouço.
Eu penso e posso*

*Eu posso decidir
Se vivo ou morro por que
Porque sou vivo
Vivo pra cachorro e sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
Em meu caminho inevitável para a morte*

*Porque sou vivo
Sou muito vivo e sei
Que a morte é nosso impulso primitivo e sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
Com seus botões de ferro e seus olhos de vidro*

RESUMO

A substância P (SP) é um neuropeptídeo envolvido em processos relacionados à aprendizagem, memória, medo e ansiedade. O hipocampo, uma das estruturas límbicas envolvidas nesses processos, possui grande quantidade de neurônios que contêm SP e receptores neurocininérgicos. Visto que o hipocampo apresenta alterações neuroquímicas ao longo do seu eixo dorso-ventral, muitos estudos têm mostrado diferenças na expressão de respostas comportamentais associadas a essas alterações. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da injeção de SP no hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV) de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto e condicionamento contextual aversivo. Os resultados mostraram que a microinjeção de SP no HD, mas não no HV, aumentou a exploração dos braços abertos do LCE e da área central do campo aberto. Além disso, a SP intra-HD promoveu uma redução do tempo de congelamento de animais expostos ao contexto aversivo onde, previamente, receberam choques nas patas. Esses resultados indicam um efeito anti-aversivo da SP no HD. Com o intuito de investigar se os efeitos promovidos pela SP no HD apresentam uma interação com os mecanismos serotoninérgicos, foram realizados estudos adicionais utilizando a técnica de microdiálise *in vivo*. A microinjeção de SP no HD em condições basais (não-aversivas) não influenciou a concentração extracelular de serotonina. Os resultados indicam a participação da SP hipocampal na expressão de respostas defensivas e, em condições basais, a independência de seus efeitos de mecanismos serotoninérgicos.

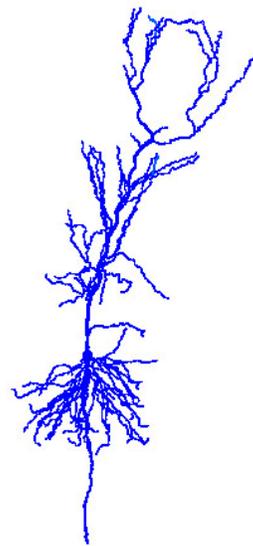
ABSTRACT

Substance P (SP) is known to be involved in processes related to learning and memory, fear, anxiety and stress. SP and NK₁ receptors are localized in the hippocampus, a brain structure involved in learning and memory as well as emotional processes. As there is evidence for differential functions of the ventral (VH) and dorsal (DH) hippocampus in a variety of behaviors, we here evaluated the effects of injections of SP into the VH and DH in rats submitted to the elevated plus-maze (EPM), open field and contextual fear conditioning. The results showed that infusions of SP into the DH, but not VH, increased open arm exploration in the EPM and in the central zone of the open field. Furthermore, the injection of SP intra-DH promoted a reduction of freezing response in rats submitted to an aversive context previously paired with footshocks. These results indicate an anxiolytic-like effect of SP in the DH. Additional experiment was conducted to examine whether these effects of SP have an interaction with serotonergic mechanisms. To this end, extracellular concentrations of this monoamine were measured by means of the *in vivo* microdialysis technique. Infusions of SP into the DH did not change the serotonin extracellular concentrations in basal condition. These data indicate the participation of SP-DH in the expression of defensive responses and, that its effects are dissociated of serotonergic mechanisms at basal conditions.

SUMÁRIO

Introdução.....	10
1. Comportamento Defensivo	11
2. Modelos animais de ansiedade.....	12
2.1. Labirinto em cruz elevado	14
2.2. Campo aberto.....	14
2.3. Condicionamento contextual aversivo	15
3. Substratos neurais da defesa	16
3.1. Hipocampo	18
4. Substância P	21
Objetivos.....	23
Experimento I	25
Material e Métodos	26
1. Animais.....	27
2. Cirurgia	27
3. Droga.....	28
4. Microinjeções de drogas	28
5. Equipamentos	28
5.1. Labirinto em cruz elevado	28
5.2. Campo aberto.....	29
6. Procedimento Experimental	29
6.1. Labirinto em cruz elevado	30
6.2. Campo aberto.....	30
7. Histologia.....	31
8. Análise estatística	31
Resultados.....	32
9.1. Sítios de microinjeção	33
9.2. Efeitos da injeção de SP no HD e HV sobre o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado	34
Hipocampo Dorsal	34
Hipocampo Ventral.....	34
9.3. Efeitos da SP no HD e HV sobre o comportamento exploratório de ratos no campo aberto.	37
Hipocampo Dorsal	38
Hipocampo Ventral.....	38
Experimento II	40
Material e Métodos.....	41
1. Equipamentos	42
1.1. Caixa de condicionamento contextual aversivo.....	42
1.2. Contexto diferente	42
2. Procedimento experimental	43
Treino	43
Teste.....	43
3. Análise estatística	44
Resultados.....	45
4.1. Sítios de microinjeção	46
4.2. Efeitos da SP no HD e HV sobre a expressão das respostas condicionadas de medo.....	47

Hipocampo Dorsal	47
Hipocampo Ventral	47
Experimento III	49
Material e Métodos	50
1. Cirurgia	51
2. Equipamentos	51
2.1. Cromatografia Líquida de Alta Pressão	51
2.1.1. Preparo das soluções padrão	52
3. Sondas de diálise	52
3.1 Preparo	53
4. Procedimento Experimental	54
5. Análise Estatística	54
Resultados	55
6.1. Sítios de microinjeção	56
7.2. Efeitos da SP no HD sobre os níveis extracelulares de 5-HT no HD	57
Discussão	58
Conclusões	67
Referências Bibliográficas*	69
Anexos	83



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Introdução

1. Comportamento Defensivo

A emoção pode ser definida como uma experiência subjetiva acompanhada de manifestações comportamentais e fisiológicas detectáveis e de sensações agradáveis ou desagradáveis (LENT, 2004). Do ponto de vista histórico, o estudo da neurobiologia das emoções se inicia nos relatos de Charles Darwin (1872). Seus trabalhos, na segunda metade do século XIX, indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem. Darwin observou semelhanças na expressão corporal e facial das emoções entre indivíduos de diferentes espécies, e concluiu que esses comportamentos são inatos, e que evoluem do mesmo modo que as demais características biológicas das espécies (DARWIN, 1872).

De acordo com a perspectiva evolutiva, o medo e a ansiedade apresentam um valor adaptativo por se originarem nas reações de defesa exibidas por animais em situações de perigo (GRAEFF, 2001). A expressão desses comportamentos obedece a uma hierarquia, que se manifesta por meio de níveis de defesa (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Desta maneira, quando os animais se deparam com um perigo potencial, assumem um comportamento denominado “avaliação de risco”. Em caso onde os sinais de perigo tornam-se explícitos, porém distantes, a reação típica apresentada é o congelamento acompanhado por reações autonômicas e neurovegetativas. Quando o perigo é explícito e próximo, ocorre o comportamento de luta ou fuga. Portanto, a natureza das respostas defensivas em animais expostos a situações ameaçadoras depende da intensidade e distância do estímulo aversivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; BLANCHARD, 1990). Neste sentido, a diferença entre medo e ansiedade pode ser definida em relação aos estímulos e situações que os desencadeiam. O medo surgiria de situações explícitas de ameaça e perigo, e a ansiedade de situações que oferecem perigo potencial (BLANCHARD; BLANCHARD, 1990; BRANDÃO *et al.*, 2005), (Figura 1).

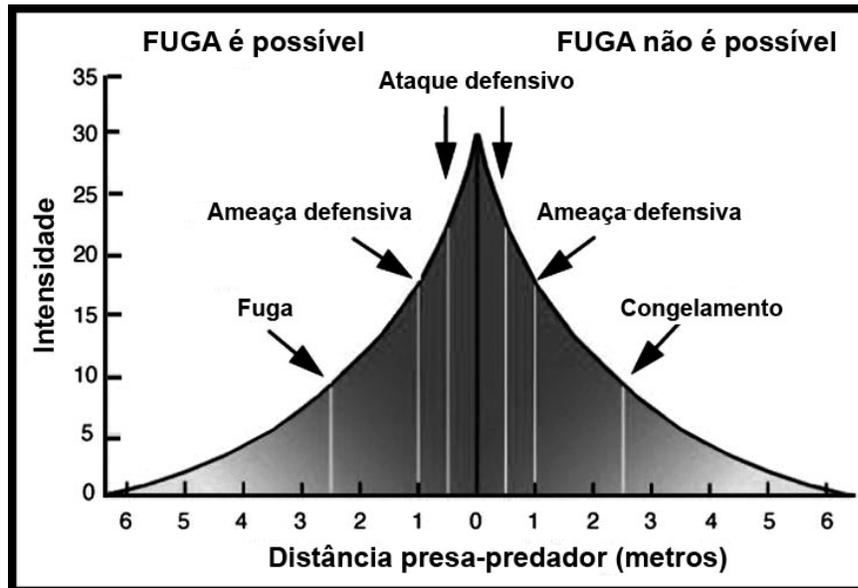


Figura 1. Respostas defensivas de roedores moduladas pelo contexto, intensidade do estímulo ameaçador e distância presa-predador. Figura modificada de Blanchard e Blanchard (1990).

No entanto, quando as manifestações de medo e ansiedade são intensas e duradouras em relação ao evento desencadeante, passam a ser consideradas patológicas (PRATT, 1992). Diante disso, evidencia-se a importância do avanço científico em busca da compreensão dos mecanismos neurais envolvidos na expressão desses comportamentos.

2. Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais de ansiedade possibilitam reproduzir em laboratório aspectos da sintomatologia da ansiedade em humanos e, assim, investigar os possíveis tratamentos para esse distúrbio. Além disso, esses modelos ajudam elucidar a participação de diferentes estruturas encefálicas e mecanismos neuroquímicos envolvidos na mediação das respostas aversivas (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDAO, 2008; CARVALHO *et al.*, 2005; FILE, 1992; TREIT, 1985).

Há dois grupos principais de modelos comportamentais, os modelos baseados em aprendizagem associativa e os modelos baseados em medos inatos ou etologicamente fundamentados. Os processos de aprendizagem associativa são baseados no condicionamento clássico Pavloviano e/ ou operante. No condicionamento clássico, estímulos neutros, como sons de baixa intensidade e luzes, após o pareamento sucessivo com estímulos aversivos incondicionados, como choques elétricos e sons intensos podem, isoladamente, desencadear respostas de medo e ansiedade (resposta condicionada). Assim, os estímulos neutros desencadeariam respostas de medo e ansiedade devido à antecipação da apresentação de um estímulo aversivo para o animal. No condicionamento operante, os animais aprendem determinadas estratégias para suprimir as consequências negativas associadas aos estímulos aversivos. Quando as respostas dos animais são seguidas pela apresentação do estímulo aversivo ocorre uma diminuição da expressão deste comportamento no futuro. Dentre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão os testes de condicionamento clássico (associação entre luz, som ou ambiente-contexto com estímulos incondicionados como os choques nas patas), o teste do sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito de Vogel e punição de pressão à barra (GELLER; SEIFTER, 1960; VOGEL; BEER; CLODY, 1971).

Os modelos etologicamente fundamentados utilizam estímulos que desencadeiam respostas inatas de medo. Esses modelos oferecem várias vantagens sobre os modelos de aprendizagem associativa, por não empregarem estímulos nocivos, como choques elétricos, privação de água ou de alimentos, por não requisitarem o treino do animal e por apresentarem baixo custo operacional (LISTER, 1990; PELLOW *et al.*, 1985). Dentre eles estão os testes de transição claro-escuro, interação social, interação presa-predador e labirinto em cruz elevado (LCE).

2.1. Labirinto em cruz elevado

O LCE originou-se do labirinto elevado em Y (MONTGOMERY, 1955). É composto por dois braços fechados com paredes laterais e dois abertos, perpendiculares entre si, e elevados em relação ao solo (PELLOW *et al.*, 1985). Baseia-se na aversão natural de roedores ao espaço aberto e altura, o que acarreta a preferência pelos braços fechados aos abertos (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Esse modelo é capaz de gerar conflito no animal devido à tendência de explorar ambientes novos e o risco de se aventurar em espaços abertos potencialmente perigosos. O tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos do LCE é considerado um índice de ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985). Drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas produzem o efeito contrário (MORRISON; STEPHENSON, 1970). Além das medidas tradicionais, o LCE permite a avaliação das categorias etológicas “novas”, que oferecem uma abordagem adicional à análise dos comportamentos relacionados à ansiedade (ANSELONI; BRANDAO, 1997; CARVALHO *et al.*, 2005).

2.2. Campo aberto

O campo aberto foi descrito em meados da década de 30 por Carl Hall. Originalmente, consistia de uma arena circular montada sob uma bateria de lâmpadas e alto-falantes de forma que o animal era exposto simultaneamente à luz e a ruídos fortes. Paredes laterais impossibilitavam a fuga do animal (WALSH; CUMMINS, 1976).

Atualmente, o campo aberto é um dos modelos mais utilizados na neurociência comportamental (BELZUNG, 1999; RAMOS *et al.*, 2008). Diferentes versões do modelo foram criadas (TAKAHASHI; KALIN, 1989), sendo que em todas se observa a locomoção geral do animal. Devido o comportamento denominado tigmotaxia, os animais preferem a periferia ao centro do aparato. A frequência de entradas, tempo de permanência e a latência

para entrar na parte central da arena são índices de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Drogas que aumentam esses comportamentos, sem causar alterações na atividade locomotora, podem ser classificadas como drogas ansiolíticas (PRUT; BELZUNG, 2003). Há evidências que vários tipos de neurotransmissores medeiam esses efeitos, como o GABA, serotonina (5-HT) e neuropeptídeos (PRUT; BELZUNG, 2003).

2.3. Condicionamento contextual aversivo

A reação de defesa é o resultado de alterações do padrão comportamental e cardiovascular de animais frente a estímulos ameaçadores ou estressantes (BANDLER; CARRIVE, 1988). Quando o animal é confrontado com uma ameaça, seja esta representada por um predador ou um ambiente desconhecido, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Em roedores esta reação é denominada congelamento. Trata-se de um comportamento complexo e coordenado caracterizado pela ausência de todos os movimentos corporais, exceto os movimentos respiratórios (BOLLES; COLLIER, 1976). É acompanhado por um conjunto de sinais, tais como defecação, micção, arqueamento do dorso, retração das orelhas, piloereção e exoftalmia (AVANZI *et al.*, 1998).

Estímulos neutros como sons, luz ou contexto que, isoladamente, não eliciam resposta de medo, podem produzi-la por meio do condicionamento Pavloviano. No medo condicionado contextual, uma associação entre estímulos neutros polimodais (táteis, olfatórios e espaciais) presentes no contexto e um tipo de evento aversivo, como choques nas patas (estímulo incondicionado), é capaz de gerar o congelamento quando os animais são re-expostos a esse mesmo contexto (AVANZI *et al.*, 2003; KIM; FANSELOW, 1992; SILVA *et al.*, 2002). A duração desse comportamento varia com a intensidade e o número de choques oferecidos (FANSELOW, 2000). Agonistas GABAérgicos e serotoninérgicos reduzem o tempo de congelamento de animais re-expostos ao contexto aversivo (BORELLI *et al.*, 2005; FANSELOW; HELMSTETTER, 1988; SANTOS *et al.*, 2005).

3. Substratos neurais da defesa

Os estados aversivos, os comportamentos defensivos e as alterações fisiológicas que os acompanham estão organizados de maneira integrada no sistema nervoso central (SNC) e apresentam características que parecem persistir ao longo da escala evolutiva (PANKSEEP, 1990). Nesse contexto, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar as estruturas e os mecanismos neurais envolvidos na aquisição de informações aversivas e na expressão de diferentes tipos de comportamentos defensivos.

A técnica de estimulação elétrica de áreas subcorticais permitiu a identificação de algumas estruturas encefálicas relacionadas à organização de respostas defensivas. Os estudos clássicos de Hess e Brüger (1943) e o de Fernandez de Molina e Hunsperger (1959) foram os primeiros a indicar que a estimulação elétrica da região perifornical do hipotálamo e da substância cinzenta periaquedutal de gatos acordados provocava uma seqüência de comportamentos defensivos similares aos apresentados em resposta a situações de perigo ou a estímulos aversivos ambientais. Vários estudos com lesão de tais estruturas são condizentes com esses achados (CANTERAS *et al.*, 1997; LEDOUX *et al.*, 1988; VIANNA *et al.*, 2001; WALKER; DAVIS, 1997). Trabalhos posteriores evidenciaram que várias outras estruturas encefálicas pareciam estar envolvidas na regulação de diferentes aspectos da reação de defesa. Assim, dois importantes sistemas relacionados às bases neuroanatômicas da ansiedade foram propostos: o sistema encefálico aversivo (SEA) (GRAEFF, 1981) e o sistema de inibição comportamental (SIC) (GRAY, 1982).

O SEA seria responsável pela elaboração e coordenação das respostas defensivas incondicionadas nos animais. Foi observado que a ativação de estruturas como o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal, evoca um padrão similar de respostas defensivas. Posteriormente, Brandão e colaboradores (1988, 1994) sugeriram que, além dessas estruturas, o colículo inferior e as camadas profundas do colículo superior também constituiriam o substrato neural da aversão. Anatomicamente, vários experimentos têm demonstrado que o SEA possui um padrão altamente complexo de

interconexões com outras estruturas encefálicas que participam da organização neural do comportamento emocional.

O SEA estabelece contato anátomo-funcional com o tálamo intralaminar, córtex pré-frontal e o sistema septo-hipocampal (SSH) (GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000). O SSH é o principal componente do SIC e é constituído pelo hipocampo, córtex entorrinal, subicular, cíngulo posterior e área septal, além de suas interconexões e vias monoaminérgicas ascendentes que inervam estas estruturas prosencefálicas. Foi sugerido que este sistema teria a função de comparar a síntese dos dados sensoriais que o hipocampo recebe do córtex entorrinal, com as previsões geradas no circuito de Papez. Existindo coerência entre as informações recebidas do ambiente com as previsões geradas no circuito de Papez, o comportamento do animal segue normalmente. Se isto não acontece, o sistema passa a funcionar como controlador, ou seja, ao detectar a discrepância entre o esperado e o ocorrido, desencadeará um quadro de inibição comportamental, dirigindo a atenção do animal para possíveis fontes de perigo.

A ativação deste sistema acontece apenas quando existe conflito entre as tendências de aproximar-se e esquivar-se do perigo. Neste caso, o direcionamento da atenção a estímulos novos ou potencialmente perigosos é aumentado. Quando desencadeada por estímulos novos, a inibição comportamental é acompanhada por uma estratégia de investigação cautelosa (*risk assessment*) (GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000). Sinais inatos e condicionados de perigo também podem desencadear esses comportamentos (GRAY, 1982; GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000). Drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos, promovem a redução deste repertório comportamental em testes de conflito (GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000).

3.1. Hipocampo

A formação hipocampal é um conjunto de estruturas corticais de aspecto alongado que se estende do núcleo septal, rostradorsalmente, para o incipiente lobo temporal, caudoventralmente, e constituindo desta forma um longo eixo referido como septo-temporal ou dorso-ventral. Esta estrutura é formada por seis regiões citoarquiteticamente distintas: o giro denteado (CA₄), o hipocampo propriamente dito, que é dividido em três campos (CA₁, CA₂ e CA₃), o córtex entorrinal, o subículo, pré-subículo e para-subículo, que são algumas vezes agrupados como complexo subicular (AMARAL; WITTER, 2004), (Figura 2A e B). Entre essas regiões, a transmissão de informações acontece de maneira unidirecional. A principal via de entrada para o hipocampo é a via perforante formada pelos axônios, cujos corpos celulares encontram-se nas camadas II e III do córtex entorrinal. Os axônios da via perforante fazem sinapse com os neurônios das células granulares do giro denteado, cujos seus prolongamentos atingem as células piramidais da região CA₃ constituindo as fibras musgosas. Parte dos axônios piramidais da região CA₃ forma as colaterais de Schaffer, as quais fazem sinapse com as células piramidais da região CA₁, cujos axônios enviam a informação para o subículo e para a camada V do córtex entorrinal. Outra parte das células piramidais da região CA₃ envia informação para o hipocampo contralateral, assim como para outras estruturas encefálicas (GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N., 2000).

O hipocampo, embora seja uma estrutura particularmente envolvida em processos associados à aprendizagem, memória e localização espacial (EICHENBAUM, 2004; O'KEEFE, 1978; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004), várias evidências mostraram seu papel modulatório sobre os comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (BANNERMAN *et al.*, 2004; DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008; GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000). Sugere-se que a influência do hipocampo sobre as reações de medo e ansiedade possa ser uma consequência de suas operações mnemônicas, o que leva a crer que a emoção e a aprendizagem são processos neurais integrados e complementares nessa estrutura (GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000). Algumas formas de distúrbios de

ansiedade podem iniciar-se com uma disfunção da aprendizagem, por meio de uma associação negativa exacerbada a um determinado estímulo (DAVIDSON; JARRARD, 2004; MCNAUGHTON, 1997; MCNAUGHTON; WICKENS, 2003).

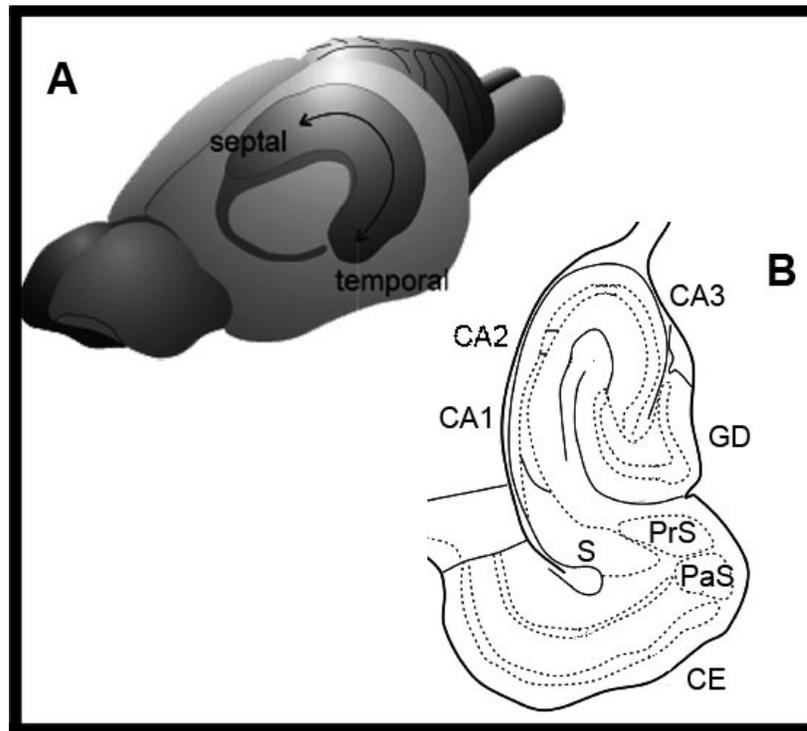


Figura 2. Diagrama representativo da formação hipocampal. (A) Formação hipocampal representada em seu eixo septo-temporal. (B) Corte coronariano representando todas as regiões hipocampais (GD: giro denteado; CA1, CA2 e CA3: hipocampo propriamente dito; S: subículo; PrS: pré-subículo e PaS: para-subículo; CE: córtex entorrinal). Figuras modificadas de Amaral e Witter (2004).

Anatomicamente, vários estudos sugerem que o hipocampo pode ser diferenciado ao longo do seu eixo dorso-ventral (JAY; WITTER, 1991; VERWER *et al.*, 1997). O hipocampo ventral (HV) está conectado com o córtex pré-frontal, núcleo mediano da rafe, amígdala estendida e amígdala basolateral (PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; PITKANEN *et al.*, 2000; SWANSON; COWAN, 1977; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999) e outras áreas subcorticais associadas ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (AMARAL; WITTER, 2004; JACOBSON; SAPOLSKY, 1991). Já o hipocampo dorsal (HD) possui

conexões anatômicas com o córtex entorrinal, septo lateral, hipotálamo, amígdala e núcleo dorsal da rafe (FUCHS *et al.*, 2007; MOSER; MOSER, 1998; RISOLD; SWANSON, 1997, 1996; VERTES, 1991).

Conexões anatômicas distintas acarretam diferenças funcionais ao longo do eixo dorso-ventral do hipocampo (BANNERMAN *et al.*, 2004; MOSER; MOSER, 1998; RISOLD; SWANSON, 1996). Há evidências do envolvimento do HV na modulação de comportamentos relacionados ao medo e ansiedade, e do HD em processos neurais relacionados à memória (BANNERMAN *et al.*, 2004; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARAES, 2006; GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000; KJELSTRUP *et al.*, 2002; NASCIMENTO HACKL; CAROBREZ, 2007; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; PENTKOWSKI *et al.*, 2006). Entretanto, existem algumas contradições envolvendo essa segregação.

Estudos realizados na década de 90 mostraram que a expressão do medo condicionado envolve a participação do HD (KIM; FANSELOW, 1992; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Lesões hipocâmpais realizadas antes (PHILLIPS; LEDOUX, 1992) ou depois do treino (KIM; FANSELOW, 1992) causaram a diminuição do tempo de congelamento de animais re-expostos ao contexto aversivo (MCNISH; GEWIRTZ; DAVIS, 1997). Alguns estudos também mostraram a participação do HD na expressão de respostas inatas de medo por meio de manipulações farmacológicas e técnicas de estimulação elétrica intra-hipocâmpal de animais expostos a modelos animais de ansiedade, como LCE, teste de auto-proteção por enterramento da sonda eletrificada (*shock-probe burying test*), teste de interação social e teste de conflito de Vogel (DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008; FILE; KENNY; CHEETA, 2000). O uso dessas técnicas também possibilitou investigar as influências modulatórias intra-hipocâmpal de vários neurotransmissores, como GABA (MENARD; TREIT, 2001), óxido nítrico (SPOLIDORIO *et al.*, 2007), acetilcolina (GALE; ANAGNOSTARAS; FANSELOW, 2001; SACCHETTI *et al.*, 1999) e serotonina (BORELLI *et al.*, 2005; NETTO; GUIMARAES, 1996), sobre os comportamentos defensivos. Todavia,

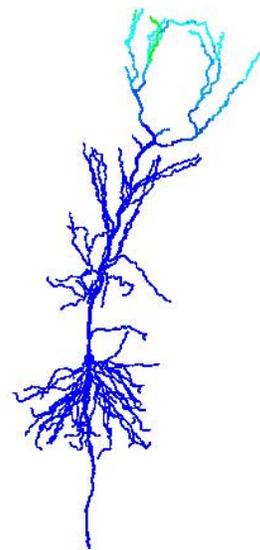
nenhum estudo investigou o envolvimento da substância P hipocampal nesses comportamentos.

4. Substância P

A substância P (SP), a neurocinina (NK) A e B são as principais taquicinas endógenas que agem como neurotransmissores ou neuromoduladores no SNC e periférico. Seus efeitos são mediados pela ativação de três receptores metabotrópicos, o NK₁, NK₂ e NK₃ (HOKFELT; BARTFAI; BLOOM, 2003; MUSSAP; GERAGHTY; BURCHER, 1993; REGOLI *et al.*, 1987). Preferencialmente, a SP apresenta maior afinidade pelos receptores NK₁, porém também pode interagir com os NK₂ e NK₃ (MANTYH, 2002; QUARTARA; MAGGI, 1998). Esse neuropeptídeo participa de vários processos neurais envolvidos na aprendizagem e memória, e na expressão de comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (HASENOHRL *et al.*, 2000; HUSTON; HASENOHRL, 1995).

Vários estudos mostraram a localização dos receptores NK e da própria SP em diversas estruturas (CUELLO; KANAZAWA, 1978; LJUNGDAHL; HOKFELT; NILSSON, 1978; NAKAYA *et al.*, 1994; SHULTS *et al.*, 1984). Neurônios imunorreativos para SP, provenientes do septo medial (BORHEGYI; LERANTH, 1997; PETERSON; SHURLOW, 1992), e receptores neurocininérgicos foram encontrados na formação hipocampal (MAENO; KIYAMA; TOHYAMA, 1993; OTSUKA; YOSHIOKA, 1993; QUARTARA; MAGGI, 1998; SAFFROY *et al.*, 2003). Estudos mostraram que esses receptores estão presentes em interneurônios GABAérgicos hipocampais (ACSADY *et al.*, 1997; SLOVITER *et al.*, 2001), e que a SP aumenta a excitabilidade celular desta região (KOUZNETSOVA; NISTRIL, 1998; OGIER; RAGGENBASS, 2003). No núcleo dorsal da rafe (NDR), uma das principais fontes serotoninérgicas do SNC (TORK, 1990), também foram encontrados receptores NK₁ (SARIA, 1999). Injeções intra-NDR de antagonistas NK₁ promoveram o aumento do disparo dos neurônios serotoninérgicos dessa região (GOBBI; BLIER, 2005).

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor envolvido na modulação de funções cognitivas, afetivas e neuroendócrinas (TORK, 1990). Muitos estudos mostraram a participação deste neurotransmissor na modulação de respostas comportamentais relacionadas ao medo e ansiedade (BUWALDA *et al.*, 2005; KECK *et al.*, 2005) (ver referencia). Especificamente no hipocampo, a participação serotoninérgica na expressão de respostas inatas e condicionadas de medo tem sido investigada (FILE; GONZALEZ, 1996; KOSTOWSKI; PLAZNIK; STEFANSKI, 1989; LI *et al.*, 2006; NETTO; GUIMARAES, 1996; SILVA; BRANDAO, 2000; SILVA *et al.*, 2002; SILVA; GARGARO; BRANDAO, 2004; STEFANSKI *et al.*, 1993). Diante de evidências da interação entre o sistema neurocininérgico e serotoninérgico no NDR, o presente estudo investigou a possível interação entre estes dois sistemas no hipocampo de ratos por meio da técnica de microdiálise *in vivo*. Além disso, investigou a participação da SP hipocampal na expressão de respostas inatas e condicionadas de medo em modelos animais de ansiedade.

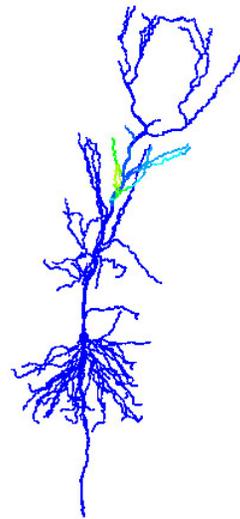


Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da SP nas regiões dorsal e ventral do hipocampo sobre a expressão de respostas inatas e condicionadas de medo e sua interação com o sistema serotoninérgico. Os objetivos específicos do trabalho foram:

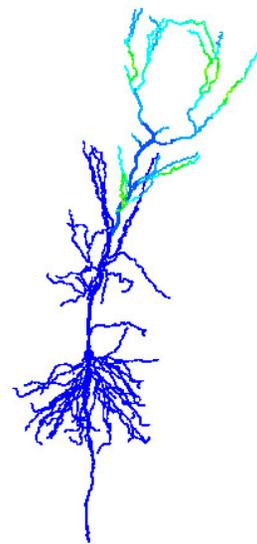
- Testar a hipótese do envolvimento diferencial de mecanismos neurocinérgicos no HD e HV na expressão de respostas inatas de medo no LCE e arena.
- Investigar a hipótese da participação diferencial da SP no HD e HV sobre a expressão de respostas condicionadas de medo no modelo de medo contextual.
- Verificar a hipótese de que a SP no HD promove seus efeitos pela interação com mecanismos serotoninérgicos por meio da técnica de microdiálise *in vivo*.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Experimento I

*Avaliação do comportamento exploratório de ratos no
labirinto em cruz elevado e campo aberto*



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, com peso médio de 290-300 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo - *Campus* Ribeirão Preto, agrupados (6 animais por caixa) em gaiolas de polipropileno (32 x 42 x 18 cm), forradas com maravalha, com livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia com temperatura controlada (23 ± 1 °C) e um ciclo claro/escuro (12 x 12 h), com início do período claro às 7:00 horas.

2. Cirurgia

Após 48 horas, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, SIGMA, USA) por via intraperitoneal. Após a tricotomia, foram fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, USA). A barra do incisor foi fixada a 3,3 mm de forma que o lâmbda e o bregma ficassem em um mesmo plano horizontal. Para o estudo comportamental apenas uma cânula-guia, de 15 mm de comprimento, foi implantada no HD ou HV alternando sua posição entre os hemisférios direito e esquerdo. Considerando o bregma como ponto de referência, as coordenadas foram utilizadas com base no Atlas Paxinos e Watson (2005): DH: AP = - 4,2 mm; ML = \pm 2,6; DV = - 2,8; e VH: AP = - 4,8 mm; ML = \pm 5,0 mm; DV = - 5,0 mm. A cânula-guia foi fixada no crânio do animal por meio de uma resina acrílica (JET, Brasil) e dois parafusos, e selada com um fio de aço inoxidável para protegê-la de obstrução. Esse fio só foi retirado no momento da sessão experimental.

Após o procedimento cirúrgico, o animal foi tratado com duas soluções de uso veterinário, um antibiótico de largo espectro (0,566 mg/ mL, Fort-Dodge, Brasil) administrado por via intramuscular, e um analgésico (0,125 mg/ mL, Banamine, Schering-Plough Veterinária, Brasil) por via subcutânea ambas na dose de 1 mL/ Kg. Os animais retornaram para o biotério onde permaneceram por cinco dias para a recuperação cirúrgica.

3. Droga

SP (Peninsula Laboratories, USA) foi diluída em solução tampão fosfato 0,1 M (PBS), pH = 7,4. Todo material plástico utilizado para preparo das soluções foi previamente lavado com ácido acético 0,1 M e seco com a finalidade de evitar a interação com a SP. As soluções foram preparadas nas concentrações de 10 ng, 100 ng e 1000 ng/ 0,5 µL e mantidas em pequenas alíquotas a - 70° C. Cada alíquota foi descongelada imediatamente antes da sessão experimental. Animais do grupo controle foram tratados com PBS.

4. Microinjeções de drogas

Os animais receberam uma injeção intra-HD ou HV de veículo ou SP, através de uma agulha odontológica 30 G (16 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo) introduzida na cânula e ultrapassando-a em 1 mm. A agulha para injeção foi conectada a uma seringa Hamilton, de 5 µL, por meio de um tubo de polietileno (PE-10). Um volume de 0,5 µL foi injetado durante 30 s, por meio de uma bomba de microinfusão (Harvard, USA), e a agulha mantida no lugar por 20 s adicionais para evitar refluxo da solução. O deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno foi utilizado para monitorar a microinjeção e, imediatamente após o procedimento, os animais foram colocados no aparato experimental para o registro das respostas comportamentais.

5. Equipamentos

5.1. Labirinto em cruz elevado: consiste em um aparelho elevado 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50 x 10 cm) dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes de madeira, desprovidos de teto (50 x 10 x 40 cm), formando um ângulo de 90 graus. Sua área central é de 10 x 10 cm. Ao redor dos braços abertos foram acopladas lâminas acrílicas (1 cm de altura). O LCE foi mantido no interior de uma sala

iluminada artificialmente por luz incandescente (30 lux no centro do aparato), onde havia uma câmara de vídeo que registrava os movimentos dos animais durante o tempo de experimento. A imagem gravada em fita de vídeo foi analisada posteriormente através de um programa de observação comportamental (OBSERVER, Noldus Inf. Co.; Wageningen, Netherlands).

5.2. Campo aberto: trata-se de uma arena circular de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, encapada com um papel preto impermeável (Figura 3). Esse aparato foi mantido numa sala isolada e iluminada com uma lâmpada incandescente (9 lux no centro do aparato). Todas as sessões foram gravadas e analisadas com o ANY-maze software (Stoeling Co., Illinois, USA).

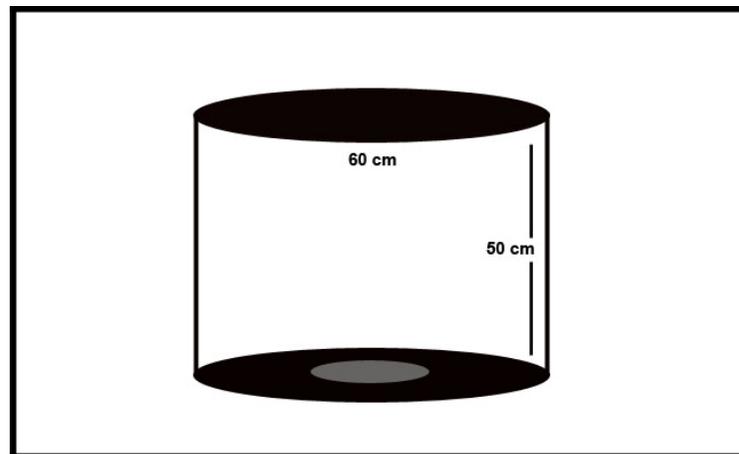


Figura 3. Desenho esquemático mostrando o campo aberto.

6. Procedimento Experimental

Antes de ser exposto ao aparato, cada animal foi colocado numa caixa forrada com papel onde recebeu a microinjeção intra-HD ou HV de PBS 0,1 M ou SP 10, 100, 1000 ng/

0,5 µL. Antes da exposição de cada animal, os modelos comportamentais foram limpos com álcool 20%.

6.1. Labirinto em cruz elevado: imediatamente após a microinjeção da droga, o animal foi colocado na área central do LCE com a cabeça direcionada para um dos braços fechados, onde foi permitida sua movimentação por 5 minutos. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 12:00 h.

As seguintes medidas foram avaliadas: 1) números de entradas nos braços abertos e fechados; 2) tempo de permanência nos braços; 3) levantamento (*rearing*; RR): postura bípede na qual o rato se apóia com as duas patas posteriores no assoalho do LCE ficando completamente ereto ou arqueado; 4) farejar (*scanning*; SC); 5) mergulho da cabeça (*head-dipping*; HDP): movimento exploratório de cabeça/ombros nas laterais do labirinto em direção ao precipício; 6) exploração da extremidade aberta (*end-arm exploration*; EAE): o animal alcança a extremidade do braço aberto e mergulha da cabeça; 7) espreitamento (*peeping out*; POUT): projeções da cabeça/ombros dos braços fechados para o centro, sendo que as quatro patas permanecem no braço fechado; 8) Esticamento (*stretched attend posture*; SAP): uma postura exploratória na qual o animal estica-se e se contrai à posição original, sem se locomover para frente; 9) rastejamento (*flat back approach*; FBA): locomoção exploratória onde o animal estica-se totalmente e cuidadosamente move-se para frente.

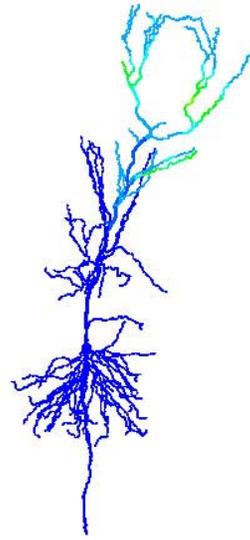
6.2. Campo aberto: imediatamente após o tratamento, cada animal foi colocado no centro do campo aberto por 30 minutos. Os experimentos foram realizados entre 9:00 e 16:00 h. As seguintes medidas foram analisadas: 1) frequência de levantamentos: comportamento idêntico ao observado no LCE; 2) tempo de imobilidade: ausência de movimentos e 3) porcentagem de tempo de permanência e entradas no centro do aparato.

7. Histologia

Ao final de cada experimento, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/kg, i.p., VETEC, Brasil) e perfundidos intraventricularmente com solução salina (0,9%) seguida de formalina a 4%. O sítio de microinjeção foi marcado com Vermelho Neutro (0,2 µl) injetado durante 1 min. Os encéfalos foram retirados e mantidos por, pelo menos, 48 horas na solução de formalina a 4% e, posteriormente, foram seccionados (60 µm) no criostato (CM 1800, Leica, Alemanha). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e corados através da técnica de Nissl. A análise histológica para a localização do sítio de microinjeção foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus, BX50, USA) tendo como referência o atlas de Paxinos e Watson (2005).

8. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média + EPM. Os valores referentes às medidas comportamentais dos ratos no LCE e campo aberto após o tratamento (PBS, SP 10, 100 ou 1000 ng/ 0,5 µL) foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Um valor de *p* igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Resultados

9.1. Sítios de microinjeção

A análise histológica indicou que os sítios de injeção estavam situados no HD e HV dos animais utilizados nesse estudo. A Figura 4 ilustra as fotomicrografias representativas dos trajetos da agulha de microinjeção e os sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas Paxinos e Watson (2005).

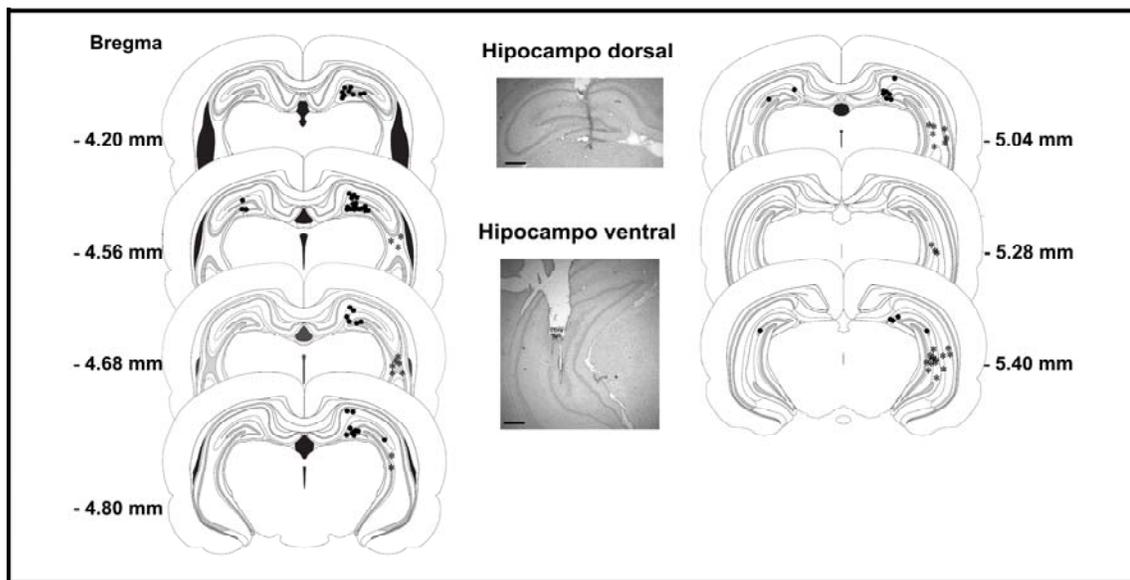


Figura 4. Fotomicrografias dos trajetos da agulha de injeção no hipocampo dorsal e ventral e diagramas dos sítios de injeção no HD (ponto) e HV (asterisco) tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2005). O número de pontos representados é menor que o número de ratos utilizados devido à sobreposição de pontos. Barra com escala de 500 μm .

9.2. Efeitos da injeção de SP no HD e HV sobre o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado.

Hipocampo Dorsal

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo dos tratamentos sobre o número de entradas nos braços abertos ($F(3, 24) = 5,12; p < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou um aumento da frequência de entradas nos braços abertos nos grupos tratados com SP 100 ng e 1000 ng comparado ao PBS. Considerando os braços fechados, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($F(3, 24) = 0,85; p > 0,05$) (Figura 5A). Foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos na porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos ($F(3, 24) = 4,29$ e $9,49; p < 0,05$ em ambos os casos, respectivamente). A análise *post-hoc* mostrou um aumento significativo nessas medidas nos grupos tratados com SP 100 ng e 1000 ng comparado com o PBS (Figura 6A).

A Tabela 1 mostra um efeito significativo da SP sobre a frequência de *head-dipping* ($F(3, 24) = 3,40; p < 0,05$) e *end-arm exploration* ($F(3, 24) = 4,72; p < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que os grupos tratados com SP 100 ng e 1000 ng foram responsáveis pelo aumento desses comportamentos no LCE. Por outro lado, esses tratamentos não alteraram significativamente o *stretched attend posture* ($F(3, 24) = 0,73; p < 0,05$), *scanning* ($F(3, 24) = 0,98; p < 0,05$), *flat back approach* ($F(3, 24) = 0,17; p < 0,05$), *peeping out* ($F(3, 24) = 1,26; p < 0,05$) e *rearing* ($F(3, 24) = 15,61; p < 0,05$).

Hipocampo Ventral

A ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito significativo no número de entradas nos braços abertos e fechados ($F(3, 27) = 1,12$ e $0,71; p > 0,05$, respectivamente), (Figura 5B). Igualmente, não houve diferença significativa entre os tratamentos considerando a porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos ($F(3, 27) = 0,43$ e $0,91; p > 0,05$, respectivamente), (Figura 6B). Da mesma forma, não houve diferença significativa nas seguintes categorias comportamentais: *stretched attend posture*

($F(3, 27) = 1,58$; $p > 0,05$), *scanning* ($F(3, 27) = 0,26$; $p > 0,05$), *flat back approach* ($F(3, 27) = 0,57$; $p > 0,05$), *peeping out* ($F(3, 27) = 0,48$; $p > 0,05$), *head-dipping* ($F(3, 27) = 0,15$; $p > 0,05$), *end-arm exploration* ($F(3, 27) = 1,08$; $p > 0,05$) e *rearing* ($F(3, 27) = 0,30$; $p > 0,05$) (Tabela 1).

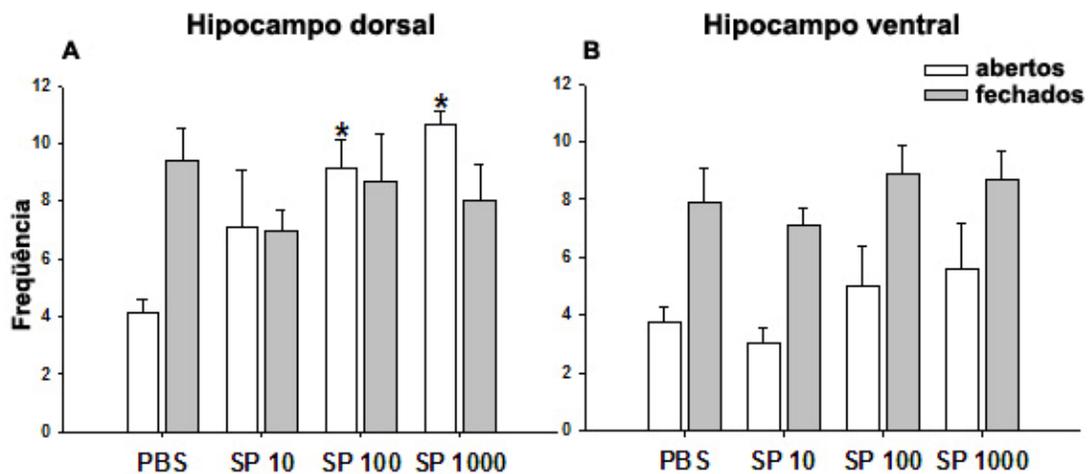


Figura 5. Efeitos da microinjeção de substância P (SP, 10, 100, 1000 ng/ 0,5 μ L) intra-hipocampo dorsal (A) e ventral (B) sobre a frequência de entradas nos braços abertos e fechados do LCE. PBS (salina tamponada 0,1 M) e SP 10 ng ($n = 8$ para HD e HV), SP 100 ng ($n = 6$ e 8 para HD e HV, respectivamente), e SP 1000 ng ($n = 6$ e 7 para HD e HV, respectivamente). Os dados são apresentados como médias + EPM. * $p \leq 0,05$, comparado ao controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

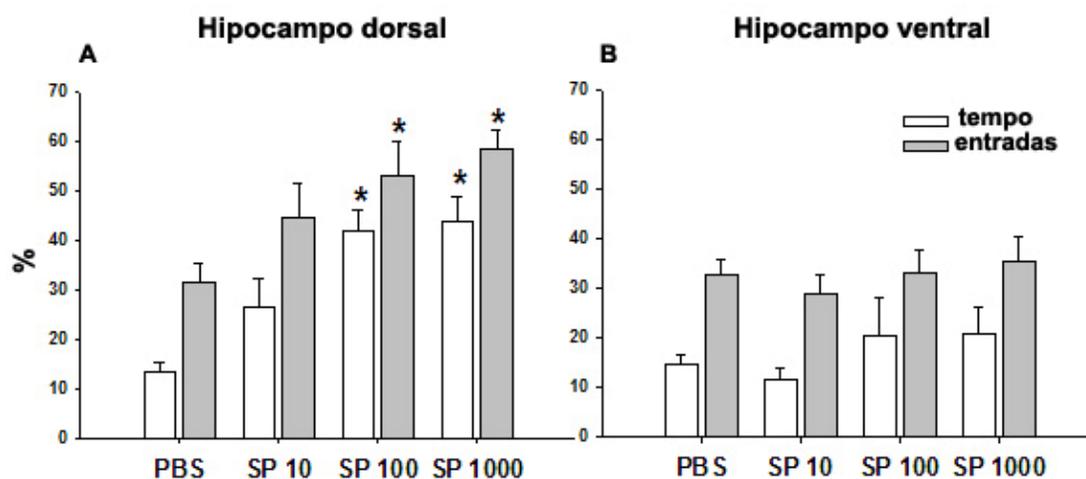


Figura 6. Efeitos da microinjeção de substância P (SP, 10, 100, 1000 ng/ 0,5 μ L) intra-hipocampo dorsal (A) e ventral (B) sobre a porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE em relação ao total. PBS (salina tamponada 0,1 M) e SP 10 ng (n = 8 para HD e HV), SP 100 ng (n = 6 e 8 para HD e HV, respectivamente), e SP 1000 ng (n = 6 e 7 para HD e HV, respectivamente). Os dados são apresentados como médias + EPM. * $p \leq 0,05$, comparado ao controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Hipocampo Dorsal							
	SC	FBA	SAP	EAE	HDP	POUT	RR
PBS	14.50±1.04	2.00±0.42	1.63±0.38	2.50±0.46	9.38±1.10	1.38±0.42	12.25±1.35
SP 10	13.63±1.83	1.75±0.53	2.38±0.46	5.63±1.74	17.50±4.68	0.50±0.27	10.00±1.52
SP 100	13.33±1.36	2.17±0.70	2.33±0.33	7.33±0.80*	22.00±3.69*	0.67±0.21	8.67±1.28
SP 1000	16.67±1.17	1.67±0.49	2.50±0.72	8.33±1.09*	23.67±3.49*	0.67±0.49	10.67±2.53
Hipocampo Ventral							
	SC	FBA	SAP	EAE	HDP	POUT	RR
PBS	13.75±1.51	2.38±0.73	3.00±0.78	2.00±0.46	10.25±0.98	2.50±0.50	11.38±2.06
SP 10	12.75±1.19	3.50±0.65	4.13±0.79	1.88±0.52	10.38±1.53	2.88±0.55	10.75±1.22
SP 100	12.25±1.05	2.50±0.73	1.75±0.56	3.88±1.48	11.25±2.17	2.63±0.68	12.88±1.08
SP 1000	12.71±1.19	3.29±0.89	2.86±1.01	4.14±1.74	11.86±2.69	1.86±0.70	12.29±1.19

Tabela 1. Efeitos da substância P (SP, 10, 100 e 1000 ng/ 0,5 µL) no hipocampo dorsal e ventral sobre as medidas etológicas “novas” no LCE. PBS (salina tamponada 0,1M) e SP 10 ng (n = 8 para HD e HV), SP 100 ng (n = 6 e 8 para HD e HV, respectivamente), e SP 1000 ng (n = 6 e 7 para HD e HV, respectivamente). SC: *scanning*, HD: *head-dipping*, EAE: *end-arm exploration*, RR: *rearing*, POUT: *peeping-out*, SAP: *stretched-attend posture* e FBA: *flat-back approach*. Os números representam as médias ± EPM. * $p \leq 0,05$, comparado ao controle, seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

9.3. Efeitos da SP no HD e HV sobre o comportamento exploratório de ratos no campo aberto.

Os dados foram divididos em três blocos de tempo (em minutos): 1-10, 11-20 e 21-30.

Hipocampo Dorsal

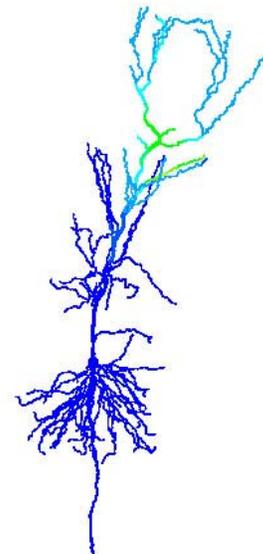
A ANOVA de uma via mostrou um aumento significativo na porcentagem de entradas no centro do campo aberto durante os primeiros 10 minutos ($F(3, 27) = 3,22; p < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que a SP 100 ng foi responsável pelo aumento desse comportamento. Contudo, não houve efeito significativo nos blocos de 20 e 30 minutos ($F(3, 27) = 1,46$ e $0,47; p > 0,05$, respectivamente). A mesma análise mostrou que não houve diferença significativa na porcentagem de tempo no centro do aparato ($F(3, 27) = 0,15, 1,0$ e $0,95; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente), levantamento ($F(3, 27) = 0,83, 1,48$ e $0,32; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente) e tempo de imobilidade ($F(3, 27) = 1,14, 0,20$ e $2,02; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente), (Tabela 2).

Hipocampo Ventral

A ANOVA de uma via mostrou uma diminuição do tempo de imobilidade durante os primeiros 10 minutos ($F(3, 29) = 3,41; p < 0,05$). A análise *post-hoc* mostrou que as doses de 100 ng e 1000 ng foram responsáveis por essa alteração do comportamento. Por outro lado, não houve diferença significativa nos blocos 20 e 30 minutos ($F(3, 29) = 0,56$ e $0,28; p > 0,05$, respectivamente). Igualmente, não houve efeito significativo sobre o levantamento ($F(3, 29) = 0,89, 0,76$ e $0,67; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente), porcentagem de frequência ($F(3, 29) = 0,43, 0,62$ e $1,47; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente) e de tempo no centro do aparato ($F(3, 29) = 1,57, 1,58$ e $0,47; p > 0,05$, em todos os casos, respectivamente), (Tabela 2).

Blocos	Tratamento	Imobilidade		Levantamento		% Entradas no centro		% Tempo no centro	
		DH	VH	DH	VH	DH	VH	DH	VH
10	PBS	16.91±6.38	97.41±29.44	27.25±3.05	20.78±4.29	45.66±2.24	42.78±5.58	6.88±2.46	1.27±0.36
	SP 10	26.31±6.31	31.5±10.73	21.71±2.38	27.37±5.66	49.12±1.52	49.87±1.86	7.86±3.06	2.41±0.57
	SP 100	20.08±4.65	22.01±9.51*	22.75±3.65	22.22±2.62	53.5±2.07 *	46.63±2.22	6.07±2.42	2.83±0.85
	SP 1000	11.86±4.43	36.53±17.58*	28.75±4.98	32.00±0.48	48.48±1.26	44.24±9.24	4.55±1.60	1.50±0.41
20	PBS	27.08±13.91	172.66±49.25	13.12±2.13	4.22±1.58	41.94±9.52	16.67±8.33	4.11±1.70	0.49±0.35
	SP 10	77.16±35.82	105.01±30.73	3.57±1.04	4.37±1.72	34.69±9.09	37.50±12.50	3.55±1.66	1.12±0.59
	SP 100	78.34±18.86	110.75±30.45	3.75±1.21	3.56±1.19	29.60±8.70	25.00±12.11	11.53±6.76	0.73±0.41
	SP 1000	66.44±27.11	138.3±57.34	8.00±2.39	7.43±3.07	51.25±1.63	24.21±11.24	1.75±0.85	0.40±0.23
30	PBS	69.18±18.27	262.72±55.27	5.00±1.31	4.11±2.50	45.00±11.50	11.11±7.35	1.98±1.20	0.48±0.32
	SP 10	188.44±55.49	285.31±73.54	5.00±3.53	2.00±1.02	28.57±10.10	20.83±10.33	0.58±0.24	0.27±0.16
	SP 100	120.61±34.49	210.78±53.51	4.00±1.20	1.11±0.48	40.62±13.12	6.25±5.59	12.37±10.53	0.13±0.13
	SP 1000	144.81±24.69	239.67±63.19	2.75±0.88	2.86±1.58	31.25±9.15	28.57±9.63	0.59±0.31	0.21±0.09

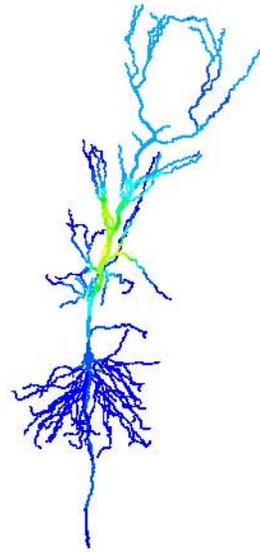
Tabela 2: Efeitos da substância P (SP, 10, 100 e 1000 ng/ 0,5 µL) no hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV) sobre a atividade exploratória medida no teste do campo aberto por três blocos de 10 minutos cada (n = 8, em todos os grupos). Os números representam as médias ± EPM. * p < 0,05, comparado ao controle (PBS, salina tamponada 0,1 M), seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Experimento II

Avaliação do medo condicionado contextual de ratos



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Material e Métodos

O material e métodos utilizados neste estudo foram iguais ao do experimento I, exceto o modelo experimental e análise estatística.

1. Equipamentos

1.1. Caixa de condicionamento contextual aversivo: o paradigma de condicionamento contextual aversivo é o pareamento de choques elétricos nas patas no ambiente da caixa experimental. Para isso, foi utilizada uma caixa de esquiwa (30 x 48 x 25 cm) de acrílico preto, exceto o teto e a parede frontal constituídos por acrílico transparente. O piso da caixa contém 36 barras de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro, espaçadas 1 cm uma das outras. Este ambiente foi denominado “mesmo contexto”. Associada à caixa existe uma fonte de choque AC (Albarsh Instruments, Brasil) com regulador de intensidade que permite a apresentação dos choques elétricos nas patas dos animais. As apresentações dos choques foram controladas por um microprocessador e uma placa I/O (Insight Equipamentos, Brasil). Essa caixa está inserida em uma câmera de atenuação acústica feita de compensado de madeira e revestida de Eucatex. Possui uma lâmpada vermelha de 15 W em seu interior, um sistema de ruído de fundo de 70 dB e uma janela (15,5 x 15,5 cm) na porta que permite a visualização dos animais (Figura 7A).

1.2. Contexto diferente: Uma caixa de acrílico transparente (45 x 20 x 30 cm) foi utilizada como “contexto diferente” (Figura 7B). O assoalho desta caixa, com o qual o animal teve contato direto, foi coberto com papéis-toalha.

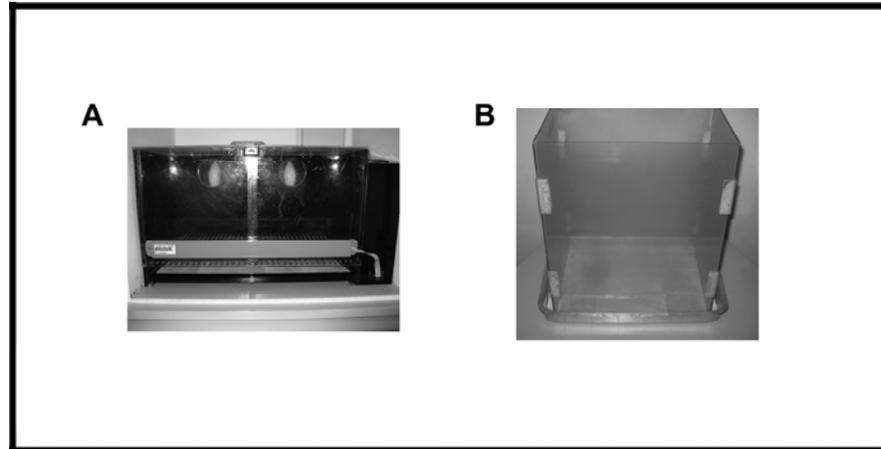


Figura 7. Fotografias das caixas de condicionamento contextual aversivo (A) e acrílico utilizada como contexto diferente (B).

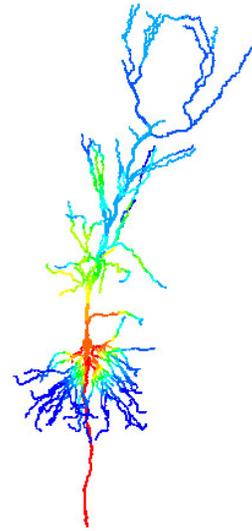
2. Procedimento experimental

Treino: após 8 minutos de habituação no interior da caixa, cada animal recebeu 10 choques nas patas (0.6 mA), com duração de 1 s e intervalos variáveis entre 15 e 45 s. Depois da apresentação do último choque, cada animal permaneceu na caixa por mais 2 min. Cada sessão treino teve duração de 15 min.

Teste: após 24 horas, cada animal recebeu o tratamento intra-hipocampal similarmente ao Experimento I, com exceção da dose de 10 ng/ 0,5 μ L e, imediatamente foram expostos ao contexto aversivo (mc) ou contexto diferente (cd). A sessão teste foi conduzida sem a apresentação dos choques nas patas. O critério utilizado para avaliar o medo contextual foi o tempo de congelamento durante um período de 8 minutos. O congelamento foi definido como a ausência total de movimentos do animal, com exceção da respiração, acompanhado por arqueamento do dorso, retração das orelhas, piloereção e exoftalmia (AVANZI *et al.*, 1998; MARTINEZ; RIBEIRO DE OLIVEIRA; BRANDAO, 2007).

3. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média + EPM. Os valores referentes ao tempo de congelamento contextual foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando tratamento (PBS, SP 10, 100 e 1000 ng/ 0,5 μ L) e contexto (mc ou cd) como fatores. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Um valor de p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Resultados

4.1. Sítios de microinjeção

A análise histológica indicou que os sítios de injeção estavam situados no HD e HV dos animais utilizados nesse estudo. A Figura 8 ilustra as fotomicrografias representativas dos trajetos da agulha de injeção e os sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas Paxinos e Watson (2005).

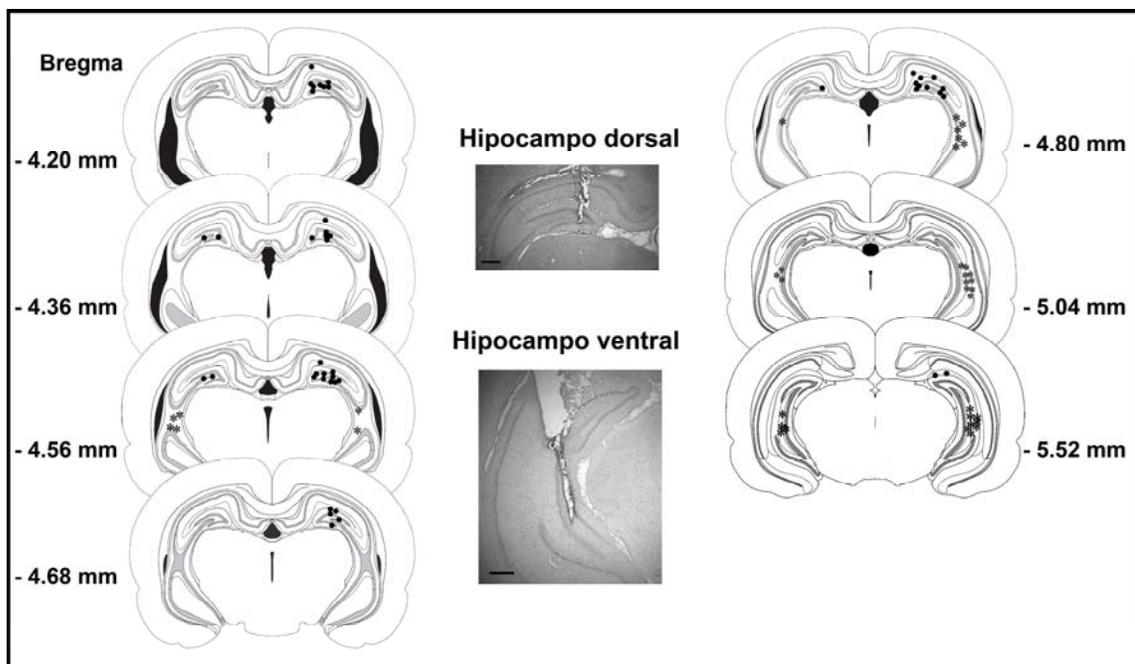


Figura 8. Fotomicrografias dos trajetos da agulha de injeção no hipocampo dorsal e ventral e diagramas dos sítios de injeção no HD (ponto) e HV (asterisco) tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2005). O número de pontos representados é menor que o número de ratos utilizados devido à sobreposição de pontos. Barra com escala de 500 μ m.

4.2. Efeitos da SP no HD e HV sobre a expressão das respostas condicionadas de medo.

Hipocampo Dorsal

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo nos fatores tratamentos ($F(2, 53) = 3,33, p < 0,05$), contexto ($F(1, 53) = 52,23, p < 0,05$) e interação tratamentos *versus* contexto ($F(2, 53) = 4,38, p < 0,05$). A SP 100 e 1000 ng/ 0,5 μ L reduziu o tempo de congelamento de animais expostos ao mesmo contexto quando comparados aos controles (Figura 9A).

Hipocampo Ventral

Houve um efeito significativo no fator contexto ($F(1, 51) = 144,49, p > 0,05$], porém nenhum efeito significativo foi observado nos fatores tratamentos ($F = (2, 51) = 1,98, p > 0,05$] e interação tratamentos *versus* contexto ($F(2, 51) = 0,21, p > 0,05$), (Figura 9B).

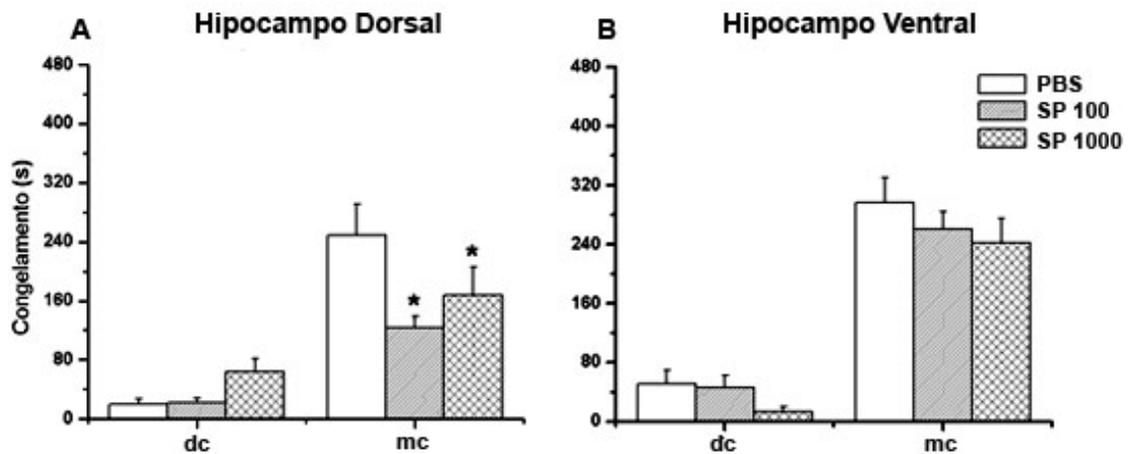
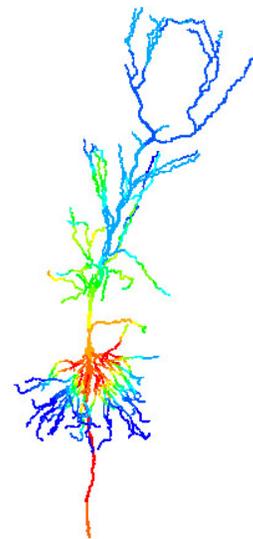


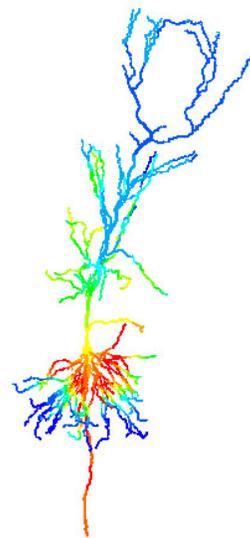
Figura 9. Efeitos da microinjeção de substância P (SP, 100 e 1000 ng/ 0,5 μ L) intra-hipocampo dorsal (A) e ventral (B) sobre o tempo de congelamento expresso por ratos expostos no mesmo (mc) ou diferente contexto (dc) que receberam choques nas patas 24 horas antes. $n =$ (HD: mc: PBS = 9, SP 100 e 1000 = 10; dc: 10 para todos os grupos) e (HV: mc: PBS = 8, SP 100 e 1000 = 10; dc: PBS e SP 1000 = 10 e SP 100 = 9). Os dados são apresentados como médias + EPM. * $p \leq 0,05$, comparado ao controle, de acordo com o teste de Newman-Keuls.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Experimento III

*Avaliação dos níveis extracelulares de serotonina no
hipocampo dorsal de ratos após a microinjeção de
substância P*



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Material e Métodos

O material e métodos utilizados neste estudo foram iguais ao do experimento I, exceto o procedimento e análise estatística.

1. Cirurgia

O procedimento cirúrgico foi idêntico ao descrito no Experimento I diferenciando apenas o número e tipo de cânulas-guia implantadas. Duas cânulas-guia foram implantadas, unilateralmente, no HD de cada animal com variação entre os hemisférios direito e esquerdo, sendo uma destinada à microinjeção da droga (15 mm de comprimento; AP = - 4,2 mm; ML = \pm 1,4 mm e DV = - 2,8 mm com um ângulo de 18°), e outra, à sonda de diálise (20 mm de comprimento; AP = - 4,5; ML = \pm 3,8; e DV = - 2,8 mm).

2. Equipamentos

2.1. Cromatografia Líquida de Alta Pressão: o sistema de cromatografia é constituído por um detector eletroquímico (Bioanalytical Systems, Inc, EUA), acoplado a uma coluna de fase-reversa (EC 125/2 Nucleosil 120-5 C18; 125 x 2 mm, Machery-Nagel, Alemanha) e a uma bomba de baixa pulsação (PM-80, BAS). A sensibilidade fixada para o detector eletroquímico foi de 1.0 nA e o potencial de oxidação utilizado foi de 750 mV frente ao eletrodo de referência Ag⁺/AgCl. O fluxo da fase móvel foi de 250 μ l/min e sua composição foi a seguinte (para o volume de 1 L): 172 mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado (MERCK, Alemanha), 1 mM de EDTA (SIGMA, USA), 0,78 mM de octil-sulfato (SIGMA, USA), 10 mM de cloreto de sódio (MERCK, Alemanha), 0,125 % de dietilamina (MERCK, Alemanha) e 3 % de metanol (JTBaker, USA) com pH: 3.5 (valor corrigido com ácido orto-fosfórico – MERCK, Alemanha). O sistema de HPLC é integrado a um computador que possui um programa de aquisição de dados (ChromGraph™ Control-BAS, USA), pelo qual as amostras foram quantificadas.

2.1.1. Preparo das soluções padrão: a curva de calibração do sistema de HPLC foi feita com duas soluções de concentrações distintas (80 e 40 pg/ 50µl) de 5-HT e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (SIGMA, USA). O padrão interno utilizado foi o 3,4-Dihidroxibenzilamina hidrobrometo (DHBA – SIGMA, USA). Essas soluções foram injetadas no sistema de HPLC e a calibração foi baseada na análise de cada uma das soluções com o auxílio de um programa de computador (ChromGraph™ Report-BAS, USA).

3. Sondas de diálise

As sondas de microdiálise de formato concêntrico foram confeccionadas de acordo com o procedimento padrão desenvolvido por Adams, Schwarting *et al.* (1991), (Figura 10).

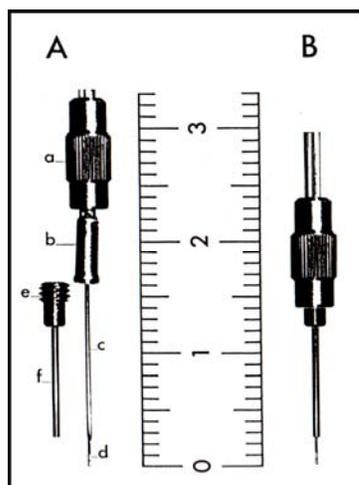


Figura 10. (A) Ilustração dos componentes de uma sonda de diálise e cânula-guia. (a) rosca de metal (fixa a sonda de diálise à cânula-guia); (b) bocal (permite que a cânula de metal (c) não ultrapasse a cânula-guia); (c) cânula de metal inoxidável 28 G; (d) membrana de diálise; (e) rosca na parte superior da cânula-guia, onde atarraxa-se a rosca de metal; (f) cânula-guia de metal 22G. (B) Sonda de diálise inserida na cânula-guia. Escala em cm. Figura extraída da tese de doutorado de Maria Angélica de Souza Silva (1998).

3.1 Preparo

As sondas foram preparadas a partir dos seguintes componentes: tubo de PVC (diâmetro interno de 0,51 mm e externo de 1,56 mm), tubo de PVC (diâmetro interno 0,61 mm e externo 0,28 mm), cânula de aço inoxidável (20 mm de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e externo de 0,46 mm), membrana de diálise de celulose regenerada (Cuprophan, AKZO Nobel, Alemanha), tubo de sílica fundida (diâmetro interno 0,75 mm e externo 0,15 mm, TSP075150, Cluzeau Info Labo, França), cola epóxi líquida, cola Super Bonder, rosca e bocal.

Para a preparação das sondas, um segmento da membrana de diálise foi fixado com cola epóxi ao tubo de aço inoxidável. Em seguida, a extremidade da membrana foi fechada com cola epóxi numa extensão de 0,3 mm, deixando 2 mm de membrana exposta. Numa próxima etapa, os tubos de PVC foram cortados em extensão de 40 cm e o tubo de sílica fundida numa extensão de 43 cm. O tubo de sílica foi inserido no tubo de PVC (maior) por um orifício na parede do mesmo, passando por dentro deste por uma distância de 15 cm até sair na extremidade. Em seguida, a parte exposta do tubo de sílica foi introduzida no tubo de PVC menor, deixando exposta uma extensão de 2 cm na extremidade. Os três tubos foram fixados um ao outro com cola epóxi no ponto de inserção do tubo de sílica no de PVC. Na etapa final, a rosca e o bocal foram colocados e o tubo de sílica foi introduzido no conjunto de metal e membrana de microdiálise posicionando a extremidade do tubo de sílica no terço distal da extensão da membrana de microdiálise. O tubo de metal foi fixado com cola epóxi ao tubo de PVC. Em seguida, o bocal foi ajustado de forma que a extensão do tubo de metal correspondente ao tamanho da cânula guia, e fixado com cola Super Bonder (SOUZA SILVA, 1998).

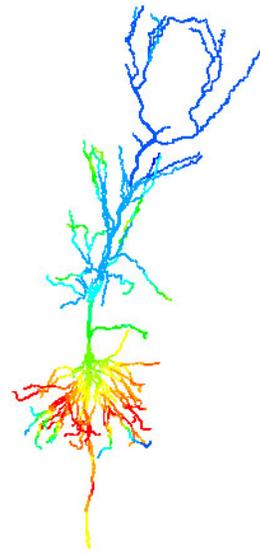
4. Procedimento Experimental

Cada animal foi conduzido até a sala experimental (60 lux) para implantação da sonda de microdialise. Esta foi preenchida com solução de Ringer (CaCl_2 12 mM, NaCl 1450 mM, KCl 27 mM, MgCl_2 10 mM, solução tampão fosfato 200 mM; pH: 7.4) e avaliada quanto a sua integridade. Os tubos da sonda de microdialise foram conectados a um rotor com canal para passagem de líquido montado em um braço móvel e acoplado em uma bomba de microinjeção (MD-1001, BAS, USA). O fluxo definido foi de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Durante o experimento, se o volume do dialisado não correspondesse ao volume injetado, o experimento era interrompido e a sonda trocada apenas por uma vez.

O animal foi colocado numa caixa de acrílico transparente (30 x 35 x 20 cm) com maravalha no assoalho e livre acesso à água e alimento. Os experimentos foram feitos durante o período das 9:00 às 16:00 horas. Após a implantação da sonda no encéfalo, aguardou-se duas horas para iniciarem as coletas. As amostras foram coletadas manualmente em tubos de coleta contendo 10 μL de DHBA a cada 40 minutos e injetadas imediatamente no sistema de HPLC. Após a determinação da linha de base, os animais receberam os mesmos tratamentos do Experimento I seguindo o mesmo procedimento. Após a microinjeção, as amostras foram coletadas durante 240 minutos.

5. Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm SEM da porcentagem do valor basal (média de três amostras consecutivas (consideradas como 100%) obtidas antes do tratamento). Os valores foram analisados através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas considerando tratamentos (PBS, SP 10, SP 100, SP 1000 ng/ 0,5 μl) e tempo (-80 a 240 min) como fatores. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Um valor de *p* igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Resultados

6.1. Sítios de microinjeção

A análise histológica indicou que os sítios de injeção e a posição das sondas de microdiálise estavam situados no HD dos animais utilizados nesse estudo. A Figura 11 ilustra a fotomicrografia representativa dos trajetos da agulha de injeção e da sonda e os sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas Paxinos e Watson (2005).

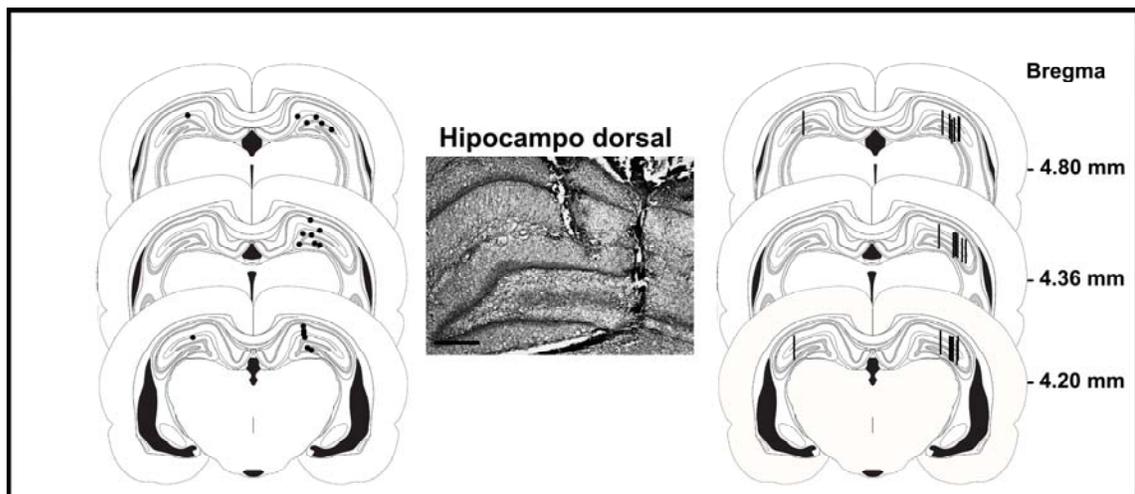


Figura 11. Fotomicrografias dos trajetos da agulha de injeção e sonda de microdiálise no hipocampo dorsal, e diagramas dos sítios de injeção (ponto) e sondas (traço) no HD tendo como referência o Atlas Paxinos e Watson (2005). O número de pontos e traços representados é menor que o número de ratos utilizados devido à sobreposição. Barra com escala de 500 μ m.

7.2. Efeitos da SP no HD sobre os níveis extracelulares de 5-HT no HD.

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que houve diferença significativa nos níveis extracelulares de 5-HT no fator tempo ($F(8, 128) = 4,37; p < 0,05$). Contudo, nenhum efeito significativo foi observado no fator tratamento ($F(3, 16) = 0,99; p > 0,05$) e interação entre tratamento *versus* tempo ($F(24, 128) = 1,29; p > 0,05$). Igualmente, um efeito significativo foi observado nos níveis extracelulares de 5-HIAA no fator tempo ($F(8, 128) = 3,44; p < 0,05$), porém, nenhum efeito significativo foi visto no tratamento ($F(3, 16) = 1,02; p > 0,05$) e interação tratamento *versus* tempo ($F(24, 128) = 0,72; p > 0,05$), Figuras 12 A e B.

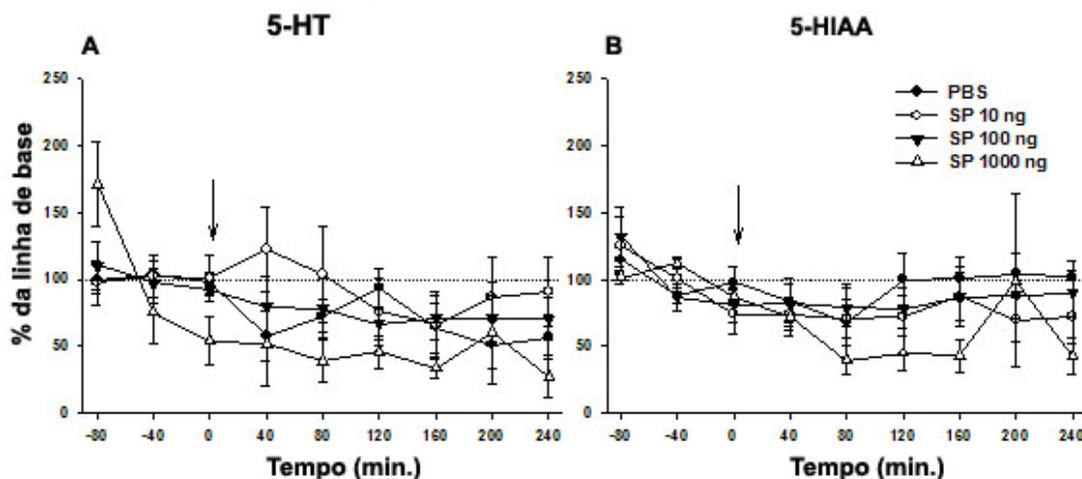
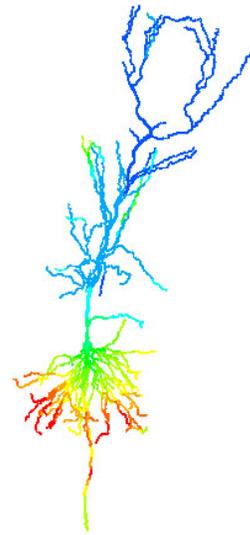


Figura 12. Concentração extracelular de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) nos dialisados do hipocampo dorsal. PBS (salina tamponada 0,1 M) e substância P 1000 ng (SP, $n = 4$ para cada grupo) e, SP 10 e 100 ng ($n = 6$ para cada grupo). Em ambos os casos, as medidas foram feitas antes e depois da injeção de SP (seta). Os dados são expressos como porcentagem dos níveis controle (média de três amostras antes da injeção SP = 100%) e apresentados como média \pm EPM.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Discussão

O presente trabalho mostrou os efeitos da SP no HD e HV de ratos submetidos ao teste do LCE, campo aberto e condicionamento contextual aversivo. Os resultados do LCE mostraram que a microinjeção de SP no HD aumentou o número de entradas nos braços abertos e a porcentagem de entradas e tempo de permanência nesses braços em relação ao total. A análise das categorias etológicas “novas” também mostrou um aumento da frequência de *end-arm exploration* e *head dipping*. Esses efeitos ocorreram sem alterar a atividade locomotora visto que a frequência de entradas nos braços fechados do LCE não foi alterada. Outra evidência do efeito ansiolítico da SP no HD foi um aumento da porcentagem de entradas na área central do campo aberto. Contrariamente, a injeção de SP na porção ventral do hipocampo não causou alterações significativas nos comportamentos avaliados no LCE e campo aberto. Os resultados obtidos no modelo de condicionamento contextual aversivo mostraram uma diminuição da expressão da resposta de congelamento após a microinjeção de SP no HD, mas não no HV.

O hipocampo, uma estrutura particularmente envolvida em processos relacionados à aprendizagem, memória e localização espacial (EICHENBAUM, 2004; O'KEEFE, 1978; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004), também participa da organização de comportamentos defensivos relacionados ao medo e ansiedade (BANNERMAN *et al.*, 2004; BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; CANTERAS, 2002; DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008; GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N., 2000; KIM *et al.*, 1971). Estudos anatômicos mostraram conexões distintas ao longo do eixo dorso-ventral dessa estrutura (JAY; WITTER, 1991; VERWER *et al.*, 1997). Assim, as regiões hipocâmpais parecem participar de maneira distinta no processamento de informações relacionadas à memória e ansiedade (LEONARDO *et al.*, 2006; RISOLD; SWANSON, 1996; WITTER *et al.*, 2000). Vários estudos apóiam a hipótese de que o HV tem um papel importante no desempenho comportamental de roedores frente a situações ameaçadoras (BANNERMAN *et al.*, 2002; BANNERMAN *et al.*, 2004; KJELSTRUP *et al.*, 2002; MCHUGH *et al.*, 2004), enquanto o HD participa de processos neurais relacionados à aprendizagem e memória (BANNERMAN *et al.*, 2004; KJELSTRUP *et al.*, 2002; PENTKOWSKI *et al.*, 2006; STEFANSKI *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem novas evidências que fortalecem a hipótese da participação distinta das regiões hipocâmpais na organização das respostas comportamentais de animais expostos a situações ameaçadoras. O presente trabalho mostrou que as respostas de medo e ansiedade mediadas pela SP no hipocampo envolvem apenas a porção dorsal dessa estrutura. Corroborando esses resultados, um estudo recente mostrou que a estimulação elétrica do HD aumentou a exploração dos braços abertos do LCE e reduziu o tempo de execução do comportamento de enterrar uma sonda eletrificada no *shock-probe burying test*, enquanto a estimulação do HV não promoveu esses mesmos efeitos (DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008). Além disso, a lesão eletrolítica do HD diminuiu o tempo de congelamento de animais expostos ao contexto aversivo onde previamente receberam choques nas patas (KIM *et al.*, 1992; MCNISH; GEWIRTZ; DAVIS, 1997).

Além do uso de lesões eletrolíticas e estimulação elétrica para inativar e estimular, respectivamente, as regiões hipocâmpais, as manipulações farmacológicas também têm contribuído para confirmar a participação da região dorsal do hipocampo na elaboração de respostas defensivas inatas e condicionadas a estímulos ameaçadores. A microinfusão de tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio, no HD de ratos aumentou a frequência de choques recebidos no *shock-probe burying test* (DEGROOT; TREIT, 2004). Nesse mesmo teste, a microinfusão de fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, nesta região suprimiu o comportamento de enterrar (DEGROOT; TREIT, 2003). Da mesma maneira, a microinjeção de midazolam, um agonista GABA-benzodiazepínico, promoveu o aumento da exploração dos braços abertos do LCE (MENARD; TREIT, 2001), e a administração intra-HD de antagonistas nitrérgicos promoveu um aumento da frequência do comportamento de lamber no teste de conflito de Vogel (SPOLIDORIO *et al.*, 2007). Com relação às respostas condicionadas de medo, muitos pesquisadores têm sugerido que a participação do HD na aquisição, consolidação e evocação do medo contextual ocorre em um determinado intervalo de tempo (BARRIENTOS; O'REILLY; RUDY, 2002; FANSELOW, 2000; KIM; FANSELOW, 1992; MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1997; MATUS-AMAT *et al.*, 2004;

SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003). A microinjeção de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos, imediatamente antes ou de tetrodotoxina 90 min depois da sessão treino, no HD prejudicou a expressão do medo condicionado contextual (GALE; ANAGNOSTARAS; FANSELOW, 2001; SACCHETTI *et al.*, 1999). Esse mesmo efeito foi observado após a microinjeção de muscimol, um agonista GABA_A, no HD antes da re-exposição ao contexto aversivo (BELLGOWAN; HELMSTETTER, 1995). Além disso, lesões neurotóxicas dessa região com NMDA 1 ou 28 dias após o treino, também prejudicaram a expressão do medo condicionado contextual (MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1997; QUINN *et al.*, 2008). Entretanto, esse efeito não foi observado quando realizada uma semana antes do treino (MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1997; RICHMOND *et al.*, 1999). Adicionalmente, alguns estudos imunistoquímicos mostraram um aumento da imunorreatividade da proteína Fos no HD de animais expostos ao contexto aversivo apoiando a hipótese de sua participação na expressão do medo condicionado contextual (BECK; FIBIGER, 1995; STREKALOVA *et al.*, 2003).

Relatos conflitantes com os estudos citados acima também são encontrados na literatura. Alguns estudos evidenciaram a ausência de efeitos sobre a resposta de congelamento contextual depois da lesão ou inativação do HD (ANAGNOSTARAS; MAREN; FANSELOW, 1999; KIM; FANSELOW, 1992; RESSEL; CORREA; GUIMARAES, 2008). Da mesma maneira, outros trabalhos mostraram que o HV, mas não o dorsal, participa da elaboração de respostas comportamentais de animais expostos a situações ameaçadoras (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARAES, 2006; NASCIMENTO HACKL; CAROBREZ, 2007; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; PENTKOWSKI *et al.*, 2006). No entanto, esses resultados contraditórios podem ser atribuídos a diversas razões, dentre elas, as metodologias utilizadas em cada estudo e, eventualmente, uma segregação funcional de mecanismos neuroquímicos.

Embora o hipocampo participe como modalidade-controle responsável por gerar a inibição comportamental de animais expostos a situações aversivas, essa estrutura está envolvida nos processos relacionados à aprendizagem e memória (BRANDÃO, 2008;

EICHENBAUM, 2004; MARTIN; CLARK, 2007; SQUIRE; CAVE, 1991). Teorias recentes sobre o funcionamento hipocampal sugerem uma relação entre processos cognitivos e emocionais (DAVIDSON; JARRARD, 2004; MCNAUGHTON, 1997). Visto que o sistema neurocininérgico exerce um papel importante na modulação de processos relacionados à ansiedade (HERPFER; LIEB, 2005; MCLEAN, 2005; RUPNIAK *et al.*, 2003) e a interação preferencial da SP com os receptores NK₁ facilita a aprendizagem (HOKFELT; PERNOW; WAHREN, 2001; HUSTON; HASENOHRL, 1995; HUSTON; OITZL, 1989), sugere-se que o sistema SP/NK₁ no hipocampo possa modular os processos cognitivos e emocionais. Se esse sistema fortalece esses processos, o valor negativo entre os estímulos aversivos (choques) e o contexto deveria ser aumentado, o que acarretaria um aumento do tempo de congelamento de animais re-expostos ao contexto aversivo. Curiosamente, o presente resultado mostrou uma redução do tempo de congelamento desses animais. Assim, esses resultados fornecem as primeiras evidências do papel do sistema neurocininérgico hipocampal na regulação de mecanismos relacionados ao medo e ansiedade.

Os resultados desse estudo foram obtidos com a administração local de SP no hipocampo. Outras formas de administração podem produzir resultados diferentes. Estudos mostraram que a administração periférica de SP, em altas doses, aumentou os comportamentos relacionados à ansiedade (HASENOHRL *et al.*, 2000), e este mesmo efeito foi observado quando este neuropeptídeo foi administrado na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (DE ARAUJO; HUSTON; BRANDAO, 1998; DE ARAUJO *et al.*, 1999). Além disso, a injeção intracerebroventricular ou intra-SCPD de antagonistas NK₁ reverteu esses efeitos (DE ARAUJO; HUSTON; BRANDAO, 2001; FILE, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 1996). Contudo, a administração periférica de SP, em baixas doses, ou intra-núcleo basal magnocelular (NBM) promoveu efeitos ansiolíticos (HASENOHRL *et al.*, 1998). Já que no nosso estudo estes efeitos foram observados apenas na região dorsal do hipocampo, pode-se sugerir que o papel modulatório da SP sobre a ansiedade depende da interação com receptores neurocininérgicos presentes em determinadas estruturas encefálicas envolvidas na elaboração de respostas defensivas.

A afinidade que a SP possui pelos receptores neurocinérgicos em diferentes estruturas é outro fator importante que contribui para os resultados. Preferencialmente, o sítio de ligação da SP é o receptor NK₁ (HOKFELT; PERNOW; WAHREN, 2001), mas este neuropeptídeo pode exercer seus efeitos pela ação em outros dois tipos de receptores neurocinérgicos, o NK₂ e NK₃ (MANTYH, 2002; QUARTARA; MAGGI, 1998). Estudos prévios mostraram que a administração de SP no núcleo mediano da rafe (NMR) diminuiu a atividade locomotora, enquanto a ativação seletiva de receptores NK₁ não promoveu os mesmos efeitos (MASON; ELLIOTT, 1992; PARIS; LORENS, 1989). A administração de SP na SCPD promoveu hiper-locomção acompanhada pelo comportamento de auto-limpeza (AGUIAR; BRANDAO, 1994), enquanto o uso do agonista NK₁, o GR 73632, nesta mesma estrutura provocou inatividade comportamental sem alterar a frequência de auto-limpeza (MONGEAU *et al.*, 1998). Adicionalmente, o efeito ansiogênico observado em animais expostos ao LCE produzido pela ativação seletiva de receptores NK₁ na SCPD foi reproduzido pela administração intracerebroventricular de SP e de um agonista NK₂ (TEIXEIRA *et al.*, 1996). Na formação hipocampal há os três tipos de receptores neurocinérgicos, com exceção da sua porção dorsal, praticamente desprovida de receptores NK₃ (MAENO; KIYAMA; TOHYAMA, 1993; OTSUKA; YOSHIOKA, 1993; QUARTARA; MAGGI, 1998; SAFFROY *et al.*, 2003). No entanto, um estudo eletrofisiológico sugeriu que os efeitos da SP nessa região são mediados apenas por receptores NK₁ e não por NK₂ e NK₃ (OGIER; RAGGENBASS, 2003).

Além da distribuição de neurônios imunorreativos para SP no SNC e da sua afinidade pelos receptores neurocinérgicos, a SP pode interagir com outros sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação dos processos emocionais (HASENOHRL *et al.*, 2000). Entretanto, os mecanismos neuroquímicos envolvidos nos efeitos comportamentais da SP intra-HD são desconhecidos. Vários estudos têm demonstrado a localização de receptores NK₁ em corpos celulares e dendritos de interneurônios GABAérgicos hipocampais (ACSADY *et al.*, 1997; BORHEGYI; LERANTH, 1997; SLOVITER *et al.*, 2001). Em cortes hipocampais, a SP e outras neurocininas estimularam interneurônios

GABAérgicos da região CA1 (DREIFUSS; RAGGENBASS, 1986; ZANINETTI; RAGGENBASS, 2000). Adicionalmente, a ativação dos receptores NK₁ pela SP aumentou a neurotransmissão GABAérgica nessa região (OGIER; RAGGENBASS, 2003). Assim, poder-se-ia sugerir que os efeitos comportamentais observados no presente estudo poderiam ser devido a ativação de receptores NK₁ localizados em interneurônios GABAérgicos hipocâmpais. Alguns estudos mostraram que a microinjeção de muscimol no HD aumentou a exploração da extremidade aberta do LCE e diminuiu o tempo de congelamento de ratos expostos ao contexto aversivo (MENARD; TREIT, 2001; PARSONS; OTTO, 2008).

Além do sistema GABAérgico, outros sistemas neuroquímicos podem estar envolvidos nos efeitos promovidos pela SP no hipocampo. Níveis elevados de ACh no HD preveniu os comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE e no *shock-probe burying test* (DEGROOT; KASHLUBA; TREIT, 2001; DEGROOT; TREIT, 2002) e que o SPME (*Substance P methyl ester*), um agonista de receptores NK₁, aumentou a atividade colinérgica em cortes hipocâmpais de camundongos através de sua ação em receptores NK₁ localizados em neurônios colinérgicos (ARENAS *et al.*, 1991; FEUERSTEIN; GLEICHAUF; LANDWEHRMEYER, 1996; STEINBERG *et al.*, 1998; STEINBERG *et al.*, 1995). É possível aventar que a SP no HD promoveu os efeitos ansiolíticos por ativar neurônios colinérgicos hipocâmpais via receptores NK₁. Entretanto, sugere-se cautela em acatar essa hipótese, uma vez que o tempo de congelamento de animais expostos ao contexto aversivo onde previamente receberam choques nas patas foi acompanhado por elevados níveis extracelulares de ACh no hipocampo (NAIL-BOUCHERIE *et al.*, 2000). Diante de resultados contraditórios, investigações pormenorizadas devem ser realizadas com a finalidade de esclarecer se o sistema colinérgico participa, eventualmente, dos efeitos ansiolíticos promovidos pelo tratamento intra-HD da SP.

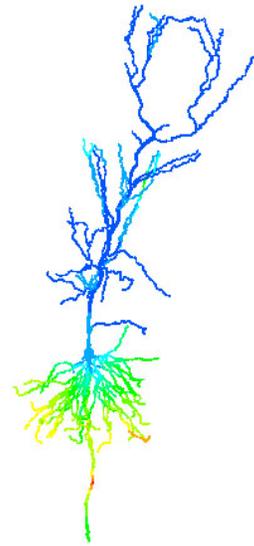
Muitos estudos têm demonstrado a participação do sistema serotoninérgico na elaboração de respostas inatas e condicionadas de medo (BORELLI *et al.*, 2005; FILE; GONZALEZ, 1996; LI *et al.*, 2006; SILVA; GARGARO; BRANDAO, 2004; STEFANSKI *et al.*, 1993). Estudos neuroquímicos mostraram que a exposição ao LCE aumentou os níveis

extracelulares de 5-HT no HV de ratos (REX; VOIGT; FINK, 2005), enquanto diminuiu a concentração *post-mortem* de 5-HT no HD (CARVALHO *et al.*, 2005). Lesões eletrolíticas ou neurotóxicas e microinjeções de 8-OHDPAT, um agonista de auto-receptores 5-HT_{1A}, no NMR – fonte serotoninérgica do HD (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999) - diminuíram o tempo de congelamento de animais re-expostos ao contexto aversivo (BORELLI *et al.*, 2005; SILVA; GARGARO; BRANDAO, 2004). Além disso, microinjeções bilaterais de flesinoxan, um agonista 5-HT_{1A}, no HD também diminuíram as respostas de congelamento de animais submetidos ao mesmo protocolo experimental (LI *et al.*, 2006). Sugeriu-se que os efeitos ansiolíticos causados pelo tratamento com a SP intra-HD poderiam ser mediados por mecanismos serotoninérgicos. No presente estudo, a infusão de SP no HD não influenciou a liberação de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA. Deve-se destacar que a microinjeção de SP no HD foi realizada durante condições basais na qual o animal não foi submetido a nenhum modelo comportamental que oferecesse perigo à sua integridade física. Sugere-se que a SP, em condições não-aversivas, não interage com o sistema serotoninérgico. Isso não significa que a SP não esteja atuando em seus receptores, uma vez que, em condições basais, o tratamento com o antagonista NK₁, o SR 140333, promoveu o aumento dos níveis extracelulares de ACh no hipocampo (KART *et al.*, 2004). Assim, estudos adicionais precisam ser realizados para avaliar a influencia da SP sobre o sistema serotoninérgico no HD de ratos expostos a situações aversivas.

Outro ponto que deve ser abordado nesta discussão é a hiperatividade locomotora causada por manipulações farmacológicas e lesões eletrolíticas no HD de animais expostos a modelos de ansiedade (GOOD; HONEY, 1997; MAREN; FANSELOW, 1997). Diante disso, poder-se-ia sugerir que o tratamento intra-HD com SP promoveu a diminuição do tempo de congelamento dos animais expostos ao contexto aversivo por influenciar a atividade locomotora dos animais. Entretanto, os efeitos ansiolíticos observados no presente estudo não podem ser atribuídos a essas alterações, uma vez que o tratamento não influenciou a frequência de entradas nos braços fechados do LCE e nem o tempo de imobilidade no teste do campo aberto. Todavia, a administração de SP intra-HV diminuiu o

tempo de imobilidade de animais expostos a este último modelo comportamental em relação aos animais controles. Este resultado se deve, provavelmente, ao elevado tempo de congelamento dos animais controles ocasionado por eventual variabilidade comportamental entre os animais deste grupo.

Concluindo, os resultados do presente estudo indicam um envolvimento diferencial do HD e HV nos mecanismos associados às respostas de defesa. Além disso, os dados obtidos sugerem que os mecanismos neurocinérgicos no HD modulam os comportamentos defensivos avaliados no LCE, campo aberto e no medo condicionado contextual. Esses efeitos não parecem ser mediados pela neurotransmissão serotoninérgica hipocampal, uma vez que a injeção SP no HD não alterou os níveis de 5-HT avaliados em condições basais. Esses achados podem auxiliar na compreensão do papel da SP nos circuitos neurais implicados na fisiopatologia da ansiedade.

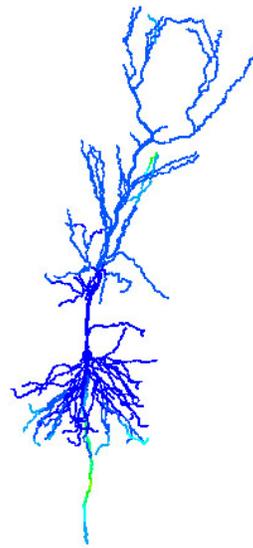


Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Conclusões

Os presentes resultados acerca do papel da SP intra-hipocampal sobre a expressão de respostas inatas e condicionadas de medo e sua interação com o sistema serotoninérgico permite-se sugerir que:

- Há um envolvimento diferencial de mecanismos neurocininérgicos do HD e HV na expressão de respostas inatas e condicionadas de medo.
- Mecanismos neurocininérgicos do HD medeiam os comportamentos relacionados ao medo e ansiedade expressos no LCE, campo aberto e ambiente-contexto onde os animais previamente receberam choques nas patas.
- Os efeitos ansiolíticos promovidos pela microinjeção de SP no HD não são mediados pela neurotransmissão serotoninérgica nesta região quando os animais se encontram em condições não-aversivas.



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

*Referências Bibliográficas**

- ACSADY, L.; KATONA, I.; GULYAS, A. I.; SHIGEMOTO, R.; FREUND, T. F. Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. **J Comp Neurol**, v.378, n.3, p.320-36. 1997.
- ADAMS, F.; SCHWARTING, R. K.; BOIX, F.; HUSTON, J. P. Lateralized changes in behavior and striatal dopamine release following unilateral tactile stimulation of the perioral region: a microdialysis study. **Brain Res**, v.553, n.2, p.318-22. 1991.
- AGUIAR, M. S.; BRANDAO, M. L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behav Pharmacol**, v.5, n.3, p.369-373. 1994.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **J Neurosci Methods**, v.169, n.1, p.109-18. 2008.
- AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. Hippocampal formation. In: Paxinos G. (Ed.). **The rat nervous systems**. Sydney: Elsevier, 2004. p.633-704
- ANAGNOSTARAS, S. G.; MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **J Neurosci**, v.19, n.3, p.1106-14. 1999.
- ANSELONI, V. Z.; BRANDAO, M. L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behav Pharmacol**, v.8, n.6-7, p.533-40. 1997.
- ARENAS, E.; ALBERCH, J.; PEREZ-NAVARRO, E.; SOLSONA, C.; MARSAL, J. Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachykinins in the neostriatum. **J Neurosci**, v.11, n.8, p.2332-8. 1991.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V. M.; DE ANDRADE, T. G.; BRANDAO, M. L. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. **Brain Res**, v.790, n.1-2, p.178-84. 1998.
- AVANZI, V.; SILVA, R. C.; MACEDO, C. E.; BRANDAO, M. L. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. **Physiol Behav**, v.78, n.3, p.471-7. 2003.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Res**, v.439, n.1-2, p.95-106. 1988.
- BANNERMAN, D. M.; DEACON, R. M.; OFFEN, S.; FRISWELL, J.; GRUBB, M.; RAWLINS, J. N. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. **Behav Neurosci**, v.116, n.5, p.884-901. 2002.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.3, p.273-83. 2004.
- BARRIENTOS, R. M.; O'REILLY, R. C.; RUDY, J. W. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. **Behav Brain Res**, v.134, n.1-2, p.299-306. 2002.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. **J Neurosci**, v.15, n.1 Pt 2, p.709-20. 1995.
- BELGOWAN, P. S.; HELMSTETTER, F. J. Effects of muscimol applied to the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of cued versus contextual fear conditioning. **Society for Neuroscience**. San Diego, CA, 1995. 1213 p.
- BELZUNG, C. Measuring exploratory behavior. In: Crusio W. E. e Gerlai R. T. (Ed.). **Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)**. Amsterdam: Elsevier, 1999. p.739-749
- BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behav Brain Res**, v.175, n.1, p.183-8. 2006.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**, v.39, p.43-68. 1988.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Effects of hippocampal lesions on the rat's reaction to a cat. **J Comp Physiol Psychol**, v.78, n.1, p.77-82. 1972.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In: Mcnaughton N. e Andrews G. (Ed.). **Anxiety**. Dunedin: Otago University Press, 1990. p.124-133
- BOLLES, R.; COLLIER, A. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Animal Learning and Behavior**, v.4, p.6-8. 1976.
- BORELLI, K. G.; GARGARO, A. C.; DOS SANTOS, J. M.; BRANDAO, M. L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neurosci Lett**, v.387, n.2, p.105-10. 2005.
- BORHEGYI, Z.; LERANTH, C. Substance P innervation of the rat hippocampal formation. **J Comp Neurol**, v.384, n.1, p.41-58. 1997.
- BRANDÃO, M. L. Comportamento Emocional. In: Brandão M. L. (Ed.). **As bases biológicas do comportamento - Uma introdução à neurociência**. Brasil: Editora Pedagógica e Universitária, 2008. p.119-144
- BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; MATOS, J. M.; OLIVEIRA, L. C.; NOBRE, M. J. Brainstem mechanisms in anxiety and panic. In: Chen F. J. (Ed.). **Focus in Brain Mapping**. New York: Nova Biomedical Books, 2005. p.137-154
- BRANDAO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N. C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neurosci Biobehav Rev**, v.18, n.3, p.339-46. 1994.
- BRANDAO, M. L.; TOMAZ, C.; BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C.; BAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiol Behav**, v.44, n.3, p.361-5. 1988.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- BUWALDA, B.; KOLE, M. H.; VEENEMA, A. H.; HUININGA, M.; DE BOER, S. F.; KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M. Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. **Neurosci Biobehav Rev**, v.29, n.1, p.83-97. 2005.
- CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav**, v.71, n.3, p.481-91. 2002.
- CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; VALLE, L. E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res Bull**, v.44, n.3, p.297-305. 1997.
- CARVALHO, M. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDAO, M. L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.12, p.1857-66. 2005.
- CUELLO, A. C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v.178, n.1, p.129-56. 1978.
- DARWIN, C. A expressão das emoções no homem e nos animais (tradução) (2009). In: Darwin C. (Ed.). Rio de Janeiro: Companhia de Bolso, 1872. p.344
- DAVIDSON, T. L.; JARRARD, L. E. The hippocampus and inhibitory learning: a 'Gray' area? **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.3, p.261-71. 2004.
- DE ARAUJO, J. E.; HUSTON, J. P.; BRANDAO, M. L. Aversive effects of the C-fragment of Substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Exp Brain Res**, v.123, n.1-2, p.84-9. 1998.
- DE ARAUJO, J. E.; HUSTON, J. P.; BRANDAO, M. L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **Eur J Pharmacol**, v.432, n.1, p.43-51. 2001.
- DE ARAUJO, J. E.; SILVA, R. C.; HUSTON, J. P.; BRANDAO, M. L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. **Peptides**, v.20, n.12, p.1437-43. 1999.
- DEGROOT, A.; KASHLUBA, S.; TREIT, D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Pharmacol Biochem Behav**, v.69, n.3-4, p.391-9. 2001.
- DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Res**, v.1001, n.1-2, p.60-71. 2004.
- DEGROOT, A.; TREIT, D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Brain Res**, v.949, n.1-2, p.60-70. 2002.
- DEGROOT, A.; TREIT, D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. **Neuroscience**, v.117, n.2, p.493-501. 2003.
- DREIFUSS, J. J.; RAGGENBASS, M. Tachykinins and bombesin excite non-pyramidal neurones in rat hippocampus. **J Physiol**, v.379, p.417-28. 1986.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- DRINGENBERG, H. C.; LEVINE, Y.; MENARD, J. L. Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. **Behav Brain Res**, v.186, n.1, p.143-7. 2008.
- EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v.44, n.1, p.109-20. 2004.
- FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**, v.110, n.1-2, p.73-81. 2000.
- FANSELOW, M. S.; HELMSTETTER, F. J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behav Neurosci**, v.102, n.2, p.233-43. 1988.
- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. **Journal of Physiology**, v.145, p.251-265. 1959.
- FEUERSTEIN, T. J.; GLEICHAUF, O.; LANDWEHRMEYER, G. B. Modulation of cortical acetylcholine release by serotonin: the role of substance P interneurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.354, n.5, p.618-26. 1996.
- FILE, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. In: (Ed.). **Pharmacol Biochem Behav**, v.58, 1997. p.747-52
- FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: J.M. E., Heal D. J., *et al* (Ed.). **Experimental Approach to Anxiety and Depression**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1992. p.25-44
- FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT1A-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav**, v.54, n.1, p.123-8. 1996.
- FILE, S. E.; KENNY, P. J.; CHEETA, S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v.66, n.1, p.65-72. 2000.
- FUCHS, R. A.; EADDY, J. L.; SU, Z. I.; BELL, G. H. Interactions of the basolateral amygdala with the dorsal hippocampus and dorsomedial prefrontal cortex regulate drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. **Eur J Neurosci**, v.26, n.2, p.487-98. 2007.
- GALE, G. D.; ANAGOSTARAS, S. G.; FANSELOW, M. S. Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. **Hippocampus**, v.11, n.4, p.371-6. 2001.
- GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbitures, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. **Psychopharmacology**, v.1, p.482-492. 1960.
- GOBBI, G.; BLIER, P. Effect of neurokinin-1 receptor antagonists on serotonergic, noradrenergic and hippocampal neurons: comparison with antidepressant drugs. **Peptides**, v.26, n.8, p.1383-93. 2005.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- GOOD, M.; HONEY, R. C. Dissociable effects of selective lesions to hippocampal subsystems on exploratory behavior, contextual learning, and spatial learning. **Behav Neurosci**, v.111, n.3, p.487-93. 1997.
- GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res**, v.14, n.4-5, p.239-65. 1981.
- GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F.S. Fundamentos de Psicofarmacologia. 2001.
- GRAY, J. A. **The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system**. New York: Oxford University Press. 1982
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septohippocampal system. In: Gray J. A. e Mcnaughton N. (Ed.). **The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p.204-232
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. Oxford: Oxford University Press. 2000. 424 p.
- HALL, C. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v.18, p.35-403. 1934.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.327, n.1, p.1-5. 1984.
- HASENOHRL, R. U.; JENTJENS, O.; DE SOUZA SILVA, M. A.; TOMAZ, C.; HUSTON, J. P. Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **Eur J Pharmacol**, v.354, n.2-3, p.123-33. 1998.
- HASENOHRL, R. U.; SOUZA-SILVA, M. A.; NIKOLAUS, S.; TOMAZ, C.; BRANDAO, M. L.; SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. **Neuropeptides**, v.34, n.5, p.272-80. 2000.
- HERPFER, I.; LIEB, K. Substance P receptor antagonists in psychiatry: rationale for development and therapeutic potential. **CNS Drugs**, v.19, n.4, p.275-93. 2005.
- HESS, W.; BRÜGGER, M. Das subkortikales zentrum der affektiven abwereaktion. *Helvetica physiologica et pharmacologica acta*. **Journal of Physiology**, v.1, p.33-52. 1943.
- HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurol**, v.2, n.8, p.463-72. 2003.
- HOKFELT, T.; PERNOW, B.; WAHREN, J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. **J Intern Med**, v.249, n.1, p.27-40. 2001.
- HUSTON, J. P.; HASENOHRL, R. U. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. **Behav Brain Res**, v.66, n.1-2, p.117-27. 1995.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

HUSTON, J. P.; OITZL, M. S. The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P. **Neurosci Biobehav Rev**, v.13, n.2-3, p.171-80. 1989.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr Rev**, v.12, n.2, p.118-34. 1991.

JARSKY, T.; ROXIN, A.; KATH, W. L.; SPRUSTON, N. Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Nat Neurosci**, v.8, n.12, p.1667-76. 2005.

JAY, T. M.; WITTER, M. P. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **J Comp Neurol**, v.313, n.4, p.574-86. 1991.

KART, E.; JOCHAM, G.; MULLER, C. P.; SCHLOMER, C.; BRANDAO, M. L.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Neurokinin-1 receptor antagonism by SR140333: enhanced in vivo ACh in the hippocampus and promnesic post-trial effects. **Peptides**, v.25, n.11, p.1959-69. 2004.

KECK, M. E.; SARTORI, S. B.; WELT, T.; MULLER, M. B.; OHL, F.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. Differences in serotonergic neurotransmission between rats displaying high or low anxiety/depression-like behaviour: effects of chronic paroxetine treatment. **J Neurochem**, v.92, n.5, p.1170-9. 2005.

KIM, C.; KIM, C. C.; KIM, J. K.; KIM, M. S.; CHANG, H. K.; KIM, J. Y.; LEE, I. G. Fear response and aggressive behavior of hippocampectomized house rats. **Brain Res**, v.29, n.2, p.237-51. 1971.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v.256, n.5057, p.675-7. 1992.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S.; DECOLA, J. P.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. **Behav Neurosci**, v.106, n.4, p.591-6. 1992.

KJELSTRUP, K. G.; TUVNES, F. A.; STEFFENACH, H. A.; MURISON, R.; MOSER, E. I.; MOSER, M. B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.16, p.10825-30. 2002.

KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A.; STEFANSKI, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. **Eur J Pharmacol**, v.168, n.3, p.393-6. 1989.

KOUZNETSOVA, M.; NISTRU, A. Modulation by substance P of synaptic transmission in the mouse hippocampal slice. **Eur J Neurosci**, v.10, n.10, p.3076-84. 1998.

LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci**, v.8, n.7, p.2517-29. 1988.

LENT, R. Mentes emocionais, mentes racionais: As bases neurais da emoção e da razão. In: Lent R. (Ed.). **Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto e Belo Horizonte: Editora Atheneu, 2004. p.650-680

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

LEONARDO, E. D.; RICHARDSON-JONES, J. W.; SIBILLE, E.; KOTTMAN, A.; HEN, R. Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression. **Neuroscience**, v.137, n.1, p.177-86. 2006.

LI, X.; INOUE, T.; ABEKAWA, T.; WENG, S.; NAKAGAWA, S.; IZUMI, T.; KOYAMA, T. 5-HT_{1A} receptor agonist affects fear conditioning through stimulations of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus and amygdala. **Eur J Pharmacol**, v.532, n.1-2, p.74-80. 2006.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v.46, n.3, p.321-40. 1990.

LJUNGDAHL, A.; HOKFELT, T.; NILSSON, G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. **Neuroscience**, v.3, n.10, p.861-943. 1978.

MAENO, H.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. **Brain Res Mol Brain Res**, v.18, n.1-2, p.43-58. 1993.

MANTYH, P. W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **J Clin Psychiatry**, v.63 Suppl 11, p.6-10. 2002.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M. S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav Brain Res**, v.88, n.2, p.261-74. 1997.

MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v.67, n.2, p.142-9. 1997.

MARTIN, S. J.; CLARK, R. E. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. **Cell Mol Life Sci**, v.64, n.4, p.401-31. 2007.

MARTINEZ, R. C.; RIBEIRO DE OLIVEIRA, A.; BRANDAO, M. L. Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.17, n.11, p.717-24. 2007.

MASON, G. S.; ELLIOTT, P. J. Behavioural consequences following infusion of selective neurokinin agonists into the median raphe nucleus of the rat. **Neuropharmacology**, v.31, n.8, p.757-60. 1992.

MATUS-AMAT, P.; HIGGINS, E. A.; BARRIENTOS, R. M.; RUDY, J. W. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. **J Neurosci**, v.24, n.10, p.2431-9. 2004.

MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; RAWLINS, J. N.; BANNERMAN, D. M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. **Behav Neurosci**, v.118, n.1, p.63-78. 2004.

MCLEAN, S. Do substance P and the NK1 receptor have a role in depression and anxiety? **Curr Pharm Des**, v.11, n.12, p.1529-47. 2005.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

MCNAUGHTON, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity--a possible cause of anxiety disorder? **Pharmacol Biochem Behav**, v.56, n.4, p.603-11. 1997.

MCNAUGHTON, N.; WICKENS, J. Hebb, pandemonium and catastrophic hypermnesia: the hippocampus as a suppressor of inappropriate associations. **Cortex**, v.39, n.4-5, p.1139-63. 2003.

MCNISH, K. A.; GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. **J Neurosci**, v.17, n.23, p.9353-60. 1997.

MENARD, J.; TREIT, D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. **Brain Res**, v.888, n.1, p.163-166. 2001.

MONGEAU, R.; DE OCA, B. M.; FANSELOW, M. S.; MARSDEN, C. A. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. **Behav Neurosci**, v.112, n.5, p.1125-35. 1998.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v.48, n.4, p.254-60. 1955.

MORRISON, C. F.; STEPHENSON, J. A. Drug effects on a measure of unconditioned avoidance in the rat. **Psychopharmacologia**, v.18, n.2, p.133-43. 1970.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v.8, n.6, p.608-19. 1998.

MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P.; BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J Neurochem**, v.60, n.6, p.1987-2009. 1993.

NAIL-BOUCHERIE, K.; DOURMAP, N.; JAFFARD, R.; COSTENTIN, J. Contextual fear conditioning is associated with an increase of acetylcholine release in the hippocampus of rat. **Brain Res Cogn Brain Res**, v.9, n.2, p.193-7. 2000.

NAKAYA, Y.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. **J Comp Neurol**, v.347, n.2, p.249-74. 1994.

NASCIMENTO HACKL, L. P.; CAROBREZ, A. P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v.88, n.2, p.177-85. 2007.

NETTO, S. M.; GUIMARAES, F. S. Role of hippocampal 5-HT1A receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. **Behav Brain Res**, v.77, n.1-2, p.215-8. 1996.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res**, v.927, n.1, p.87-96. 2002.

O'KEEFE, J., NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford University Press**. 1978.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- OGIER, R.; RAGGENBASS, M. Action of tachykinins in the rat hippocampus: modulation of inhibitory synaptic transmission. **Eur J Neurosci**, v.17, n.12, p.2639-47. 2003.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev**, v.73, n.2, p.229-308. 1993.
- PANKSEEP, J. Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety. In: Burrows G. D., Roth M., *et al* (Ed.). **The psychoneurology of fear: evolucionary perspectives and the role of animals models in understanding human anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990
- PARIS, J. M.; LORENS, S. A. A dose-response analysis of intra-raphé tachykinin-induced hyperactivity. **J Pharmacol Exp Ther**, v.251, n.1, p.388-93. 1989.
- PARSONS, T. C.; OTTO, T. Temporary inactivation of dorsal hippocampus attenuates explicitly nonspatial, unimodal, contextual fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, v.90, n.1, p.261-8. 2008.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York. 2005. 1-367 p.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v.14, n.3, p.149-67. 1985.
- PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R. J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **Eur J Neurosci**, v.23, n.8, p.2185-96. 2006.
- PETERSON, G. M.; SHURLOW, C. L. Morphological evidence for a substance P projection from medial septum to hippocampus. **Peptides**, v.13, n.3, p.509-17. 1992.
- PETROVICH, G. D.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res Brain Res Rev**, v.38, n.1-2, p.247-89. 2001.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, v.106, n.2, p.274-85. 1992.
- PITKANEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. **Ann N Y Acad Sci**, v.911, p.369-91. 2000.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol Ther**, v.55, n.2, p.149-81. 1992.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v.463, n.1-3, p.3-33. 2003.
- QUARTARA, L.; MAGGI, C. A. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. **Neuropeptides**, v.32, n.1, p.1-49. 1998.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

QUINN, J. J.; MA, Q. D.; TINSLEY, M. R.; KOCH, C.; FANSELOW, M. S. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learn Mem**, v.15, n.5, p.368-72. 2008.

RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G. C.; WEHRMEISTER, T. D.; IZIDIO, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behav Brain Res**, v.193, n.2, p.277-88. 2008.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. **Life Sci**, v.40, n.2, p.109-17. 1987.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v.18, n.9, p.2027-35. 2008.

REX, A.; VOIGT, J. P.; FINK, H. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. **Eur J Neurosci**, v.22, n.5, p.1185-9. 2005.

RICHMOND, M. A.; YEE, B. K.; POUZET, B.; VEENMAN, L.; RAWLINS, J. N.; FELDON, J.; BANNERMAN, D. M. Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. **Behav Neurosci**, v.113, n.6, p.1189-203. 1999.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Res Brain Res Rev**, v.24, n.2-3, p.115-95. 1997.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v.272, n.5267, p.1484-6. 1996.

RUPNIAK, N. M.; WEBB, J. K.; FISHER, A.; SMITH, D.; BOYCE, S. The substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 inhibits fear conditioning in gerbils. **Neuropharmacology**, v.44, n.4, p.516-23. 2003.

SACCHETTI, B.; LORENZINI, C. A.; BALDI, E.; TASSONI, G.; BUCHERELLI, C. Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. **J Neurosci**, v.19, n.21, p.9570-8. 1999.

SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; GLOWINSKI, J.; BEAUJOUAN, J. C. Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: comparison with NK1 and NK3 binding sites. **Neuroscience**, v.116, n.3, p.761-73. 2003.

SANDERS, M. J.; WILTGEN, B. J.; FANSELOW, M. S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **Eur J Pharmacol**, v.463, n.1-3, p.217-23. 2003.

SANTOS, J. M.; GARGARO, A. C.; OLIVEIRA, A. R.; MASSON, S.; BRANDAO, M. L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.15, n.2, p.239-46. 2005.

SARIA, A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. **Eur J Pharmacol**, v.375, n.1-3, p.51-60. 1999.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- SHULTS, C. W.; QUIRION, R.; CHRONWALL, B.; CHASE, T. N.; O'DONOHUE, T. L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, v.5, n.6, p.1097-128. 1984.
- SILVA, R. C.; BRANDAO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacol Biochem Behav**, v.65, n.2, p.209-16. 2000.
- SILVA, R. C.; CRUZ, A. P.; AVANZI, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDAO, M. L. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear-potentiated startle. **Neural Plast**, v.9, n.4, p.233-47. 2002.
- SILVA, R. C.; GARGARO, A. C.; BRANDAO, M. L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behav Brain Res**, v.151, n.1-2, p.93-101. 2004.
- SLOVITER, R. S.; ALI-AKBARIAN, L.; HORVATH, K. D.; MENKENS, K. A. Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. **J Comp Neurol**, v.430, n.3, p.283-305. 2001.
- SOUZA SILVA, M. A. **Efeito do neuropeptídeo substância P microinjetado na região do núcleo basal magnocelular sobre a concentração extracelular de ACh no córtex frontal: Um estudo *in vivo* utilizando microdiálise**. 1998. 183 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 1998.
- SPOLIDORIO, P. C.; ECHEVERRY, M. B.; IYOMASA, M.; GUIMARAES, F. S.; DEL BEL, E. A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology (Berl)**, v.195, n.2, p.183-92. 2007.
- SQUIRE, L. R.; CAVE, C. B. The hippocampus, memory, and space. **Hippocampus**, v.1, n.3, p.269-71. 1991.
- SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci**, v.27, p.279-306. 2004.
- STEFANSKI, R.; PALEJKO, W.; BIDZINSKI, A.; KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. **Neuropharmacology**, v.32, n.10, p.977-85. 1993.
- STEINBERG, R.; MARCO, N.; VOUTSINOS, B.; BENSALID, M.; RODIER, D.; SOUILHAC, J.; ALONSO, R.; OURY-DONAT, F.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Expression and presence of septal neurokinin-2 receptors controlling hippocampal acetylcholine release during sensory stimulation in rat. **Eur J Neurosci**, v.10, n.7, p.2337-45. 1998.
- STEINBERG, R.; RODIER, D.; SOUILHAC, J.; BOUGAULT, I.; EMONDS-ALT, X.; SOUBRIE, P.; LE FUR, G. Pharmacological characterization of tachykinin receptors controlling acetylcholine release from rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. **J Neurochem**, v.65, n.6, p.2543-8. 1995.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

STREKALOVA, T.; ZORNER, B.; ZACHER, C.; SADOVSKA, G.; HERDEGEN, T.; GASS, P. Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. **Genes Brain Behav**, v.2, n.1, p.3-10. 2003.

SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **J Comp Neurol**, v.172, n.1, p.49-84. 1977.

TAKAHASHI, L. K.; KALIN, N. H. Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. In: Blanchard R. J., Brain P. F., *et al* (Ed.). **Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior**. Kluwer, Dordrecht, Boston and London: Kluwer Academic Publishing., 1989. p.580-594

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur J Pharmacol**, v.311, n.1, p.7-14. 1996.

TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Ann N Y Acad Sci**, v.600, p.9-34; discussion 34-5. 1990.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v.9, n.2, p.203-22. 1985.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v.44, n.2, p.463-9. 1993.

VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v.313, n.4, p.643-68. 1991.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v.407, n.4, p.555-82. 1999.

VERWER, R. W.; MEIJER, R. J.; VAN UUM, H. F.; WITTER, M. P. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. **Hippocampus**, v.7, n.4, p.397-402. 1997.

VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDAO, M. L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learn Mem**, v.8, n.3, p.164-9. 2001.

VOGEL, J. R.; BEER, B.; CLODY, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia**, v.21, n.1, p.1-7. 1971.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. **Behav Neurosci**, v.111, n.4, p.692-702. 1997.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v.83, n.3, p.482-504. 1976.

WITTER, M. P.; NABER, P. A.; VAN HAEFTEN, T.; MACHIELSEN, W. C.; ROMBOUTS, S. A.; BARKHOF, F.; SCHELTENS, P.; LOPES DA SILVA, F. H. Cortico-hippocampal

* De acordo com:

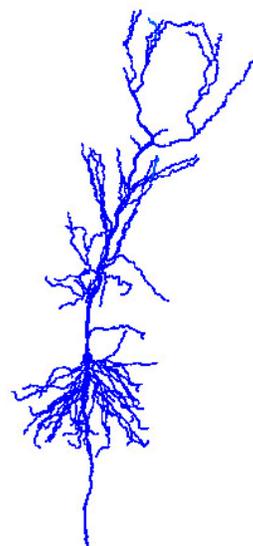
Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. **Hippocampus**, v.10, n.4, p.398-410. 2000.

ZANINETTI, M.; RAGGENBASS, M. Oxytocin receptor agonists enhance inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus by activating interneurons in stratum pyramidale. **Eur J Neurosci**, v.12, n.11, p.3975-84. 2000.

* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Biblioteca da USP, Baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).



Extraído de Jarsky, Roxin et al 2005

Anexos

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)