

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

DIFERENÇAS ASSOCIADAS AO CICLO ESTRAL NA REATIVIDADE EMOCIONAL
DE RATAS A ESTÍMULOS INCONDICIONADOS E CONDICIONADOS DE MEDO

REBECA MACHADO DE FIGUEIREDO

RIBEIRÃO PRETO/SP

2016

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

DIFERENÇAS ASSOCIADAS AO CICLO ESTRAL NA REATIVIDADE EMOCIONAL
DE RATAS A ESTÍMULOS INCONDICIONADOS E CONDICIONADOS DE MEDO.

VERSÃO REVISADA

REBECA MACHADO DE FIGUEIREDO

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

RIBEIRÃO PRETO/SP

2016

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

Figueiredo, Rebeca Machado de

Diferenças associadas ao ciclo estral na reatividade emocional de ratas a estímulos incondicionados e condicionados de medo / Rebeca Machado de Figueiredo; Orientador: Marcus Lira Brandão. – Ribeirão Preto – 2016.

63p.:il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Psicobiologia. Área de Concentração: Psicobiologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo.

Orientador: Marcus Lira Brandão

1. Fêmeas. 2. Medo incondicionado e condicionado. 3. Sobressalto. 5. Congelamento. 6. Comportamento defensivo. 7. Vocalizações ultrassônicas.

DEDICATÓRIA

OS QUE LUTAM

*Há aqueles que lutam um dia; e por isso são bons;
Há aqueles que lutam muitos dias; e por isso são muito bons;
Há aqueles que lutam anos; e são melhores ainda;
Porém, há aqueles que lutam toda a vida; esses são os imprescindíveis.
Bertolt Brecht*

Aos meus amados pais, Ana e Luiz, por me darem o dom da vida, por serem meus primeiros mestres e sempre acreditarem em mim.

Aos meus amados irmãos, Gabriel e Lucas, meus exemplos e meus heróis, companheiros e cúmplices.

Aos meus inspiradores avós, Gabriel, Rita e Netinha, por me ensinarem que tudo na vida precisa de uma pitada de fé e arte.

À minha querida tia-madrinha, Cristina, por ser meu maior exemplo acadêmico.

À minha mentora, Prof^ª Dra. Graziela Ferreira, por me apresentar a fantástica área das neurociências.

A vocês que são imprescindíveis na minha vida e formação, dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu sincero agradecimento e reconhecimento especial a todas as pessoas e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização e concretização desse trabalho:

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, por aceitar ser meu orientador, por me ensinar um pouco do muito que sabe. Foi uma honra ter sido sua aluna.

À Prof^a Dr^a Thelma Lovick, obrigada pela confiança e por me mostrar como ser uma pesquisadora melhor e cada vez mais encantada pelo trabalho com as fêmeas.

À Prof^a Dr^a Milene Carvalho por sua participação ativa nesse projeto, por sua ajuda sempre, tanto na parte experimental e na discussão dos resultados, quanto no meu desenvolvimento pessoal, me mostrando como ser um ser humano melhor.

Aos membros da banca, agradeço por aceitarem participar desse processo, trazendo suas importantes contribuições.

Às minhas companheiras de jornada e amigas, Lígia Bueno, Pillar Prado, Roberta Monteiro agradeço pela companhia, carinho, alegrias e desesperos divididos. Vocês tornaram meu caminho muito mais especial.

Aos amigos de trabalho, Prof. Manoel Jorge, Gleice Cardoso, Franciele Paliarin e Renata Ferreira por toda ajuda e bom humor, principalmente na reta final desse trabalho.

Aos colegas, Ted Talbot, Juliana Tostes, Karina Genaro, Ana Carolina Veloni, Ana Luísa Arantes, Débora Fabris e Thainá Testi, pela amigável convivência durante esse período.

À Renata Del Moro, secretária da pós-graduação, por toda sua disponibilidade, sempre pronta a ajudar com as questões burocráticas do programa.

Às agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro. Sem isto esta pesquisa não seria realizada.

À minha amiga, Fabiana Almeida, por estar sempre ao meu lado e por toda assistência na conclusão dessa etapa.

À minha professora de ballet Ana Maria Macedo e todos meus amigos bailarinos, agradeço imensamente pela amorosa acolhida e pelos momentos de descontração. Vocês são a minha família de Ribeirão Preto.

À minha família e aos amigos, por todo apoio. Sem vocês, eu não chegaria até aqui.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Leon C. Megginson

RESUMO

Figueiredo, R.M. **Diferenças associadas ao ciclo estral na reatividade emocional de ratas a estímulos incondicionados e condicionados de medo.** 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O desequilíbrio da homeostase emocional tem sido considerado como um mecanismo subjacente aos transtornos de ansiedade e humor. Em fêmeas, as alterações na secreção hormonal durante as diferentes fases do ciclo estral podem ser a base das alterações na reatividade emocional a eventos estressantes. Estudos comportamentais sobre diferenças sexuais no processamento das emoções mostram resultados conflitantes em fêmeas devido às dificuldades na seleção dos melhores modelos animais para testar as diferenças associadas ao ciclo estral. Uma vez que os testes comportamentais foram desenvolvidos em animais do sexo masculino, eles podem não ser apropriados para fêmeas. O presente estudo foi desenvolvido para contribuir nessa linha de pesquisa usando diferentes modelos de animais de medo incondicionado e condicionado, considerando as diferentes fases do ciclo estral das ratas. Comparou-se o desempenho de machos e fêmeas nas quatro fases do ciclo estral em dois testes de medo incondicionado: o *switch-off*, em que ratos cruzam uma caixa vai-e-vem para desligar uma luz aversiva, e o registro de vocalizações ultrassônicas (VUSs) a 22 kHz emitidos por animais sob o estresse agudo de restrição. Nos testes de medo condicionado, registrou-se o sobressalto potencializado pelo medo e a resposta de congelamento a um contexto aversivo. Em ambos os testes de medo condicionado, a reatividade emocional não se mostrou diferente entre os sexos. No entanto, no que diz respeito ao medo incondicionado, ratas em diestro tardio apresentaram maior reatividade emocional em desligar a luz intensa e maior emissão de VUSs em resposta à restrição em relação a outras fases do ciclo. Estes achados sugerem que o perfil hormonal durante a fase do diestro 2 pode aumentar a reatividade emocional de ratas frente a estímulos inatos, porém não àqueles aprendidos.

Palavras-chave: Fêmeas, Medo incondicionado e condicionado, Sobressalto, Congelamento, Comportamento defensivo, Vocalização ultrassônica.

ABSTRACT

Figueiredo, R.M. **Sex and estrous cycle-linked differences in responsiveness to unconditioned, but not conditioned fear stimuli in rats.** 2016. 63 f. Dissertation (Masters) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dysfunctional emotional regulation has been implicated as a potential mechanism underlying anxiety and mood disorders. Changes in hormonal secretion during the different phases of the estrous cycle may underlie changes in emotional reactivity to stressful events in female animals. Previous behavioral studies of sex differences in emotion processing in females have yielded conflicting results. This may be due to the range of different behavioral tests used and difficulties in selecting the best animal models to test for estrous cycle-linked differences in responsiveness. Furthermore, the commonly used behavioral tests were developed in male animals and it may not be appropriate to translate directly the protocols from males to females. In the present study we have attempted to address these problems by using different animal models of anxiety based on tests for unconditioned or conditioned fear. We compared the performance of male rats and female rats at four stages of the estrous cycle defined by differences in vaginal cytology. To test for unconditioned fear, we used two tests: a light switch-off test, in which rats escape to the other compartment of a shuttle-box to turn off an aversive light and recordings of 22 kHz ultrasound vocalizations (USVs) during acute restraint stress. For the conditioned fear paradigm, we used fear potentiated startle in an aversive context and conditioned freezing using an aversive context as the conditioned stimulus. In both tests of conditioned fear there were no gender or estrous cycle-linked differences in emotional reactivity. However, with respect to unconditioned fear, female rats in late diestrus showed greater emotional reactivity expressed as switch-off responses to a light environment and USVs in response to restraint compared to other phases of the cycle. These findings suggest that the hormonal profile during the late diestrus phase may predispose to up-regulated emotional reactivity in rats facing emotional challenges to unconditioned, but not conditioned fear-inducing stimuli.

Key words: Females, Unconditioned and Conditioned Fear, Startle, Freezing, Escape Behavior, USVs

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
Aspectos evolutivos das emoções	12
Comportamento Defensivo e as respostas de medo e ansiedade	13
Controle hormonal do comportamento sexual feminino	16
Modelos animais de ansiedade	20
<i>Sobressalto potencializado pelo medo (SPM)</i>	21
<i>Congelamento condicionado ao contexto</i>	22
<i>Resposta de desligamento da luz - Light switch off</i>	23
<i>Respostas de vocalização ultrassônicas de 22 kHz durante o estresse de restrição.</i>	23
OBJETIVO	25
MATERIAIS E MÉTODOS	27
Comitê de Ética	28
Experimento 1: Sobressalto potencializado pelo medo ao contexto.	30
<i>Equipamentos</i>	30
<i>Procedimentos</i>	30
Experimento 2: Congelamento condicionado ao contexto	31
<i>Equipamentos</i>	31
<i>Procedimentos</i>	32
<i>Equipamentos</i>	33
<i>Procedimentos</i>	33
Experimento 4: Respostas de vocalização durante o estresse de restrição.(VUS)	34
<i>Equipamentos</i>	34
Eutanásia	36
Análise estatística	37
RESULTADOS	38
Experimento 1: Sobressalto potencializado pelo medo ao contexto.	39

Experimento 2: Congelamento condicionado ao contexto _____	39
Experimento 3: Resposta de desligamento da luz (<i>light switch-off</i>) _____	40
Experimento 4: Respostas de vocalização durante o estresse de restrição _____	43
DISCUSSÃO _____	45
CONCLUSÕES _____	51
REFERÊNCIAS _____	53

Aspectos evolutivos das emoções

As emoções, simplificadaamente, referem-se às reações psicomotoras associadas às alterações neurovegetativas. O medo, por exemplo, é caracterizado pelo o aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da respiração, da piloereção, micção, defecação e exoftalmia ocorridas frente a um estímulo ambiental aversivo (BRANDÃO, 2012).

O estudo das emoções possui um longo caminho histórico, dando início em 1872 quando o cientista Charles Darwin publicou o livro “A expressão das emoções nos homens e nos animais”, onde ressalta os aspectos evolutivos das emoções e traz duas contribuições fundamentais para o tema.

A primeira aponta que as emoções de animais em geral se aproximam das emoções em homens, e a segunda sugere a existência de um conjunto de emoções fundamentais como raiva, medo, tristeza, e que estão presentes nas diferentes espécies. Essas duas ideias tiveram influência sobre a neurociência das emoções, promovendo a possibilidade do uso de animais em pesquisas a fim de compreender quais são os circuitos e estruturas cerebrais envolvidos na neurobiologia das emoções em seres humanos (DALGLEISH, 2004).

Ainda no século XIX, teorias para explicar as emoções foram propostas. A teoria de James – Lange sugeriu que a emoção era uma consequência de um estado fisiológico causado por um estímulo, e que sem esta manifestação fisiológica a emoção não existiria.

Já a Teoria de Cannon - Bard foi uma das primeiras a propor o envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) na causa das experiências subjetivas e das reações fisiológicas e comportamentais das emoções, postulando que o hipotálamo seria o responsável pelas manifestações emocionais e o córtex e o tálamo teriam o papel de inibição destas respostas hipotalâmicas. Esta ideia de que o SNC estaria no cerne das regulações emocionais possibilitou aos neurocientistas realizar experiências a fim de tentar revelar as bases neurais das emoções.

Nessa premissa, Papez sugeriu a noção de que a expressão das respostas emocionais não era responsabilidade de uma estrutura isolada, mas sim de um circuito neural com múltiplas estruturas envolvidas que se projetam uma para as outras, de maneira recíproca e cada estrutura teria a sua função fundamental do processamento emocional. O Circuito de Papez, como foi primeiramente nomeado, era composto inicialmente pelo Córtex Cingulado, Hipotálamo, Hipocampo e Núcleo anteriores do Tálamo (LEDOUX, 1998; LENT, 2002; DALGLEISH, 2004).

A partir desse momento as pesquisas para compreender as estruturas e as vias neurais da expressão das emoções foram avançando, conseqüentemente, outras áreas cerebrais com

importantes funções no comportamento emocional foram descobertas. Um exemplo disso é o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal (SCP), ambas fundamentais para a expressão e a percepção das respostas comportamentais defensivas (LEDOUX, 1998; LENT, 2002; BRANDÃO, 2012).

Comportamento Defensivo e as respostas de medo e ansiedade

As respostas comportamentais e fisiológicas emitidas frente a estímulos ameaçadores foram filogeneticamente selecionadas no intuito de manter a sobrevivência das espécies (GRAEFF, 2004) cujo padrão da resposta defensiva depende das características do estímulo aversivo, como a distância e a intensidade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989b).

Estímulos aversivos potenciais ou distantes ao animal vão eliciar as seguintes respostas defensivas:

Avaliação de risco: Comportamento defensivo que ocorre na ausência do estímulo ameaçador. Induz um estado de alerta no animal e tem o objetivo de realizar um escaneamento do ambiente à procura de sinais ameaçadores (SHUHAMA et al., 2007).

Congelamento: Corresponde a uma total imobilidade, exceto nos movimentos respiratórios. É uma resposta emitida como estratégia quando o estímulo ameaçador é real, mas ainda se encontra distante do animal (BLANCHARD et al., 1989; SHUHAMA et al., 2007).

Quando o estímulo ameaçador é de uma intensidade maior e está próximo do animal, as respostas defensivas são:

Fuga: Uma resposta emitida quando a ameaça está muito próxima do animal e este tem a possibilidade de escapar, pois o ambiente proporciona rotas de fuga com lugares seguros, por exemplo, como uma toca, (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989b; SHUHAMA et al., 2007).

Ameaça defensiva / Luta: Quando o perigo está bem próximo e rotas de fuga não são disponíveis, o animal ameaçado adota uma postura de defesa, emitindo vocalizações, adotando um olhar mais alto e ameaçador, sinalizando para o oponente a possibilidade de um ataque (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989b; SHUHAMA et al., 2007).

Estes comportamentos de defesa são indicadores emocionais de medo e possibilitam, através de sua mensuração, um melhor entendimento das bases neurais desta emoção (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989b). O medo pode ser eliciado tanto por um estímulo incondicionado - que não envolve nenhum tipo de aprendizagem -, quanto um estímulo de natureza condicionado - que envolve uma aprendizagem associativa, de um estímulo neutro com um estímulo aversivo (LENT, 2002; GROSS; CANTERAS, 2012). Por ser uma emoção amplamente estudada, já se tem um entendimento mais aprofundado das bases neurais

envolvidas nas expressões das respostas de medo (LEDOUX, 1998).

O complexo amigdalóide, por exemplo, é uma das principais estruturas envolvidas na circuitaria do medo. Composta por três núcleos (basolateral, central e medial), ele tem a função de avaliar o nível da ameaça dos estímulos sensoriais e frente a uma ameaça ela dispara sinais neurais para outras estruturas límbicas com a finalidade de desencadear reações emocionais defensivas (LENT, 2002; BRANDÃO, 2012; GROSS; CANTERAS, 2012).

O hipotálamo também faz parte das bases neurais das reações de medo, pois além de controlar a homeostase corporal, possui componentes de respostas motoras, autonômicas e endócrinas que têm a função de um interruptor que permite a geração e a elaboração das respostas emocionais (LENT, 2002; BRANDÃO, 2012; CANTERAS; GRAEFF, 2014).

Posteriormente, a circuitaria que será ativada irá depender da natureza e das características do estímulo aversivo. Estímulos condicionados e que estão distantes do animal, ativam um circuito neural constituído, principalmente, pelo núcleo mediano da rafe, septo, hipocampo e SCP ventral, enquanto que estímulos intensos e próximos geram respostas incondicionadas de defesa, conhecidas por ataques de pânico em homens, e têm sua mediação por estruturas do tronco encefálico, como, por exemplo, a SCP dorsal (CANTERAS; GRAEFF, 2014).

As estruturas dos circuitos neurais do medo são organizadas de forma hierárquica no encéfalo, e quanto mais caudal a estrutura no encéfalo, mais primitiva e comum a outras espécies serão as repostas defensivas como no caso das repostas de pânico. E quanto mais cortical a estrutura, maior a subjetividade e o refinamento da resposta comportamental, como a ansiedade (Figura 1).

Esta emoção, que está intimamente relacionada ao medo, é definida como uma sensação subjetiva de tensão e, na ausência do estímulo aversivo, é acompanhada por respostas autonômicas simpáticas, como taquicardia, aumento da pressão arterial, entre outras (BRANDÃO, 2012). Também possui função adaptativa e motivacional, preparando o indivíduo para ter um desempenho satisfatório em uma determinada tarefa (BRANDÃO, 2012). Porém, quando a tensão e as respostas fisiológicas estão presentes de maneira frequente e generalizada para diferentes estímulos, a ansiedade se torna patológica (LENT, 2002).

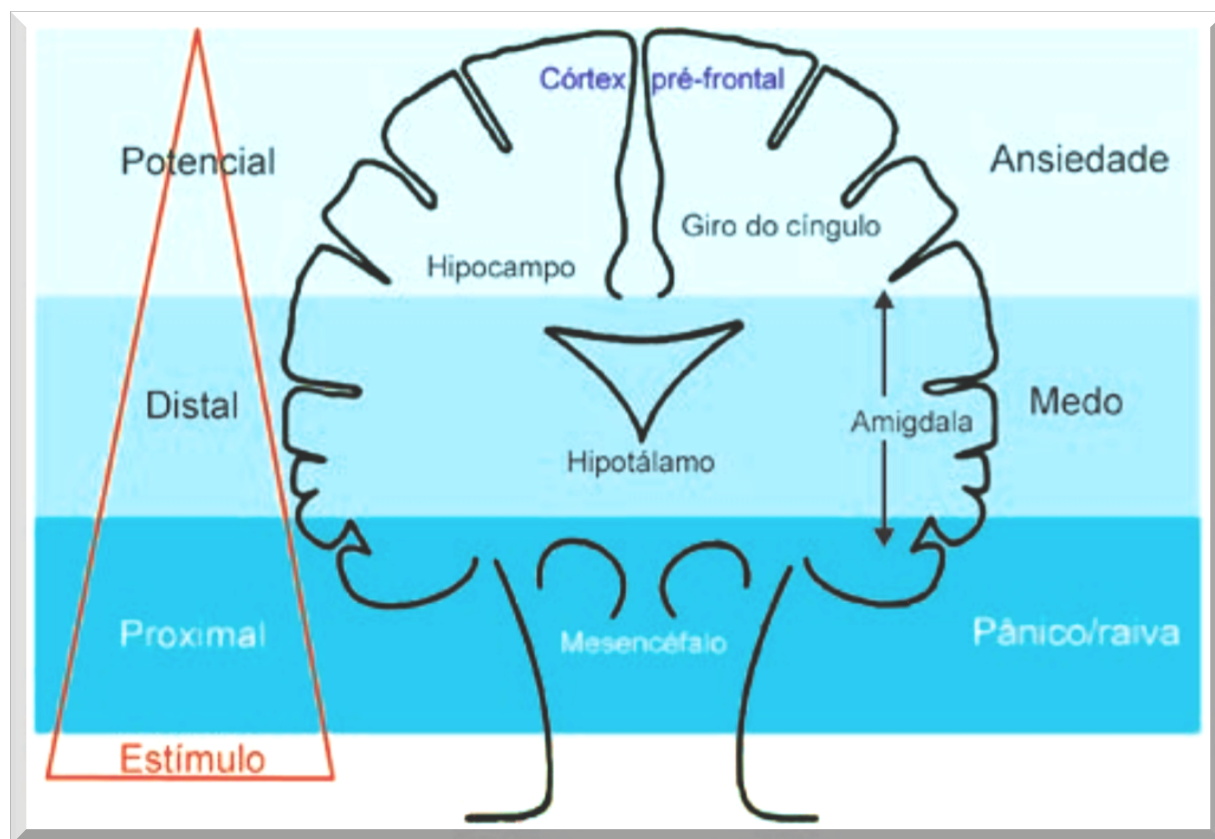


Figura 1: Esquema mostrando a relação hierárquica do tipo de resposta emocional em função da intensidade ou distância de estímulos ameaçadores. Quanto mais ameaçador e intenso o estímulo, maior é a ativação das estruturas do tronco encefálico e, conseqüentemente, mais primitiva e desorganizada será a resposta de defesa. Quando a ameaça está distante, ou é apenas potencial, estruturas mais rostrais no encéfalo são ativadas e proporcionam respostas comportamentais de defesa mais organizadas (BRANDÃO, 2012).

Compreender as bases neurais do medo e da ansiedade em estudos pré-clínicos utilizando uma abordagem evolutiva é importante, pois abre caminho para um melhor entendimento das manifestações dessas emoções em Homens, principalmente quando se refere a estados patológicos como transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico (TP), transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), entre outros (BRANDÃO, 2012).

Estas patologias estão cada vez mais presentes na população e, curiosamente, mulheres apresentam uma maior prevalência de transtornos de ansiedade do que homens (MCLEAN et al., 2011; KESSLER et al., 2012). Considerando este fato, estudos têm mostrado que mulheres apresentam uma maior reatividade a estímulos ameaçadores quando comparadas com homens (WILLIAMS et al., 2005).

Esta reatividade e a manifestação dos TAG e TP, em mulheres, muitas vezes sofre um agravamento durante a fase lútea tardia do seu ciclo menstrual (CAMERON et al., 1988; KASPI

et al., 1994; SIGMON et al., 2000; NILLNI; TOUFEXIS; ROHAN, 2011). Pressupondo possíveis indícios de uma influência da flutuação hormonal durante o ciclo menstrual na manifestação dos sintomas nesses transtornos.

Pensando nisso, percebe-se uma maior necessidade em se compreender o funcionamento dos ciclos hormonais femininos em diversos distúrbios de natureza emocional.

Controle hormonal do comportamento sexual feminino

O controle do sistema reprodutor feminino é realizado por um conjunto de hormônios secretados tanto por estruturas encefálicas, hipófise anterior e o hipotálamo, quanto pelas gônadas, que no caso de fêmeas são os ovários. Cada hormônio tem sua função específica a fim de manter o equilíbrio das funções reprodutivas (FREEMAN, 2006; CARLSON, 2012).

O hipotálamo, estrutura cerebral responsável em manter a homeostase do organismo, libera o hormônio regulador de gonadotrofina (GnRH) responsável por sinalizar à hipófise anterior a liberação dos hormônios gonadotróficos: hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Ambos irão agir nos ovários ativando o funcionamento do ciclo sexual feminino. O FSH irá estimular o crescimento e o amadurecimento do folículo ovariano. Este, por sua vez, fará com que o ovário libere hormônios gonadais, principalmente o estradiol, que irá preparar o útero para uma possível fecundação, após a ovulação. O estradiol, através de uma resposta de *feedback* irá sinalizar à hipófise anterior o momento de secretar o LH que tem a função de estimular a ovulação, e em seguida auxiliar no desenvolvimento do corpo lúteo que aumentará a secreção de progesterona, hormônio que irá preparar o organismo para uma gestação, caso o óvulo seja fecundado. Quando a fertilização do óvulo não ocorre, o corpo lúteo irá parar a produção de progesterona e, conseqüentemente as paredes do útero começarão a descamar, dando início à menstruação, no caso das mulheres (FREEMAN, 2006; CARLSON, 2012). Este processo de controle do ciclo hormonal funciona por respostas de *feedback* negativo (Figura 2), onde a secreção de estradiol e progesterona irá sinalizar para a hipófise anterior que a secreção de FSH ou LH é ou não é necessária naquele determinado momento (CARLSON, 2012).

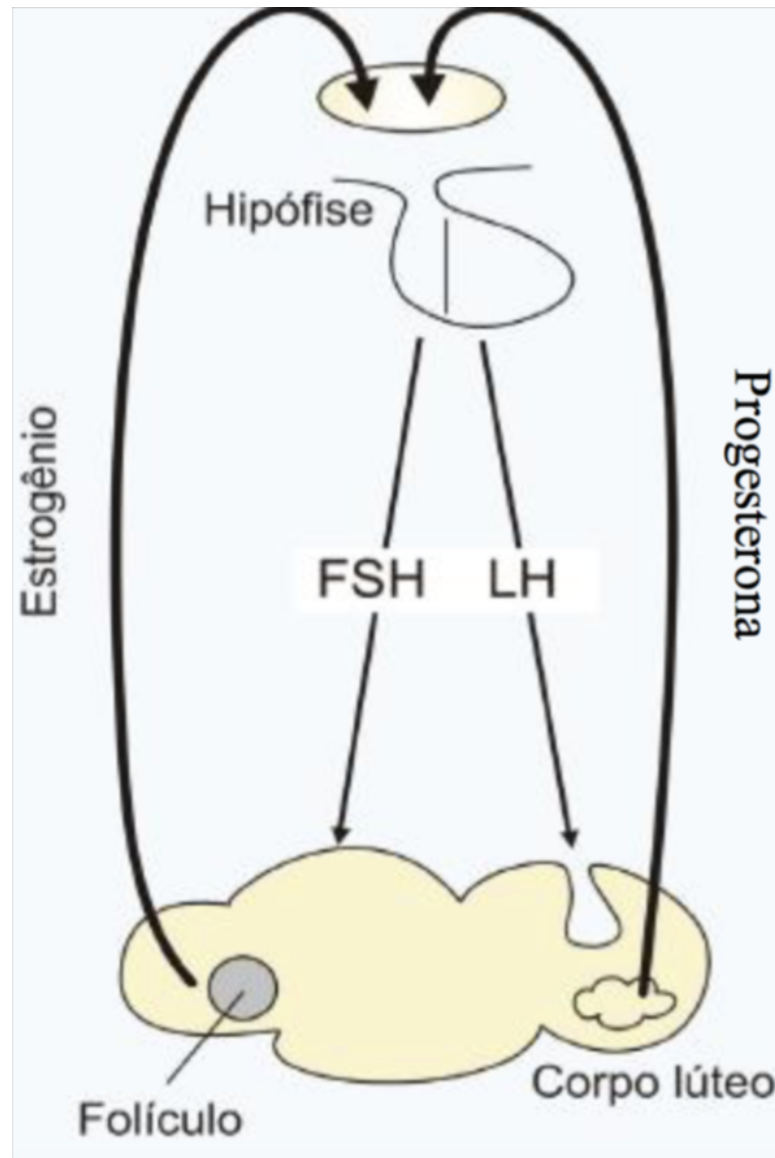


Figura 2: Esquema ilustrativo do sistema de *feedback* negativo que ocorre durante o ciclo hormonal feminino. A hipófise anterior irá liberar hormônios gonadotróficos (FSH e LH) que irão agir nas gônadas, que, por sua vez, irá liberar os hormônios ovarianos (estradiol e progesterona), que irão sinalizar para o hipotálamo e hipófise anterior a liberação dos hormônios gonadotróficos (BRANDÃO, 2012).

Além das funções no comportamento reprodutivo feminino, o estradiol e a progesterona têm a propriedade de atravessar a barreira hematoencefálica. Pesquisas já têm demonstrado que as alterações nas concentrações de estradiol e progesterona no plasma sanguíneo ocorrem paralelamente às suas flutuações no cérebro (LOVICK, 2014). Receptores de estradiol e progesterona estão presentes em algumas estruturas cerebrais, como por exemplo as estruturas responsáveis pelo comportamento defensivo e, conseqüentemente, as alterações hormonais ocorridas durante o ciclo influenciam no funcionamento dessas estruturas, podendo refletir nas

respostas emocionais em fêmeas (LOVICK, 2014).

O avanço na compreensão das influências dos hormônios gonadais no funcionamento cerebral tem sido facilitado com a utilização de ratas em pesquisas comportamentais. Além da fácil manipulação experimental, as ratas ciclaram espontaneamente e o padrão hormonal do ciclo estral possui semelhanças com os padrões hormonais do ciclo menstrual.

O ciclo estral de ratas tem a duração de 4 ou 5 dias e possui quatro fases: proestro, estro, diestro 1 e diestro 2 (MANDL, ; EVANS; LONG, 1922). A fase do proestro tem duração aproximada de 12 a 14h e se caracteriza pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona. O estro, com duração de 25 a 27h, é a fase em que acontece a ovulação e a queda das concentrações hormonais. A fase seguinte, o diestro 1 é a mais rápida, 6 a 8h, e apresenta baixos níveis plasmáticos de estradiol acompanhado por um segundo aumento dos níveis de progesterona (SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). O diestro 2, no entanto, é a fase mais duradoura, 55 a 57h, na qual acontece a queda abrupta da concentração de progesterona (SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999; LOVICK, 2014) (Figura 3).

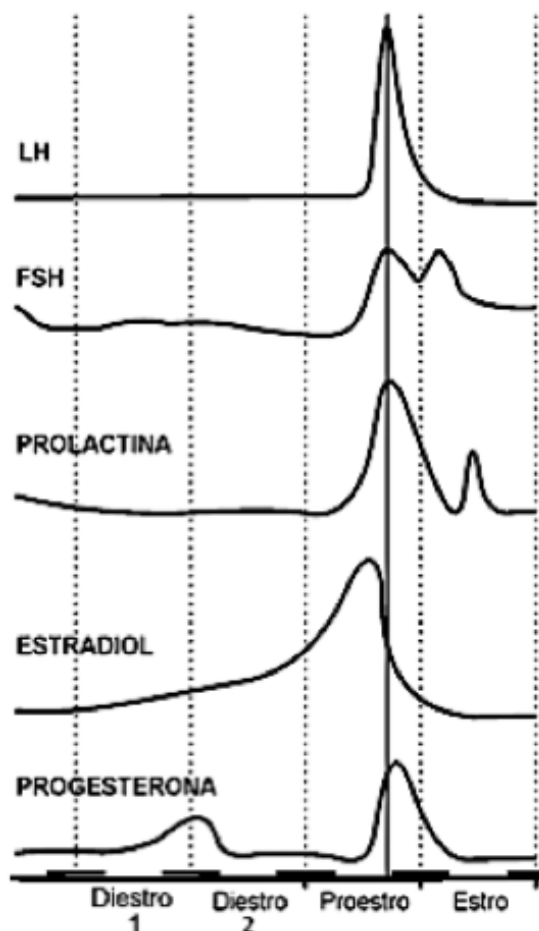


Figura 3: Ilustração esquemática do ciclo estral de 4 dias da rata. Observam-se as concentrações de estradiol, de

progesterona, dos hormônios FSH e LH e da prolactina no soro. A ovulação normalmente ocorre durante as primeiras horas da manhã do estro, aproximadamente 10 a 12 horas após o surgimento de LH (ANSELMO-FRANCI; SZAWKA, 2005).

Influências do estradiol e da progesterona nas repostas comportamentais de fêmeas.

A despeito do escasso número de pesquisas que utilizaram a fêmea como animal experimental, estudos já têm mostrando as influências do estradiol e da progesterona na estrutura e funcionalidade do cérebro (DEVALL et al., 2015), oferecendo novas possibilidades para compreender as respostas emocionais.

A ação cerebral do estradiol é mediada por dois subtipos de receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$. O primeiro atua regulando as funções neuroendócrinas reprodutivas, enquanto que o segundo tem um importante papel em regular funções neuroendócrinas que não estão associadas com a reprodução, sendo por isso o principal foco dos estudos da influência do estradiol na cognição e humor feminino (LUND et al., 2005).

Estruturas cerebrais como hipocampo, amígdala e núcleo dorsal da rafe que estão presentes nos circuitos emocionais de medo, apresentam expressões de receptores $ER\beta$, talvez, justificando a influência deste hormônio no comportamento cognitivo e emocional em fêmeas (VARGAS et al., 2016).

Resultados clínicos e pré-clínicos anteriores mostraram que a ativação dos receptores $ER\beta$, através de tratamento hormonal com estradiol, melhorou o desempenho de mulheres em tarefas de memória (KAMPEN; SHERWIN, 1994; SHERWIN, 1998); e ratas na fase do estro, onde há uma maior secreção de estradiol, extinguiram o aprendizado de uma memória aversiva em menor tempo quando comparadas as ratas que estavam nas outras fases do ciclo (MILAD et al., 2009). Estas são algumas evidências do papel protetivo do estradiol na saúde cognitiva feminina (VARGAS et al., 2016).

Quanto à atuação da progesterona, estudos também apontam influências no comportamento emocional feminino, observando uma maior reatividade emocional durante a fase do ciclo que apresenta queda dos níveis de progesterona (LOVICK, 2014). Já está bem estabelecido que a reatividade emocional consequente da retirada de progesterona é devido ao declínio da concentração cerebral de seu metabólito neuroativo, a alopregnanolona (ALLO), e não à progesterona em si (SMITH et al., 1998; BITRAN; SMITH, 2005). A ALLO atua como um modulador dos efeitos do neurotransmissor inibitório GABA associados aos receptores GABA-A

(PAUL; PURDY, 1992). Pesquisas recentes mostram que a queda rápida de progesterona (e por consequência da ALLO) promove alterações na expressão de receptores GABA-A localizados em interneurônios GABAérgicos da SCP, que como já descrita anteriormente é uma região que está envolvida no comportamento defensivo (LOVICK, 2006).

Como consequência, ocorre uma inibição do tono inibitório na parte dorsal da SCP (BRACK; LOVICK, 2007), que acarreta uma reatividade elevada deste substrato neural. Este fato pode estar intimamente relacionado à maior reatividade feminina, principalmente nas fases de baixa hormonal onde sintomas TAG, TP e TEPT estão mais presentes.

Embora já existam algumas descobertas de quais são as influências dos hormônios femininos nas respostas comportamentais, ainda existem poucos estudos que examinam as influências dos diferentes estágios hormonais no processamento da reatividade emocional, talvez pela dificuldade de se encontrar um modelo comportamental que seja sensível às flutuações hormonais.

Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais são ferramentas utilizadas em pesquisas de neurociências com finalidade de ter uma compreensão mais detalhada dos diferentes aspectos, como a etologia e sintomatologia das diferentes psicopatologias (TREIT; ENGIN; MCEOWN, 2010). Existem diferentes tipos de modelos animais, que medem variados padrões de resposta comportamentais e para que um modelo animal seja estabelecido, uma análise criteriosa é necessária. Neste processo de análise, três aspectos de validação são avaliados: validade de face, validade de constructo e validade preditiva. Isto quer dizer que o modelo animal precisa englobar aspectos teóricos e sintomatológicos da patologia, aspectos etológicos e por fim, precisa ser sensível a tratamentos farmacológicos utilizados para o tratamento da patologia (PALANZA, 2001; CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009).

Quando se trata de utilizar modelos animais com a finalidade de compreender como as psicopatologias são manifestadas em fêmeas, pesquisadores muitas vezes se deparam com um impasse, pois os modelos comportamentais desenvolvidos até agora têm os aspectos de validação baseados em respostas comportamentais de machos. Logo, na maioria das vezes, acabam não sendo totalmente fidedignos para detectar nuances nas respostas comportamentais das fêmeas e qual tipo de paradigma comportamental de medo, inato ou aprendido, é mais sensível para detectar as influências da alteração hormonal durante o ciclo (PALANZA, 2001).

Modelos animais de medo condicionado envolvem um paradigma de aprendizagem por associação de estímulos. Um estímulo inócuo (luz, som, contexto) para o rato passa a sinalizar

um perigo potencial, após um emparelhamento desse estímulo com um estímulo aversivo (choque nas patas). Assim, o estímulo que se tornou condicionado passa a desencadear as respostas neurofisiológicas e de defesa no animal (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Como o modelo de sobressalto potencializado pelo medo e o congelamento condicionado ao contexto.

Sobressalto potencializado pelo medo (SPM)

O sobressalto é uma resposta defensiva reflexa súbita que envolve o padrão comportamental, de fechamento dos olhos, contração do pescoço e músculos esqueléticos; é desencadeado por variados tipos de estímulos aversivos, um exemplo é o barulho alto. Esta resposta defensiva tem a função de proteger o organismo de uma lesão causada por um predador ou por um golpe (BROWN; KALISH; FARBER, 1951; KOCH, 1999).

No protocolo experimental de SPM, o som alto que induz o sobressalto é apresentado junto com um estímulo condicionado explícito (luz) ou implícito (contexto) que foi previamente emparelhado com um estímulo aversivo (choque nas patas). Mesmo sem a presença do estímulo aversivo, a amplitude da resposta reflexa é potencializada quando comparada com o sobressalto que foi desencadeado sem a presença do estímulo aversivo (DAVIS, 1986). Este é amplamente utilizado para mensurar respostas comportamentais de medo e ansiedade, sendo capaz de fazer com que o animal emita uma resposta de defesa na ausência do estímulo aversivo.

A utilização do modelo de sobressalto em estudos clínicos envolvendo diferença de gêneros mostrou que mulheres apresentam um aumento da resposta de sobressalto durante a fase lútea do ciclo menstrual (ARMBRUSTER et al., 2014; KOFLER et al., 2001).

No entanto um resultado oposto foi encontrado em estudo utilizando ratos, mostrou que há um aumento do sobressalto em machos comparado com as fêmeas (BŁASZCZYK; TAJCHERT, 1996).

Utiliza-se para esse estudo o protocolo de sobressalto potencializado pelo medo no condicionamento ao contexto, para medir respostas comportamentais de medo condicionado e ansiedade em fêmeas. Pesquisas utilizando esse protocolo experimental já foram realizadas em laboratório com animais experimentais machos (SANTOS et al., 2005; REIMER; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008).

Congelamento condicionado ao contexto

Fundamentado no procedimento do condicionamento Pavloviano, o animal experimental é exposto a um contexto novo e após algum tempo de exploração, choques elétricos nas patas são apresentados fazendo com que aquele contexto se torne aversivo. No momento do teste, o animal é reexposto ao contexto condicionado, sem a apresentação do estímulo aversivo e a resposta comportamental mensurada é a de congelamento (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). O congelamento consiste na imobilidade total, exceto por movimentos respiratórios do animal e faz parte do conjunto de comportamentos defensivos frente a um estímulo aversivo distal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989a).

Os machos apresentam uma maior resposta de medo condicionado do que as fêmeas. Nas fêmeas, tanto a aquisição do condicionamento aversivo, quanto à expressão desse comportamento parece ocorrer de maneira uniforme entre as quatro fases do ciclo (MILAD et al., 2009), indicando, talvez, que todos os grupos experimentais foram condicionados.

Algo importante de se ressaltar é que a grande maioria de experimentos utilizando o modelo comportamental de medo condicionado ao contexto utiliza uma janela temporal de 24 horas entre o aprendizado e o teste, para garantir a consolidação da memória aversiva (BORELLI et al., 2013; DE SOUZA CAETANO; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2013; REIS et al., 2016). Contudo, há estudos que indicam que a sinalização molecular para a formação de uma memória, principalmente daquelas que envolvem eventos estressores, tem início 3 horas após o acontecimento (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

Pensando nisso, com a finalidade de minimizar um possível viés da mudança das fases do dia do condicionamento para o dia do teste e diminuir o número de animais utilizados, optou-se por realizar nesse estudo um protocolo adaptado de Almada (et al. 2009), onde o animal passa pelo condicionamento em um contexto aversivo e, 6 horas depois, seu congelamento é medido tanto no contexto A onde ele não recebeu choque, quanto no contexto B, onde ocorreu o condicionamento aversivo. Este protocolo proporciona uma tentativa de diminuição da variabilidade das respostas, pois os animais são controle deles mesmo.

Modelos animais de medo incondicionado são etologicamente fundamentados e tentam mimetizar situações onde o animal experimental apresente respostas comportamentais de defesa na presença ou ameaça de estímulos naturalmente aversivos para ele (LISTER, 1990; CAMPOS et al., 2013). Como exemplos para ilustrar esse paradigma, têm-se o modelo de desligamento da luz (*Light switch off*), e a mensuração de vocalizações ultrassônicas na frequência de 22 kHz durante o estresse de restrição.

Resposta de desligamento da luz - Light switch off

O roedor é um animal noturno, logo, locais com muita luz acabam se tornando ansiogênicos, pois deixam os animais alvo vulneráveis a predadores, por isso existe uma tendência inata dos roedores em evitar a escapar de locais muito iluminados (BOURIN; HASCOËT, 2003; REIS et al., 2004). Nesse modelo, o animal é exposto a um contexto, uma *shuttle box* de dois compartimentos, onde uma luz brilhante, aversiva para o animal é acesa, por um período curto de tempo. O animal tem a possibilidade de desligar a luz movendo – se para o outro lado da *shuttle box* (REIS et al., 2004; SAITO; BRANDÃO, 2016).

Este modelo vem sendo validado pelo laboratório de pesquisas utilizado para estudo e resultados prévios mostram uma sensibilidade da resposta comportamental de machos a drogas serotoninérgicas, mas não a drogas benzodiazepínicas (SAITO; BRANDÃO, 2016), tornando-se interessante como modelo de estudo de medo incondicionado. Trabalhos com a utilização de fêmeas em protocolo similar ainda não existem na literatura.

O medo inato de roedores a áreas luminosas é constatado pelo comportamento de desligar rapidamente o estímulo aversivo. As respostas de cruzamento de um compartimento ao outro durante o período escuro do teste servem como controle das respostas no claro, bem como mede a atividade ou condição motora do animal e sua capacidade de habituação ao novo contexto. Algumas vantagens para a utilização desse modelo são observadas, entre elas a replicabilidade e por não ser um teste invasivo, onde minimiza o estresse do próprio procedimento (SAITO; BRANDÃO, 2016) podendo ser um modelo adequado para medir a reatividade emocional das fêmeas, pois envolve apenas um dia de exposição ao modelo o que facilita no controle das fases do ciclo estral.

Respostas de vocalização ultrassônicas de 22 kHz durante o estresse de restrição.

A restrição é um modelo comportamental que visa restringir o movimento dos animais por um determinado período de tempo, vindo a manifestar respostas fisiológicas indicadoras de estresse, como a liberação de corticosterona, hormônio responsável por preparar o organismo para reagir em situações que desencadeiam respostas de estresse (BRUDZYNSKI; CHIU, 1995). Estudos com fêmeas mostram que elas apresentam uma tendência a serem mais sensíveis a esse tipo de estresse do que machos que parece se habituar ao estímulo estressor. Além do mais, fêmeas em estro apresentam níveis iniciais de concentração de corticosterona mais baixo quando comparado aos níveis iniciais desse mesmo hormônio em rata na fase do diestro

(BARON; BRUSH, 1979).

Uma das dificuldades de estudar a influência das reações de estresse nas diferentes fases do ciclo é que o próprio estresse pode fazer com que o ciclo seja interrompido (BARON; BRUSH, 1979). Portanto, o tempo da exposição à restrição precisa ser levado em consideração.

Estudos apontam que um tempo menor de 15 minutos já é o suficiente para desencadear respostas defensivas (BARON; BRUSH, 1979). Assim, opta-se por expor o animal à restrição por um período de 10 minutos e registrar as respostas de vocalização, sem alterações das funções hormonais.

As vocalizações ultrassônicas são respostas emitidas por ratos para outros membros do grupo social com finalidade de comunicar seu estado emocional. Produção de vocalizações sociais é uma atividade antiga evolutiva dos vertebrados. Ratos vocalizam, principalmente em duas frequências de 22 kHz e 50 kHz. A primeira é emitida em situações de perigo, por isso é considerada com um parâmetro de resposta defensiva de animais expostos a um evento ameaçador. A principal função é alertar o grupo social sobre possível presença de predadores. Por outro lado, a frequência de 50 kHz é emitida para sinalizar situações prazerosas (BLANCHARD et al., 1992; BRUDZYNSKI; OCIEPA, 1992; BRUDZYNSKI; CHIU, 1995; BRUDZYNSKI, 2013).

Uma vez que se quer medir respostas frente a estímulos aversivos, o foco será medir as vocalizações na frequência de 22 kHz. Sua acústica é caracterizada por uma baixa frequência de pico (20-30 kHz) com duração muito longa, e são monótonas, isto é, a frequência permanece praticamente inalterada para a duração (BRUDZYNSKI, 2013). O número e tempo das vocalizações dependem de alguns fatores como intensidade do estímulo aversivo e idade do animal (TOMAZINI et al., 2006; PORTFORS, 2007; BASSI et al., 2007).

Os estudos com fêmeas, encontrados na literatura, enfatizam o papel social da vocalização para encontro de parceiros (SNOEREN; ÁGMO, 2014; BÖRNER et al., 2016), não tem sido encontrado nenhum estudo que avalia a influência hormonal no número e o tempo de vocalizações na frequência de 22 kHz de fêmeas.

Ainda existem poucos estudos na literatura que examinam as influências dos diferentes estágios hormonais no processamento da reatividade emocional de fêmeas. Quando essas diferenças dos estágios hormonais são consideradas, muitas vezes são descritas como consequência de uma série de fatores independentes, como a cepa de animais, peso, clima e experimentador (LÓPEZ-AUMATELL et al., 2011) e na maioria das vezes as fases do ciclo estral não são levadas em consideração resultando muitas vezes em resultados contraditórios.

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a extensão da influência dos diferentes níveis hormonais do ciclo estral de ratas sobre a reatividade emocional em modelos comportamentais de medo condicionado e incondicionado. Especificamente, será testada a hipótese de que a alteração hormonal do diestro 2 aumenta a reatividade comportamental das ratas a um estímulo estressor inato e aprendido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de Ética

Declaro que todos os experimentos receberam aprovação formal (processo 15.1.735.59.7) da Comissão de Ética de uso de animais em pesquisas (CEUA) da Universidade de São Paulo e foram realizados em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento, que estão em conformidade com os US National Institutes of Health Guide para o Cuidado e Uso de Animais de laboratório. Além disso, o número de animais usado foi o mínimo necessário para assegurar a confiabilidade estatística dos dados, e com todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais.

Animais

Foram utilizadas 114 fêmeas e 41 machos *Wistars* com idade aproximada de 60 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de quatro em caixas de polipropileno (45,0 x 35,0 x 15,0 cm) no biotério setorial do laboratório de Neuropsicofarmacologia, com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com água e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12h, com luzes acesas às 7h da manhã.

Esfregaço Vaginal

Ao longo de todas as etapas do estudo foi realizada a técnica de esfregaço vaginal, com a finalidade de identificar a fase do ciclo estral que cada rata se encontrava, antes e após as sessões experimentais, o que foi verificado em todas as fêmeas dos grupos experimentais apresentados a seguir. Esses esfregaços foram realizados todos os dias entre 8h e 9h e, após a repetição de dois ciclos regulares, as ratas foram encaminhadas para as sessões experimentais.

Uma alça de inoculação foi mergulhada em água e inserida na vagina da rata. Esta alça foi esterilizada entre um esfregaço e outro com a utilização de um isqueiro. O fluido retirado é espalhado em uma lâmina e, em seguida, corado com corante de uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) e analisado em microscópio. Alterações na aparência citológica dos esfregaços foram utilizadas para identificar as fases do ciclo estral: proestro, estro, diestro 1 e diestro 2 (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005). O ciclo estral possui 4 fases, cada uma com diferente configuração celular: a fase do proestro é caracterizada por uma abundância de células epiteliais nucleadas; a fase estro é caracterizada por células sem núcleos e cornificadas; o diestro 1 consiste na presença de leucócitos em abundância, com o núcleo contendo multi-lóbulos; diestro 2 é caracterizado por poucos leucócitos com o núcleo

difuso e com células se desintegrando (Figura 4). Apenas participaram dos experimentos os animais que apresentaram, pelo menos, dois ciclos regulares. Cada animal foi usado para apenas um dos quatro protocolos experimentais.

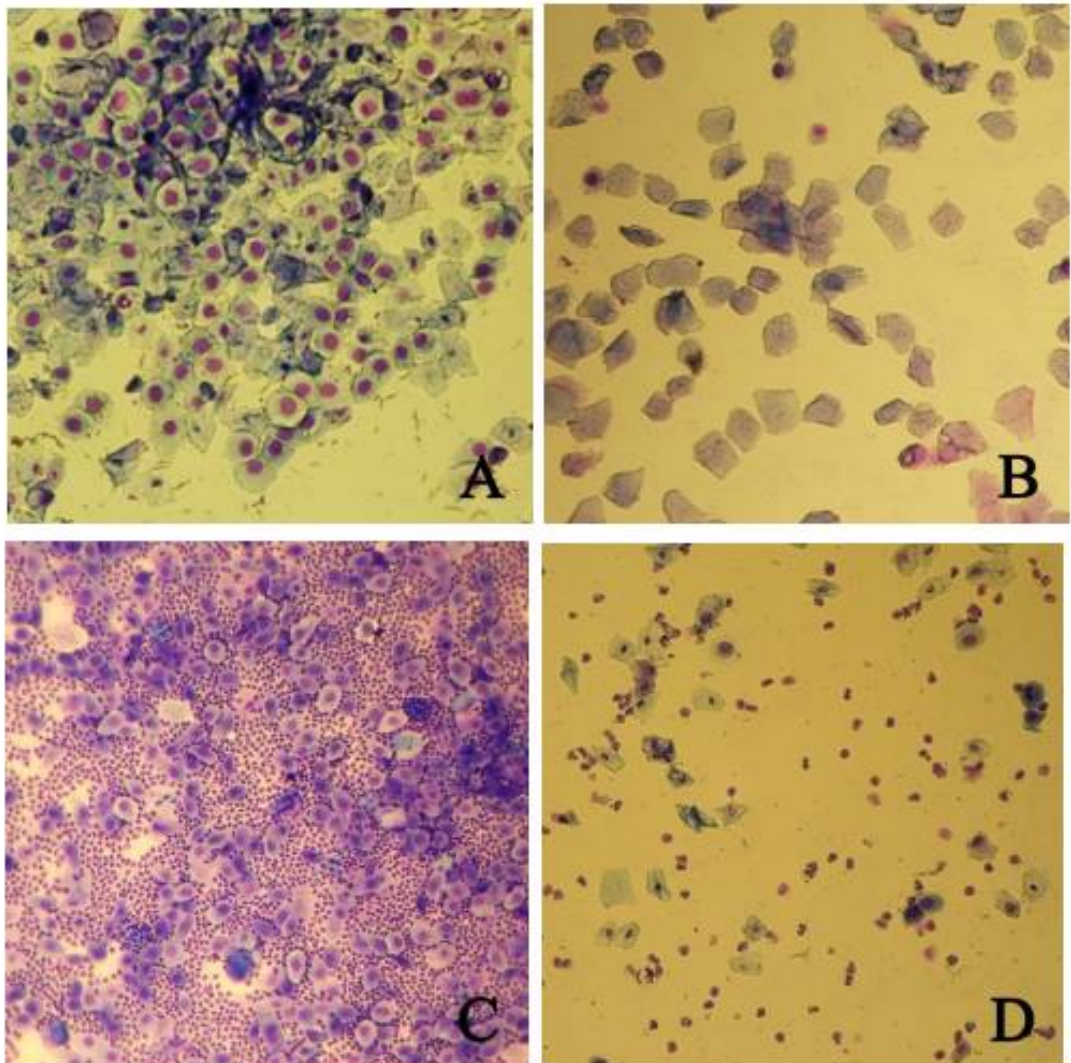


Figura 4: Imagem representativa das quatro fases do ciclo estral. A fase do proestro (A) é caracterizada por uma abundância de células epiteliais nucleadas; a fase estro (B) é caracterizada por células sem núcleos e cornificadas; o diestro 1 (C) consiste na presença de leucócitos em abundancia, com o núcleo contendo multi – lóbulos; diestro 2 (D) é caracterizado por poucos leucócitos com o núcleo difuso e com células se desintegrando. Foto tirada com a objetiva de 20x.

Experimento 1: Sobressalto potencializado pelo medo ao contexto.*Equipamentos*

Durante os procedimentos de balanceamento, condicionamento e teste foram utilizados uma caixa-contexto, medindo $16,5 \times 7,5 \times 7,5$ cm (ENV- 262^a, Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA), composta por duas paredes laterais de PVC branco e o restante por barras de aço inoxidável de 5,0 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si, com seu piso conectado a um gerador de choque com misturador de voltagem (Albarsch).

A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro PHM250 – 60, Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA) na qual a caixa foi firmemente fixada por meio de quatro parafusos. A resposta do animal gerou uma pressão nessa plataforma que foi captada por sensores e amplificada (PHM250-60, amplificador Medassociates, St. Albans, Vermont, EUA). O sinal analógico gerado foi digitalizado e analisado por um programa computacional (StartleReflex, versão 4.10. Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA) que representa graficamente os dados dessa resposta. A apresentação dos estímulos sonoros, duração, intensidade e amplitude também foram computadorizadas por meio de uma interface (Dig 729, Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA). A resposta de sobressalto foi medida durante os primeiros 100ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O estímulo de sobressalto acústico foi um ruído branco de intensidade de 100db e duração de 50ms, com tempo de subida e descida de 5ms, liberado por um alto-falante localizado a 10 cm de distância da caixa-contexto. O ruído de fundo é apresentado pelo mesmo alto-falante e constitui em um ruído branco de 55db. Uma lâmpada vermelha de 6w e uma câmera de vídeo instaladas dentro da câmara permite a observação dos animais. A plataforma foi calibrada no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos. A caixa se encontra abrigada em uma câmara de atenuação sonora ($64 \times 60 \times 40$ cm) feita em madeira e revestida com espuma para isolamento acústico (ENV- 018S, Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA).

Procedimentos

Sessões de Balanceamento: Foram realizadas duas sessões de balanceamento nas quais ratos machos e fêmeas foram colocados na caixa-contexto e, 5 minutos após, receberam 30 estímulos sonoros de intensidade de 100db com intervalo fixo de 30s entre cada estímulo. A amplitude média do sobressalto ao longo das trinta tentativas de estímulos sonoros da última sessão de balanceamento foi utilizada para alocar homoganeamente os animais aos diversos

grupos dos experimentos.

Sessão de Condicionamento: Os animais foram colocados na caixa-contexto e após 5 minutos de adaptação, receberam dez apresentações de choques inescapáveis nas patas com intensidade de 0,4 mA. Todos os choques tiveram duração de 1 segundo e intervalos interestímulo variável de 60 a 180 segundos.

Sessão Teste: No dia seguinte à sessão de condicionamento, os animais foram expostos à caixa-contexto. O protocolo estabelecido para a sessão teste foi idêntico ao da sessão de balanceamento. O procedimento experimental está de acordo com trabalhos publicados pelo nosso laboratório (SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006; ALMADA; ALBRECHET-SOUZA; BRANDÃO, 2013). (Figura 5).

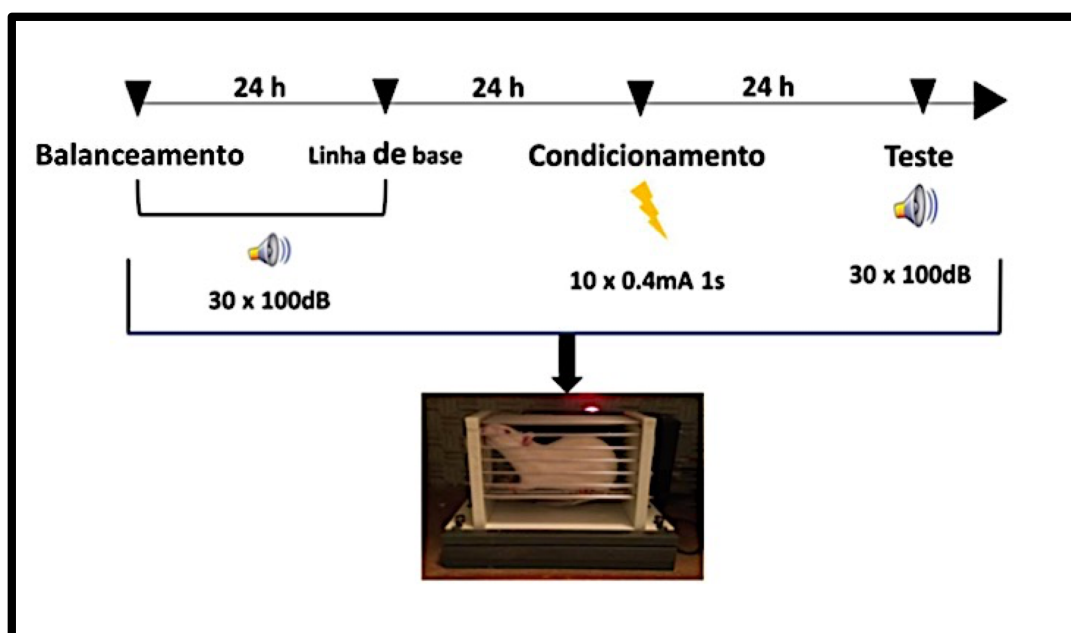


Figura 5: Representação esquemática do procedimento experimental e equipamento do modelo do SPM.

Experimento 2: Congelamento condicionado ao contexto

Equipamentos

Dois contextos distintos, contexto “A” e contexto “B”, foram usados para esse protocolo experimental. O Contexto “A” foi usado como contexto diferente. Consiste em uma caixa de acrílico transparente (20 x 30 x 35 cm) com um piso liso de aço inoxidável. Este aparato foi colocado dentro de uma caixa de madeira de isolamento acústico, com uma lâmpada branca de 40 W e um gerador de som que produzia 1 kHz de barulho de fundo. (72 dB; Insight Instruments). Contexto “B” foi usado para as sessões de condicionamento. Consiste em uma

caixa (48 × 26 × 25 cm) com paredes laterais e traseira feita de acrílico preto, o teto e a parede frontal são feitas de acrílico transparente. O piso consiste em 36 barras de aço inoxidável com espaço de 1,5 cm entre elas interligado ao programa de computador que ativa o choque nas patas. A caixa também foi colocada dentro de uma caixa de madeira com um autofalante e uma lâmpada vermelha de 15w e o gerador de som que produz um barulho de fundo de 1 kHz (72 dB; Insight Instruments).

Procedimentos

Habituação: No dia anterior às sessões de treino e teste, os animais foram expostos ao contexto “A” por 15 minutos. Esta habituação foi importante para diminuir o fator novidade ao contexto no dia do teste.

Treino: Os animais foram colocados no contexto “B” e depois de 5 minutos de um período de habituação, eles eram expostos à fase de treino, no qual cada animal recebeu 10 choques nas patas (0,6 mA, 1s) em um intervalo randomicamente variável de 30 à 120 segundos. Nenhuma pista explícita era apresentada entre os choques. Cada animal foi removido 5 minutos após o último choque e colocado de volta na sua gaiola viveiro. Sessões de treino duraram aproximadamente 20 minutos.

Teste: Após 6 horas da sessão treino, os animais foram expostos, primeiramente, ao contexto “A” e depois esses mesmos animais foram expostos ao contexto “B”, com o objetivo de medir o tempo gasto em congelamento durante um período de 8 minutos em cada contexto. O congelamento, para esse protocolo, foi operacionalmente definido como a total falta de movimento do animal, exceto por movimentos relacionados com a respiração, em um período de pelo menos 6 segundos (BOUTON; BOLLES, 1980; FANSELOW, 1980). A sessão de teste foi realizada no período da tarde (1pm – 3pm). Em todos os passos, as duas caixas eram limpas com álcool 20% antes da exposição de cada animal. Este procedimento foi baseado em um estudo prévio realizado nesse laboratório (ALMADA et al., 2009) (Figura 6).

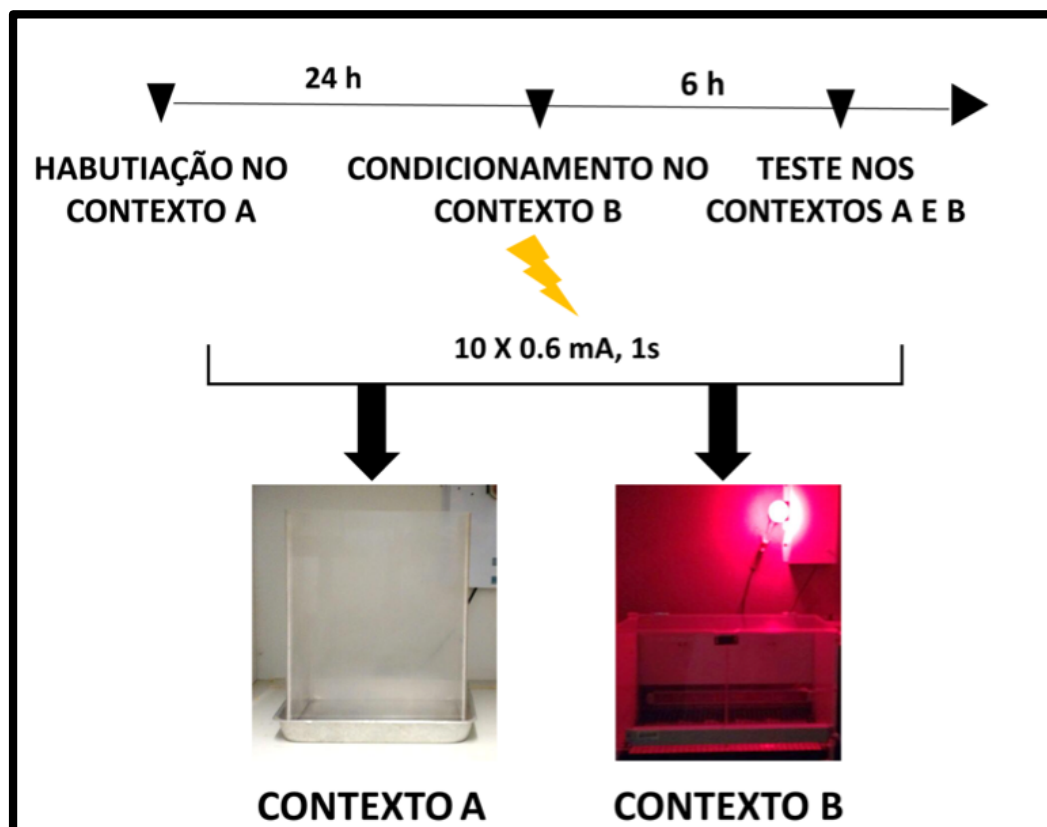


Figura 6: Representação esquemática do procedimento experimental e equipamentos do modelo de condicionamento ao contexto.

Experimento 3: Respostas de desligamento da luz (*light switch-off*)

Equipamentos

A caixa experimental consiste em uma caixa de esquiwa contendo dois compartimentos, medindo $30 \times 25 \times 25$ cm (Insight, Brasil). Com paredes laterais e fundo feitas de acrílico preto, teto e portas frontais feitas de acrílico transparente. O piso da caixa experimental é composto no total por 34 barras de aço inoxidável de 2.0 mm de diâmetro com o espaço de 1,2 mm entre elas. Duas lâmpadas de 40 V são localizadas em cada lado, na parte traseira da caixa, 12 cm do chão. Esta luz é ligada e desligada silenciosamente. A caixa experimental está localizada em uma sala ventilada ($2.5 \times 2.5 \times 1$ m).

Procedimentos

Os animais foram colocados do lado esquerdo da caixa de esquiwa e a sessão experimental começou após 5 minutos de habituação ao contexto. A sessão experimental consiste em 40 estímulos luminosos que são desligados quando o animal passa para o outro lado da caixa (desligar a luz = responder com 20s). Cada tentativa foi separada por um intervalo

fixo de 20s. O número de cruzamentos foi registrado pelo software do modelo comportamental (Insight, Brasil). O protocolo experimental está de acordo com trabalhos publicados pelo nosso laboratório (REIS et al., 2004; SAITO; BRANDÃO, 2016) (Figura 7).

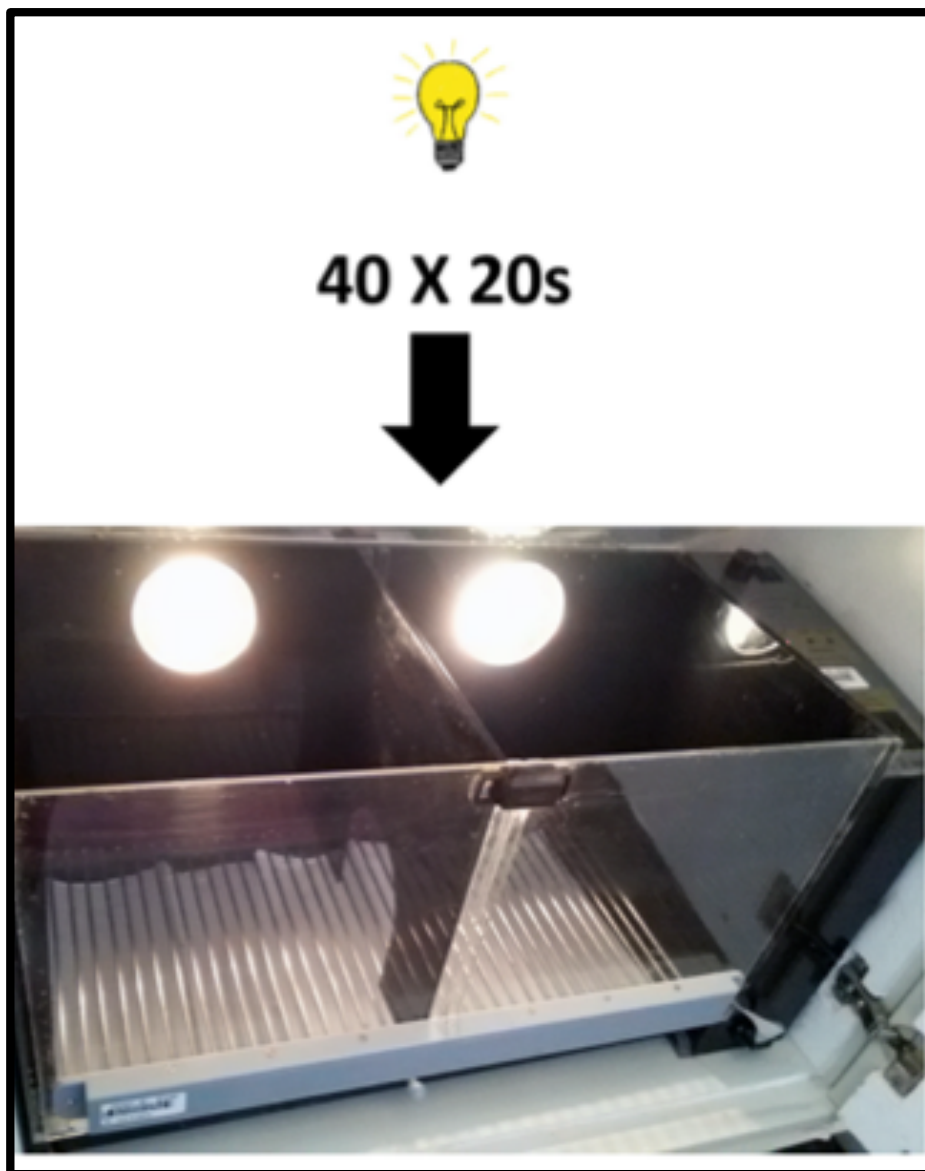


Figura 7: Representação esquemática do procedimento experimental e equipamento do modelo *light switch off*.

Experimento 4: Respostas de vocalização durante o estresse de restrição.(VUS)

Equipamentos

Consistiu em uma caixa de restrição, medindo $16,5 \times 7,5 \times 7,5$ cm (ENV- 262^a, Med Associates, St. Albans, Vermont, EUA), composta por duas paredes laterais de PVC branco e o restante por barras de aço inoxidável de 5,0 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. Esta

caixa também foi colocada dentro de uma caixa de madeira de isolamento acústico, com uma lâmpada branca de 40 W e um gerador de som que produzia 1 kHz de barulho de fundo (72 dB; Insight Instruments). Para as gravações e análises das respostas de vocalização foi utilizado um microfone de ultrassom Electret (Emkay FG-3629; AvisoftBioacoustics, Berlin, Germany) sensível a frequências 1-100 kHz com uma resposta de frequência plana, ligado através de um dispositivo de áudio USB 116 AvisoftUltraSoundGate (AvisoftBioacoustics) a um computador pessoal, onde os dados acústicos foram exibidos em tempo real por Avisoft Recorder (versão 2,7; AvisoftBioacoustics) e foram gravadas com uma taxa de amostragem de 214.285 Hz in16-formato de bits. Para análise acústica, gravações foram transferidas para SASLab Pro (versão 4,38; AvisoftBioacoustics) e uma transformação rápida de Fourier foi realizada (512 FFT-comprimento, 100% moldura, janela de Hamming, e 75% janela sobreposição de tempo). Espectrogramas foram produzidos em uma resolução de frequência de 488 Hz e uma resolução de tempo de 0,512 ms. Uma chamada de detecção foi fornecida por um algoritmo baseado em limiares automático (limite: -10 dB; iniciar limiar / fim: -20 dB) e um mecanismo de tempo de espera (tempo de espera: 20 ms). Uma frequência de corte inferior de 1 kHz foi utilizada para a análise dos parâmetros USV.

Diante disso, vários parâmetros, incluindo o pico de frequência e amplitude de pico, que foram obtidos a partir do espectro média de todo o elemento, foram determinados automaticamente. Amplitude de pico foi definida como o ponto com a mais alta energia dentro do espectro, e frequência de pico foi definida como a frequência com a localização da amplitude de pico. Os parâmetros temporais que foram determinados incluídos duração e tempo total das vocalizações, bem como a duração dos intervalos entre as vocalizações subsequentes. Finalmente, o número total de chamadas emitida foi medido. Para determinar a duração da chamada, a frequência de pico e amplitude de pico a média de cada parâmetro de chamada serviu como a unidade estatística em cada disciplina.

Procedimentos

Grupos experimentais foram colocados na caixa de restrição por um período de 10 minutos. As vocalizações foram gravadas no período em que o animal permanecia dentro da restrição. Um microfone localizado em um buraco no meio do teto da caixa de isolamento acústico foi utilizado para a captação dessas vocalizações. As emissões dos ultrassons foram armazenadas em um *hard disk* e posteriormente transferidas para tabelas em um programa de planilhas (Excel; Microsoft Corp.) para que as análises do número e do tempo das vocalizações fossem realizadas (Figura 8).

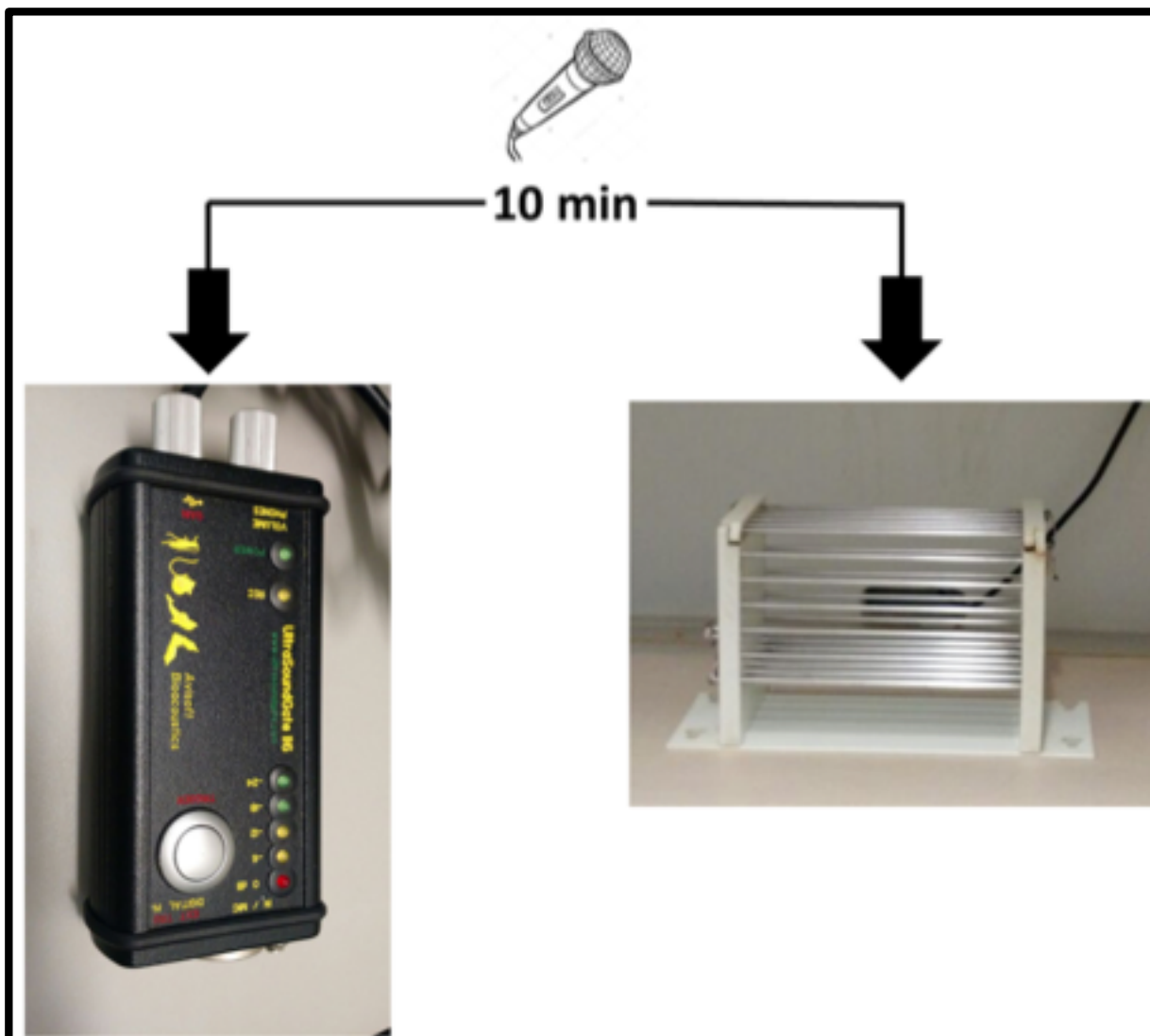


Figura 8: Representação esquemática do procedimento experimental e equipamento do modelo de vocalização ultrassônica durante a restrição.

Eutanásia

Ao final dos experimentos, cada animal passou pelo processo de eutanásia por meio da injeção de uretana 25% (1,25 ml/kg, i.p.) e sua morte foi constatada através da averiguação dos seguintes parâmetros: ausência de movimento respiratório (apneia), ausência de batimentos cardíacos (assistolia), ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal. Confirmada a morte de cada animal, os mesmos foram encaminhados ao refrigerador presente no laboratório de Neuropsicofarmacologia para posterior encaminhamento ao biotério central do Campus.

Análise estatística

Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo software *GraphPadPrism 5.0* (GraphPad Software, Inc., USA). Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas foi conduzida para os dados do SPM, condicionamento ao contexto e VSU. O fator grupo refere às diferentes fases do ciclo estral e o fator condição refere – se ao tipo de tentativa (som ou contexto + som no SPM, contexto A e contexto B no medo condicionado, e frequências de VSU no estresse de restrição). Para cada fase do ciclo estral e para o grupo de machos, a frequência de respostas de cruzamento no teste de *light switch-off* através dos quatro blocos de tentativas foram submetidas a uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas, tentativa (condição claro/escuro) como um fator e blocos de dez tentativas como a medida repetida. Para a validação do choque no teste SPM, foi conduzida uma ANOVA de duas vias, o fator grupo refere às diferentes fases do ciclo e o fator condição refere-se à condição (intensidade do choque na validação). Diferenças significativas entre médias entre os grupos foram determinadas através do teste *post-hoc* Bonferroni. Admite-se o valor de p igual ou menor que 5% como resultado significativo.

RESULTADOS

Experimento 1: Sobressalto potencializado pelo medo ao contexto.

A Figura 9 mostra a amplitude de sobressalto em machos (n=15) e fêmeas separadas em grupos de acordo com as fases do ciclo estral: proestro (n=10), estro (n=10), diestro 1 (n=10) e diestro 2 (n=10) submetidos ao condicionamento com choque nas patas (0,4 mA). Uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo na condição experimental ($F_{1,92} = 6.55$, $p < 0,05$), mas nenhum efeito significativo entre os grupos ($F_{4,92} = 1,04$, $p > 0,05$) e na interação grupos \times condição experimental ($F_{4,92} = 0,10$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Bonferroni revelou um aumento da resposta de sobressalto na condição contexto aversivo comparado à linha de base para todos os grupos ($p < 0,05$).

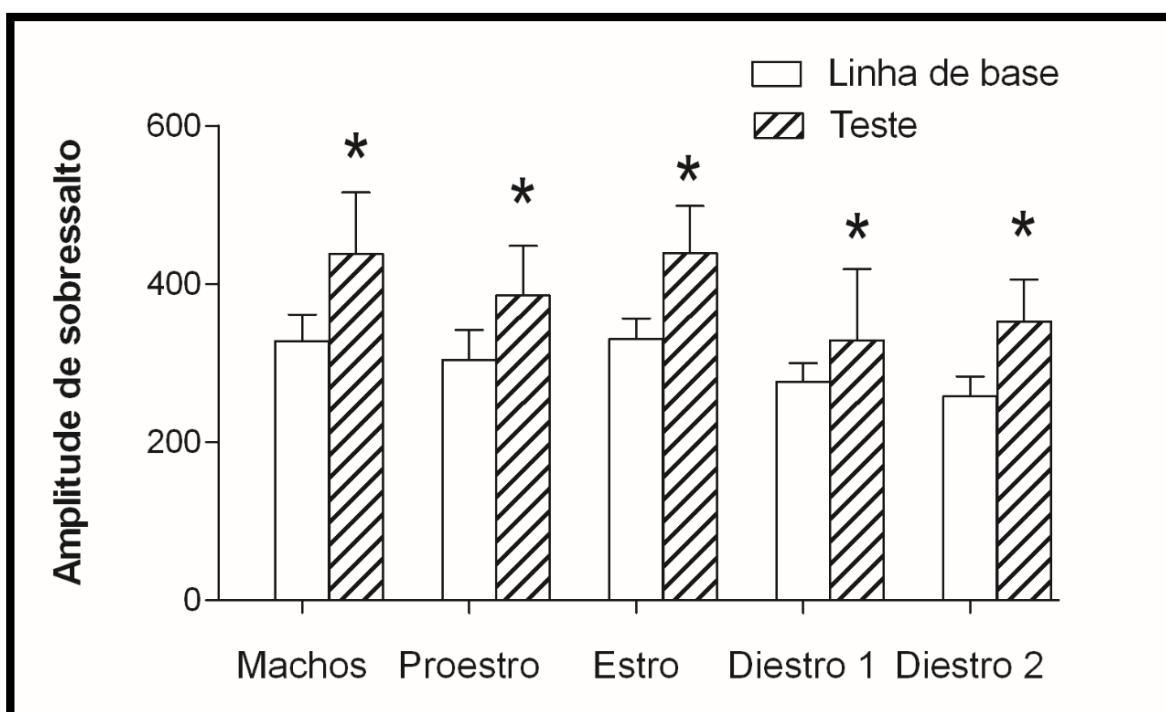


Figura 9: Influência do ciclo estral na média de amplitude de sobressalto em ratos. Resultado é expresso como média \pm EPM. As sessões experimentais consistiram na apresentação de 30 estímulos sonoros (100 dB) antes (linha de base) e 24 horas depois de uma sessão de condicionamento ao contexto, onde os ratos receberam choque nas patas (0,4 mA). * $p < 0,05$ entre condições. ANOVA de duas vias medidas repetidas seguidas pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Machos (n=15) Proestro, (n=10), Estro (n=10), Diestro 1 (n=10), Diestro 2 (n= 10).

Experimento 2: Congelamento condicionado ao contexto

A Figura 10 mostra a resposta comportamental de congelamento em grupos de ratos machos (Controle; n = 8), ratas fêmeas em proestro (n = 8), estro (n = 8), diestro 1 (n = 8) e no diestro 2 (n = 8). Uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo na condição experimental ($F_{1,35} = 78,57$, $p < 0,05$), mas nenhum efeito significativo

entre os grupos ($F_{4,35} = 2,12$, $p > 0,05$) e entre a interação grupos \times condição experimental ($F_{4,35} = 0,58$, $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou um aumento da resposta de congelamento no contexto aversivo quando comparado a resposta de linha de base para grupos de machos e fêmeas ($p < 0,05$).

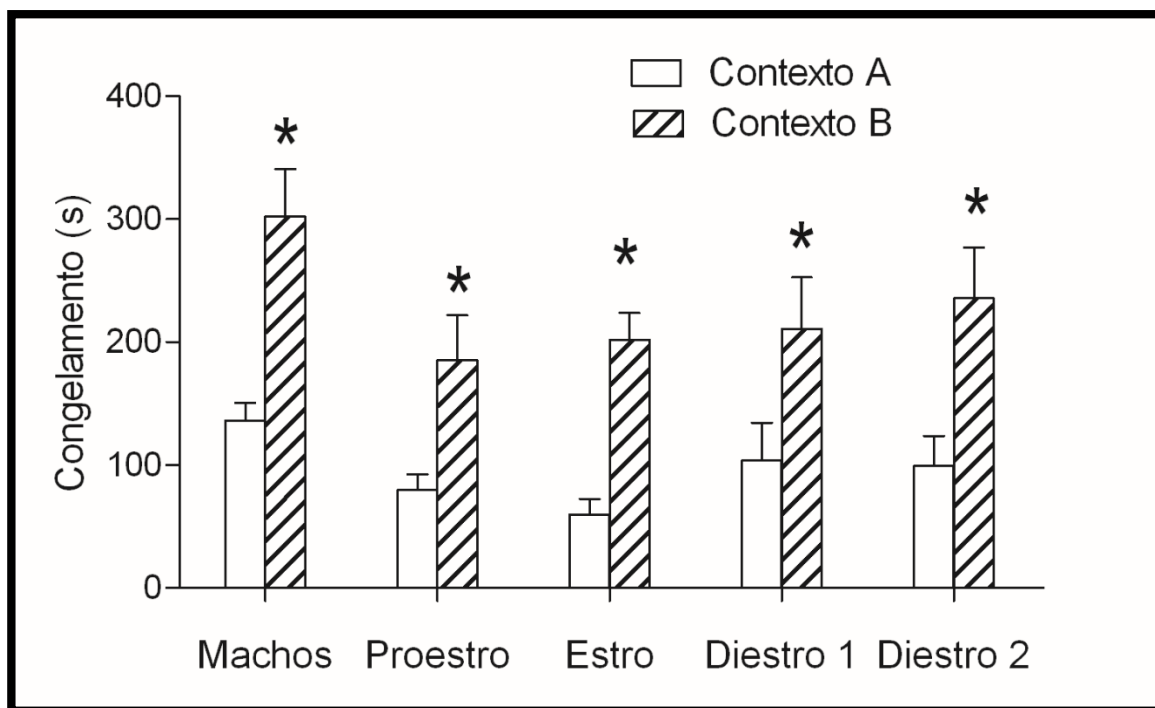


Figura 10: Efeitos das diferentes fases do ciclo estral sobre o comportamento de congelamento após 6 horas do condicionamento aversivo ao contexto (B) onde os animais receberam choques nas patas (0.6 mA) comparado com o congelamento ao contexto (B) onde não ocorreu condicionamento aversivo. As barras representam as médias \pm EPM. * $p < 0,05$ entre contextos A e B. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguidas pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Machos (n=8) Proestro, (n=8), Estro (n=8), Diestro 1 (n=8), Diestro 2 (n= 8).

Experimento 3: Resposta de desligamento da luz (*light switch-off*)

A figura 11 mostra os resultados obtidos no teste da resposta de desligamento da luz em grupos de fêmeas em proestro (n=10), estro (n=10), diestro 1 (n= 10) e diestro 2 (n=10) e em machos (n= 10). Grupo de machos e grupos de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram submetidas ao protocolo do teste *light switch off* (resposta no claro e no escuro) em sessões de 40 tentativas divididas em blocos de 10. Os resultados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas

Os grupos proestro e diestro 1 mostraram resultados similares. Enquanto houve significância nas respostas nos blocos ($F_{3,36} = 3,53$, e $5,60$, respectivamente, $p < 0,05$), a análise não revelou efeitos significativos nas tentativas ($F_{1,36} = 2,38$ e $0,10$, respectivamente; $p > 0,05$) ou interação entre tentativas e blocos ($F_{3,36} = 1,16$ e $2,04$; respectivamente, $p < 0,05$). Ratas na

fase do estro mostraram um efeito significativo entre as tentativas ($F_{1,36} = 7,17, p < 0,05$) e entre os blocos ($F_{3,36} = 10,19, p < 0,05$), mas nenhum efeito significativo na interação tentativa \times blocos ($F_{3,36} = 0,77, p > 0,05$). O teste *post hoc* de Bonferroni, utilizado nas três fases, revelou uma redução progressiva das respostas de cruzamento entre compartimentos durante a fase sem luz (*no-light*) nos blocos ($p < 0,05$).

O grupo do diestro 2 foi o que apresentou resultados mais proeminentes na condição tentativas (claro x escuro) ($F_{1,36} = 13,61, p < 0,05$), mas sem efeito significativo nos blocos ($F_{3,36} = 0,36, p > 0,05$) e na interação entre tentativa \times blocos ($F_{3,36} = 1,36, p > 0,05$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou um aumento da resposta de *switch-off* nas respostas de fuga do compartimento claro comparadas com respostas no compartimento escuro, particularmente no bloco 4 ($p < 0,05$).

Os resultados para o grupo de machos mostraram um efeito significativo para o tipo de tentativa ($F_{1,36} = 4,10, p = 0,05$) e entre os blocos ($F_{3,36} = 7,85, p < 0,05$), mas não apresentou um efeito significativo na interação blocos \times tentativas ($F_{3,36} = 0,35, p > 0,05$). O teste *post hoc* de Bonferroni confirmou um aumento das respostas nas tentativas clara, comparadas com as tentativas no escuro ($p < 0,05$).

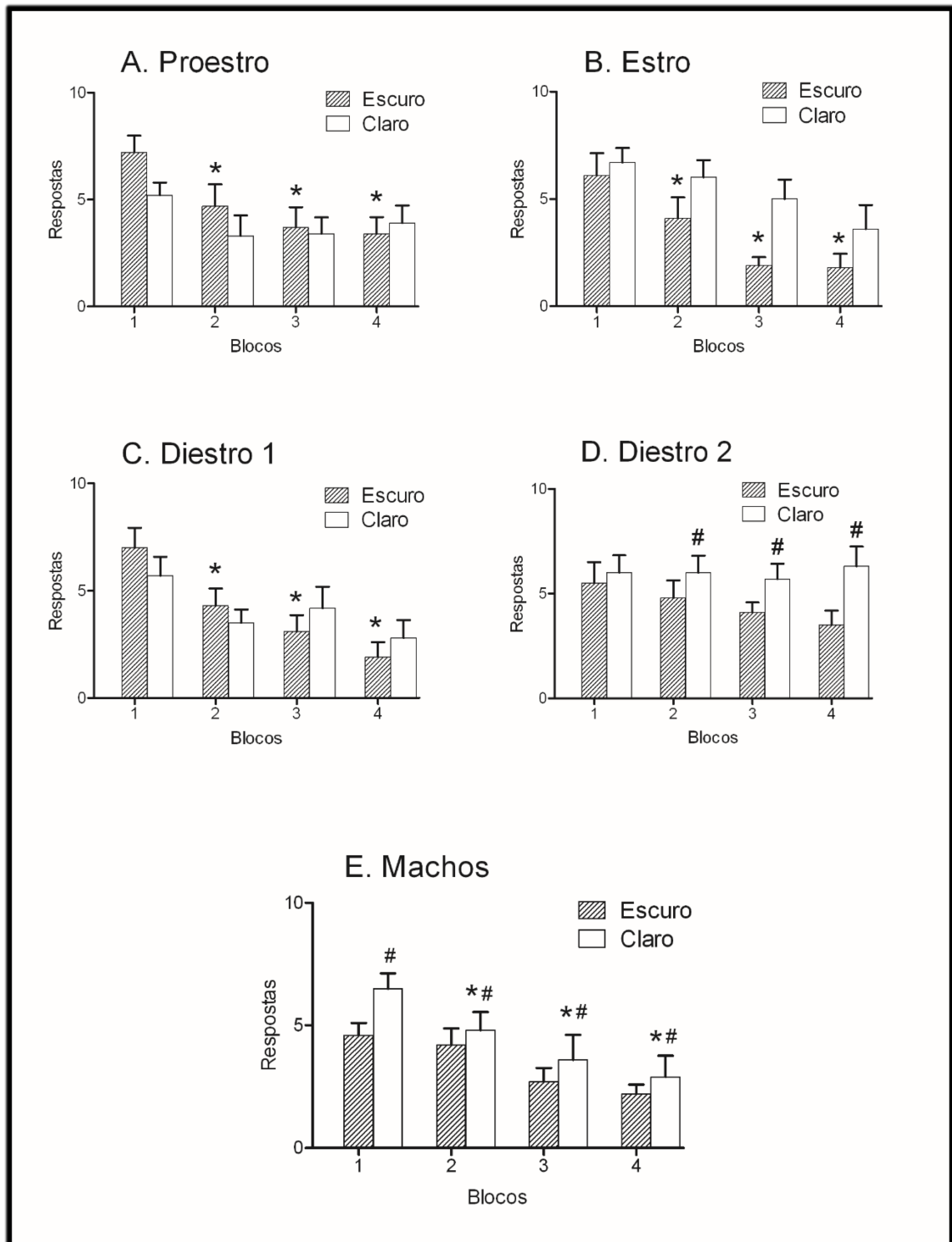


Figura 11: Número de respostas de desligar a luz (média ± EPM) durante os quatro blocos de 10 tentativas em machos e fêmeas submetidas à tarefa do teste de desligamento da luz nas diferentes fases do ciclo estral. * $p < 0,05$ indica efeito significativo nos blocos nos machos e nas fases proestro, estro e diestro. # $p < 0,05$ indica efeito significativo no tipo de tentativa nos machos e na fase de diestro 2. Na fase de diestro 2, teve uma diferença significativa no tipo de tentativas, mas não teve diferença entre os blocos. Não teve interação entre blocos × tipo de tentativa nos machos e em nenhuma fase do ciclo hormonal. Uma ANOVA com medidas repetidas foi utilizada seguida do teste *post hoc* Bonferroni, $n = 10$ animais em cada grupo.

Experimento 4: Respostas de vocalização durante o estresse de restrição

A figura 12-A ilustra os efeitos da restrição no número de VUS em machos ($n = 8$), ratas fêmeas em proestro ($n = 8$), estro ($n = 8$), diestro 1 ($n = 8$) e no diestro 2 ($n = 8$). Uma ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, foi aplicada ao número de VUS emitido durante 10 minutos de teste e revelou um efeito significativo entre as diferentes frequências de VUS ($F_{3,105} = 25,43$, $p < 0,05$), entre os grupos ($F_{4,105} = 6,95$, $p < 0,05$) e na interação entre grupos \times frequências da VUS ($F_{12,105} = 4,79$, $p < 0,05$).

O teste *post hoc* revelou que a restrição causa um aumento do número de VUS no intervalo de 20-22 kHz em machos e em fêmeas na fase de diestro 2. Na figura 12B pode ser visto os efeitos da restrição na duração das vocalizações que ultrassônica obteve um efeito significativo entre as diferentes frequências de VUS ($F_{3,105} = 8,77$, $p < 0,05$), entre os grupos ($F_{4,105} = 3,30$, $p < 0,05$) e na interação entre grupos \times frequências da VUS ($F_{12,105} = 2,79$, $p < 0,05$). Novamente o teste *post hoc* revelou que a restrição causa um aumento na duração de VUS no intervalo de 20-22 kHz em machos e em fêmeas na fase de diestro 2.

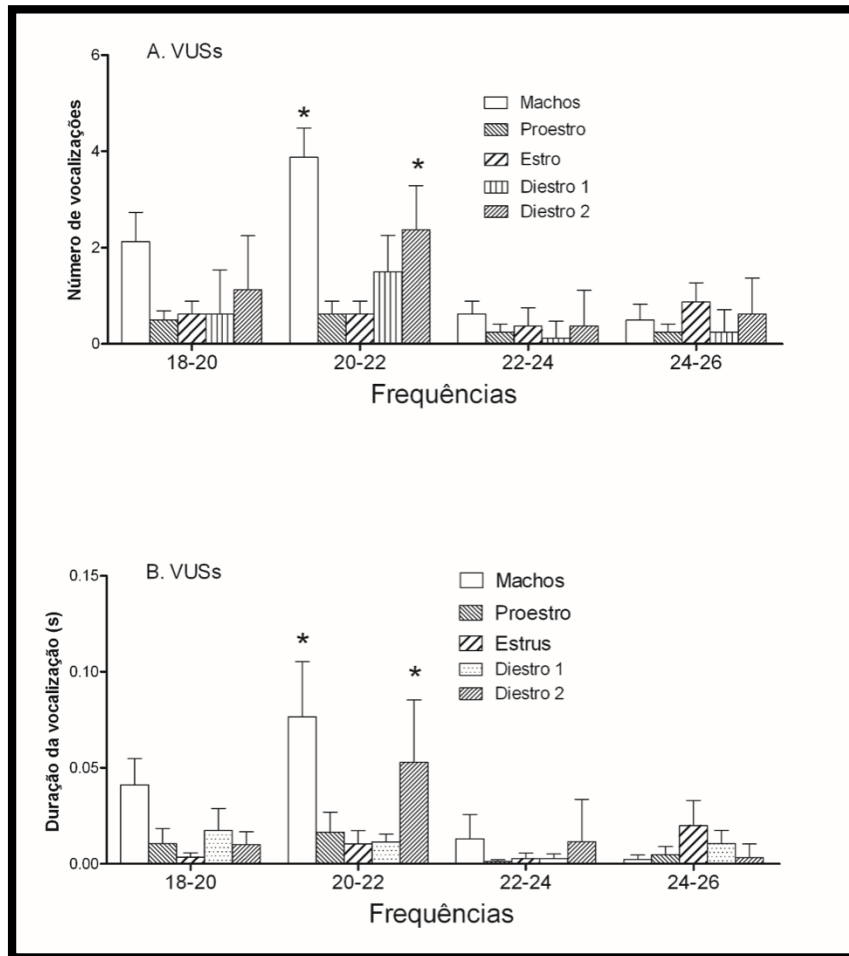


Figura 12: Efeitos da restrição no número (A) e duração (B) de vocalizações emitidas em uma frequência ultrassônica (18 – 26 kHz) em um período de 10 minutos durante o estresse agudo de restrição. Resultado é expresso como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação à frequência no grupo controle (18 – 20 kHz). ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, seguida do teste *post-hoc* Bonferroni. $n = 8$ em todos os grupos.

A utilização da fêmea como animal experimental é fundamental para compreender as nuances de seu comportamento e suas diferenças em relação ao comportamento de machos, além das diferenças consequentes a alterações hormonais. Desse modo, esse estudo visa a trazer subsídios à compreensão da neurobiologia da ansiedade em fêmeas.

No estudo do processamento emocional associado às diferenças de sexo em testes de laboratório deve levar em conta diversos fatores tais como a idade, o peso corporal, a estação do ano e até mesmo o sexo do pesquisador (LÓPEZ-AUMATELL et al., 2011). Em alguns estudos o desempenho dos animais pode ser influenciado pela cepa ou por um determinado traço genético de forma que pequenas alterações no protocolo experimental em laboratórios diferentes podem tornar difícil a comparação entre sexos (PRYCE; LEHMANN; FELDON, 1999; KELLY et al., 2003).

Um fator determinante deste estudo foi que se estudam diferenças de sexo em ratos submetidos a quatro testes comportamentais: dois testes com paradigmas de medo condicionado e dois com paradigmas de medo incondicionado. Além disso, os animais do presente estudo foram provenientes da mesma fonte, foram alojados no mesmo biotério setorial, os experimentos foram conduzidos em salas adjacentes e foram manipulados somente pela autora dessa dissertação. Mais importante, as fêmeas passaram por um rigoroso critério para determinação da fase do ciclo estral em que se encontravam antes de serem submetidas aos testes comportamentais.

Nos paradigmas de medo condicionado, sobressalto potencializado pelo medo e congelamento condicionado pelo contexto os machos e as fêmeas apresentaram respostas bem evidentes. Entretanto, não detectamos diferenças de sexo. Os machos e fêmeas não mostraram diferenças nas respostas de linha de base ou nas respostas potencializadas pelo condicionamento e as fêmeas não mostraram uma reatividade emocional diferente nos vários estágios do ciclo estral. A ausência de diferenças entre sexos encontra suporte em outros relatos (PETTERSSON; HAGSÄTER; ERIKSSON, 2016), mas contrasta com resultados de outros estudos nos quais as fêmeas mostraram uma resposta de sobressalto potencializada pelo medo maior que os machos (DE JONGH et al., 2005). Há também relatos em que os machos apresentaram maior medo condicionado ao contexto que as fêmeas (MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994; PRYCE; LEHMANN; FELDON, 1999; GUPTA et al., 2001; GRESACK et al., 2009; PETTERSSON; HAGSÄTER; ERIKSSON, 2016).

Assim, os resultados do presente trabalho permitem afirmar que pequenas alterações no protocolo experimental podem determinar um aumento, uma diminuição ou nenhuma alteração na reatividade emocional de machos comparados a fêmeas no medo condicionado. O mesmo

pode ser dito em relação à comparação nestes testes do desempenho de fêmeas nas diversas fases de seu ciclo estral. De fato, uma ausência de efeito do ciclo estral sobre o sobressalto potencializado pelo medo também foi relatado em um estudo prévio (HIROI; NEUMAIER, 2006), mas não em outros (PETTERSSON; HAGSÄTER; ERIKSSON, 2016), embora nestes estudos o ciclo tenha sido dividido em somente dois estágios: receptivo e não receptivo que não equivalem aos quatro estágios por nós identificados nesse estudo.

Em contraste com os testes de medo condicionado, diferenças claras entre sexos e entre fases do ciclo estral foram notadas quando se utiliza paradigmas de medo incondicionado; o teste de *switch-off* da luz e o teste para registro das vocalizações ultrassônicas. O teste do *switch-off* da luz é um procedimento bastante simples, não invasivo e com baixa nocividade (não utiliza choques nas patas) e foi recentemente validado experimentalmente como um teste de medo incondicionado por este laboratório (SAITO; BRANDÃO, 2016). Ele representa um índice bastante confiável de medo inato a áreas intensamente iluminadas em roedores além de não expor os animais à estimulação excessivamente aversiva ou a aprendizagem associativa.

Como relatado anteriormente, os machos mostraram um número significativo de respostas à luz comparado ao nível de respostas emitidas no ambiente escuro da sessão embora o número total de respostas tenha diminuído ao longo das 40 tentativas do teste, provavelmente refletindo uma habituação ao ambiente iluminado, relativamente aversivo. As fêmeas, por outro lado, não responderam de forma diferente nos ambientes claro e escuro, com exceção dos estágio de diestro 2 quando, da mesma forma que os machos, elas emitiram mais respostas de fuga da luz em relação às respostas de cruzamento no componente escuro do teste. Isto indica que, em geral, as fêmeas não conferem ao ambiente claro um nível de estresse significativo. Entretanto, o comportamento das fêmeas no diestro 2 denota claramente que elas, nesse estágio, reagem emocionalmente de maneira significativa ao ambiente claro indicando uma diferença importante em relação ao comportamento manifesto nas outras fases do ciclo estral. Além disso, diferentemente das fêmeas nos estágios iniciais do ciclo estral e mesmo em relação aos machos, as fêmeas na fase do diestro 2 não mostram habituação ao longo das tentativas da sessão neste teste, como pode ser visto pela ausência de decréscimo nas respostas, tanto no componente claro quanto no escuro, ao longo dos quatro blocos do teste.

Na linha da reatividade emocional diferencial entre sexos aos estímulos incondicionados de medo também existiram diferenças sexuais evidentes na emissão de vocalizações ultrassônicas em resposta ao estresse de restrição. É sabido que os ratos emitem essas vocalizações na faixa de 20 a 22 kHz quando expostos a condições estressantes, tais como quando são expostos a situações potencialmente perigosas (BLANCHARD et al., 1992;

BRUDZYNSKI; CHIU, 1995; NOBRE; BRANDÃO, 2004). Apoiando resultados de estudos recentes com a emissão de vocalizações de 22 kHz produzida pelo estresse induzido por jatos de ar (INAGAKI; MORI, 2015), as fêmeas do presente estudo emitiram cerca da metade do número de emissões e por períodos menores que os machos. Isto sugere que as fêmeas são inerentemente menos reativas ao estresse agudo que os machos. Entretanto, este achado contrasta com estudos que relatam maior número de vocalizações ultrassônicas por fêmeas que machos quando expostos a predadores (BLANCHARD et al., 1992). Assim, os sexos podem determinar uma saliência emocional diferente a estímulos potencialmente ameaçadores dependendo da natureza do estressor.

Contradizendo a ideia geral que advém da análise global dos resultados que mostra que de maneira geral as fêmeas são menos responsivas ao estresse de restrição que os machos, diferenças significativas foram observadas entre as respostas de ratas nas diversas fases do ciclo estral. Ratas nas fases iniciais do ciclo estral emitiram poucas respostas na faixa de 20-22 kHz enquanto que ratas na fase de diestro 2 exibiram um nível significativamente maior dessas emissões ao mesmo estímulo aversivo, aproximando-se mesmo dos valores observados nos machos. Estes achados confirmam relatos publicados anteriormente que mostram a tendência de as fêmeas reagirem com maior vigor ao estresse psicológico moderado (medo incondicionado) nessa fase particular do ciclo estral (DEVALL; LIU; LOVICK, 2009; DEVALL et al., 2015), quando as fêmeas parecem apresentar maior sensibilidade a estímulos emocionalmente salientes.

O medo incondicionado ou estresse agudo direciona o cérebro para o modo de atuação de elaboração e geração de respostas que compõem a reação de defesa que, na realidade, é organizada pelo “sistema encefálico da aversão” que consiste do hipotálamo medial, amígdala e SCP dorsal (MISSLIN, 2003; MOBBS et al., 2007; CANTERAS; GRAEFF, 2014). Tem sido mostrado que a excitabilidade intrínseca da SCPd em fêmeas está aumentada no diestro 2 (BRACK; LOVICK, 2007; DEVALL; LIU; LOVICK, 2009; DEVALL et al., 2015) em associação com uma regulação positiva da expressão da subunidade do receptor GABAA na população neuronal gabaérgica nessa estrutura (GRIFFITHS; LOVICK, 2005). Essas alterações neuroquímicas e funcionais nas propriedades da SCPd e talvez de outras partes do circuito do medo possam estar subjacentes ao medo incondicionado exibido pelos animais no diestro tardio, quando as fêmeas parecem processar as informações ameaçadoras do meio em que se encontram de uma maneira diferente de outros estágios do ciclo estral. Embora especulativo, pode ser que um processo similar esteja em curso na fase pré-menstrual do ciclo das mulheres quando sabidamente apresentam uma reatividade emocional exacerbada.

Aplicando uma análise mais neurobiológica, já está bem estabelecido que os hormônios sexuais possam influenciar os processos emocionais. A progesterona, por exemplo, é secretada pelas glândulas adrenais em fêmeas e machos e em uma situação de estresse agudo, tem seus níveis aumentados no SNC (BARBACCIA et al., 1996). Modelos animais também sugerem que o aumento da progesterona pela indução do estresse serve para modular negativamente a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), facilitando assim a recuperação da homeostase fisiológica do sistema após um estímulo estressor. Especificamente, a progesterona impede a liberação do hormônio de liberação de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, como também, a ansiedade induzida pelo CRH (PATCHEV et al., 1994) e, também, atenua significativamente a elevação plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) liberado em consequência do estresse (GUO et al., 1995), podendo-se pensar que a progesterona tem um papel protetor em situações de estresse.

A secreção de progesterona pelas gônadas, em fêmeas, varia consideravelmente durante o ciclo estral. Na fase de diestro 1, a concentração de progesterona aumenta gradativamente, seguida de uma abrupta queda no diestro 2 (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). A queda da progesterona é associada com o aumento dos afetos negativos em animais e em mulheres (ANDRÉEN et al., 2005; DEVALL; LIU; LOVICK, 2009; LI et al., 2012; DEVALL et al., 2015). Isto sugere que o sistema já está preparado para ter uma resposta diferenciada no diestro 2, comparando com as outras fases do ciclo, pois, com a falta de progesterona, essa suposta proteção em situações de estresse não acontecerá com a intensidade das outras fases e este fato, possivelmente justifique a semelhança da resposta entre o grupo de machos e fêmeas no diestro 2.

A partir de uma interpretação mais evolutiva dos presentes achados, é possível imaginar que as fêmeas sejam simplesmente mais sensíveis biologicamente à saliência emocional dos estímulos aversivos. Com base nisso, estudos anteriores mostram uma maior atividade das áreas límbicas, particularmente a região pré-frontal aumentando as respostas emocionais a estímulos negativos em fêmeas comparados com machos (DOMÍNGUEZ et al., 2003; MCRAE et al., 2008).

Os resultados encontrados nesse estudo são de grande valia, pois proporcionam uma comparação de diferentes modelos comportamentais associada a uma avaliação rigorosa das fases hormonais das fêmeas, podendo ter uma leitura mais detalhada da sensibilidade desses modelos às alterações hormonais.

Os resultados do presente estudo não detectaram diferenças sexuais nas respostas a estímulos condicionados de medo. Por outro lado, diferenças sexuais estavam claramente

subjacentes às respostas aos estímulos aversivos incondicionados, quando machos pareceram ser mais “reativos emocionalmente” que as fêmeas. Entretanto, o comportamento de fêmeas nesses paradigmas foi claramente influenciado pela fase do ciclo estral: no diestro 2 as ratas desenvolveram uma reatividade exacerbada aos estímulos emocionalmente salientes, em um comportamento parecido com aquele exibido pelos machos.

Sob esta ótica, os resultados não sustentam a ideia genérica de que há uma tendência de as fêmeas reagirem significativamente mais que os machos aos estímulos aversivos de natureza emocional. Na realidade, isto pode ocorrer, pelo menos, no que se refere aos estímulos incondicionados de medo, quando as fêmeas entram no diestro 2 e emerge uma sensibilização dos circuitos neurais da aversão aos chamados estímulos incondicionados de medo. A ideia defendida é de que nessa fase do ciclo estral os substratos neurais do chamado sistema encefálico aversivo, particularmente, a substância cinzenta periaquedutal dorsal passam a ser recrutados por estímulos com saliência emocional aversiva resultando, em consequência, todo o quadro da reação de defesa com os seus componentes característicos comportamental, autonômico e hormonal.

Estes achados têm relevância para a compreensão do desenvolvimento das chamadas disforias pré-menstruais nas mulheres, que experimentam alterações emocionais associadas à ansiedade durante a fase lútea de seu ciclo menstrual. Fica claro que o estabelecimento de novos testes comportamentais com os quais se possam estudar comportamentos defensivos e estados mentais aversivos associados a alterações hormonais poderá revelar novas abordagens ao conhecimento e/ou estratégias para entender e tratar as disforias pré-menstruais em mulheres.

CONCLUSÕES

Ratas apresentaram uma reatividade emocional distinta frente a estímulos de medo incondicionado e condicionado.

Ratas respondem a estímulos incondicionados de medo com mais vigor que a estímulos condicionados de medo. Pelo menos, nos testes utilizados nesse estudo.

Ratas na fase de diestro 2 se mostram mais reativas aos estímulos incondicionados de medo que nas outras fases do ciclo estral.

Ratas na fase de diestro 2 apresentam uma reatividade emocional aos estímulos incondicionados de medo que a aproximam do comportamento defensivo manifestado pelos machos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMADA, R. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M. L. Further evidence for involvement of the dorsal hippocampus serotonergic and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic pathways in the expression of contextual fear conditioning in rats. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 12, p. 1160–8, dez. 2013.
- ALMADA, R. C.; BORELLI, K. G.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M. L. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural brain research**, v. 203, n. 2, p. 279–87, 5 nov. 2009.
- ANDRÉEN, L.; SUNDSTRÖM-POROMAA, I.; BIXO, M.; ANDERSSON, A.; NYBERG, S.; BÄCKSTRÖM, T. Relationship between allopregnanolone and negative mood in postmenopausal women taking sequential hormone replacement therapy with vaginal progesterone. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 2, p. 212–24, fev. 2005.
- ANSELMO-FRANCI, J.; SZAWKA, R. Controle neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: ANTUNES-RODRIGUES J; MOREIRA AC; ELIAS LIK; CASTRO M (Ed.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 318–40.
- BARBACCIA, M. L.; ROSCETTI, G.; TRABUCCHI, M.; MOSTALLINO, M. C.; CONCAS, A.; PURDY, R. H.; BIGGIO, G. Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 63, n. 2, p. 166–72, fev. 1996.
- BARON, S.; BRUSH, F. R. Effects of acute and chronic restraint and estrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. **Hormones and behavior**, v. 12, n. 3, p. 218–24, jun. 1979.
- BASSI, G. S.; NOBRE, M. J.; DE ARAÚJO, J. E.; BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 365–74, dez. 2007.
- BITRAN, D.; SMITH, S. S. Termination of pseudopregnancy in the rat produces an anxiogenic-like response that is associated with an increase in benzodiazepine receptor binding density and a decrease in GABA-stimulated chloride influx in the hippocampus. **Brain research bulletin**,

v. 64, n. 6, p. 511–8, 30 jan. 2005.

BLANCHARD, D. C.; HORI, K.; RODGERS, R. J.; HENDRIE, C. A.; BLANCHARD, R. J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 392–401, 1989.

BLANCHARD, R. J.; AGULLANA, R.; MCGEE, L.; WEISS, S.; BLANCHARD, D. C. Sex differences in the incidence and sonographic characteristics of antipredator ultrasonic cries in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 106, n. 3, p. 270–7, set. 1992.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3–14, 1989a.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 103, n. 1, p. 70–82, mar. 1989b.

BŁASZCZYK, J.; TAJCHERT, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 56, n. 4, p. 919–25, 1996.

BORELLI, K. G.; ALBRECHET-SOUZA, L.; FEDOCE, A. G.; FABRI, D. S.; RESSTEL, L. B.; BRANDÃO, M. L. Conditioned fear is modulated by CRF mechanisms in the periaqueductal gray columns. **Hormones and behavior**, v. 63, n. 5, p. 791–9, maio 2013.

BÖRNER, A.; HJEMDAHL, R.; GÖTZ, T.; BROWN, G. R. Ultrasonic vocalizations of female Norway rats (*Rattus norvegicus*) in response to social partners. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 130, n. 1, p. 76–80, fev. 2016.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 55–65, 28 fev. 2003.

BOUTON, M. E.; BOLLES, R. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. **Animal Learning & Behavior**, v. 8, n. 3, p. 429–434, 1980.

BRACK, K. E.; LOVICK, T. Neuronal excitability in the periaqueductal grey matter during the estrous cycle in female Wistar rats. **Neuroscience**, v. 144, n. 1, p. 325–35, 5 jan. 2007.

BRANDÃO, M. L. B. **Psicofisiologia**. Third ed. Ribeirão Preto: Atheneu, 2012.

- BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **Journal of experimental psychology**, v. 41, n. 5, p. 317–28, maio 1951.
- BRUDZYNSKI, S. M. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. **Current opinion in neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 310–7, jun. 2013.
- BRUDZYNSKI, S. M.; CHIU, E. M. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. **Physiology & behavior**, v. 57, n. 6, p. 1039–44, jun. 1995.
- BRUDZYNSKI, S. M.; OCIEPA, D. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. **Physiology & behavior**, v. 52, n. 4, p. 655–60, out. 1992.
- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–8, jun. 1974.
- CAMERON, O. G.; KUTTESCH, D.; MCPHEE, K.; CURTIS, G. C. Menstrual fluctuation in the symptoms of panic anxiety. **Journal of affective disorders**, v. 15, n. 2, p. 169–74, 1988.
- CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S101–11, 2013.
- CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 46 Pt 3, p. 352–64, out. 2014.
- CARLSON, N. R. **Physiology of behavior**. [s.l.] Prentice Hall, 2012.
- CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 150B, n. 1, p. 1–11, 5 jan. 2009.
- CRUZ, A. P. de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. (Ed.). **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2012. p. 192 – 217.
- DALGLEISH, T. The emotional brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 583–9, jul.

2004.

DAVIS, M. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. **Behavioral neuroscience**, v. 100, n. 6, p. 814–24, dez. 1986.

DE JONGH, R.; GEYER, M. A.; OLIVIER, B.; GROENINK, L. The effects of sex and neonatal maternal separation on fear-potentiated and light-enhanced startle. **Behavioural brain research**, v. 161, n. 2, p. 190–6, 20 jun. 2005.

DE SOUZA CAETANO, K. A.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. **Behavioural pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 264–74, ago. 2013.

DEVALL, A. J.; LIU, Z.-W.; LOVICK, T. A. Hyperalgesia in the setting of anxiety: sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 4, p. 587–96, maio 2009.

DEVALL, A. J.; SANTOS, J. M.; FRY, J. P.; HONOUR, J. W.; BRANDÃO, M. L.; LOVICK, T. A. Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 113–23, jan. 2015.

DOMÍNGUEZ, R.; CRUZ-MORALES, S. E.; CARVALHO, M. C.; XAVIER, M.; BRANDAO, M. L. Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. **Physiology & behavior**, v. 80, n. 2-3, p. 203–10, nov. 2003.

EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 8, n. 3, p. 38–9, mar. 1922.

FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **The Pavlovian journal of biological science**, v. 15, n. 4, p. 177–82, 1980.

FREEMAN, M. E. CHAPTER 43 – Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]p. 2327–2388.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 239–59, maio 2004.

- GRESACK, J. E.; SCHAFE, G. E.; ORR, P. T.; FRICK, K. M. Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 451–67, 17 mar. 2009.
- GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. GABAergic neurons in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 457–66, 2005.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–8, set. 2012.
- GUO, A. L.; PETRAGLIA, F.; CRISCUOLO, M.; FICARRA, G.; NAPPI, R. E.; PALUMBO, M. A.; TRENTINI, G. P.; PURDY, R. H.; GENAZZANI, A. R. Evidence for a role of neurosteroids in modulation of diurnal changes and acute stress-induced corticosterone secretion in rats. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 1–7, mar. 1995.
- GUPTA, R. R.; SEN, S.; DIEPENHORST, L. L.; RUDICK, C. N.; MAREN, S. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats(1). **Brain research**, v. 888, n. 2, p. 356–365, 12 jan. 2001.
- HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioural brain research**, v. 166, n. 1, p. 93–100, 6 jan. 2006.
- HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission**, v. 80, n. 2, p. 79–87, 2005.
- INAGAKI, H.; MORI, Y. The emission of stress-induced 22-kHz calls in female rats is independent of testosterone levels. **Hormones and behavior**, v. 69, p. 116–8, mar. 2015.
- IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiological reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.
- KAMPEN, D. L.; SHERWIN, B. B. Estrogen use and verbal memory in healthy postmenopausal women. **Obstetrics and gynecology**, v. 83, n. 6, p. 979–83, jun. 1994.
- KASPI, S. P.; OTTO, M. W.; POLLACK, M. H.; EPPINGER, S.; ROSENBAUM, J. F. Premenstrual exacerbation of symptoms in women with panic disorder. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 8, n. 2, p. 131–138, abr. 1994.

- KELLY, O. P.; MCINTOSH, J.; MCINTYRE, D. C.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Anxiety in rats selectively bred for Fast and Slow kindling rates: situation-specific outcomes. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 6, n. 4, p. 289–95, dez. 2003.
- KESSLER, R. C.; AVENEVOLI, S.; COSTELLO, J.; GREEN, J. G.; GRUBER, M. J.; MCLAUGHLIN, K. A.; PETUKHOVA, M.; SAMPSON, N. A.; ZASLAVSKY, A. M.; MERIKANGAS, K. R. Severity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. **Archives of general psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 381–9, abr. 2012.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 2, p. 107–28, out. 1999.
- LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1229–38, 15 dez. 1998.
- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. First ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.
- LI, Y.; PEHRSON, A. L.; BUDAC, D. P.; SÁNCHEZ, C.; GULINELLO, M. A rodent model of premenstrual dysphoria: progesterone withdrawal induces depression-like behavior that is differentially sensitive to classes of antidepressants. **Behavioural brain research**, v. 234, n. 2, p. 238–47, 1 out. 2012.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–40, 1990.
- LÓPEZ-AUMATELL, R.; MARTÍNEZ-MEMBRIVES, E.; VICENS-COSTA, E.; CAÑETE, T.; BLÁZQUEZ, G.; MONT-CARDONA, C.; JOHANNESSEN, M.; FLINT, J.; TOBEÑA, A.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Effects of environmental and physiological covariates on sex differences in unconditioned and conditioned anxiety and fear in a large sample of genetically heterogeneous (N/Nih-HS) rats. **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 7, p. 48, 2011.
- LOVICK, T. A. Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. **Experimental physiology**, v. 91, n. 4, p. 655–60, jul. 2006.
- LOVICK, T. A. Sex determinants of experimental panic attacks. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 46 Pt 3, p. 465–71, out. 2014.
- LUND, T. D.; ROVIS, T.; CHUNG, W. C. J.; HANDA, R. J. Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 797–807, fev. 2005.

MANDL, A. M. THE PHASES OF THE OESTROUS CYCLE IN THE ADULT WHITE RAT. [s.d.]

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 62, n. 4A, p. 609–14, nov. 2002.

MAREN, S.; DE OCA, B.; FANSELOW, M. S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. **Brain research**, v. 661, n. 1-2, p. 25–34, 24 out. 1994.

MCLEAN, C. P.; ASNAANI, A.; LITZ, B. T.; HOFMANN, S. G. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **Journal of psychiatric research**, v. 45, n. 8, p. 1027–35, ago. 2011.

MCRAE, K.; OCHSNER, K. N.; MAUSS, I. B.; GABRIELI, J. J. D.; GROSS, J. J. Gender Differences in Emotion Regulation: An fMRI Study of Cognitive Reappraisal. **Group Processes & Intergroup Relations**, v. 11, n. 2, p. 143–162, 1 abr. 2008.

MILAD, M. R.; IGOE, S. A.; LEBRON-MILAD, K.; NOVALES, J. E. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 887–95, 15 dez. 2009.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 55–66, abr. 2003.

MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5841, p. 1079–83, 24 ago. 2007.

NILLNI, Y. I.; TOUFEXIS, D. J.; ROHAN, K. J. Anxiety sensitivity, the menstrual cycle, and panic disorder: a putative neuroendocrine and psychological interaction. **Clinical psychology review**, v. 31, n. 7, p. 1183–91, nov. 2011.

NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 45–52, jan. 2004.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 3, p. 219–33, maio 2001.

PATCHEV, V. K.; SHOAI, M.; HOLSBOER, F.; ALMEIDA, O. F. The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. **Neuroscience**, v. 62, n. 1, p. 265–71, set. 1994.

PAUL, S. M.; PURDY, R. H. Neuroactive steroids. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 6, p. 2311–22, mar. 1992.

PETTERSSON, R.; HAGSÄTER, S. M.; ERIKSSON, E. Serotonin depletion eliminates sex differences with respect to context-conditioned immobility in rat. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 8, p. 1513–21, abr. 2016.

PORTFORS, C. V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 46, n. 1, p. 28–34, jan. 2007.

PRYCE, C. R.; LEHMANN, J.; FELDON, J. Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar, Lewis and Fischer rat strains. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 64, n. 4, p. 753–9, dez. 1999.

REIMER, A. E.; OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. **Brain research bulletin**, v. 76, n. 5, p. 545–50, 30 jul. 2008.

REIS, F. L. V.; MASSON, S.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 79, n. 2, p. 359–65, out. 2004.

REIS, F. M. C. V.; ALMADA, R. C.; FOGAÇA, M. V.; BRANDÃO, M. L. Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 26, n. 6, p. 2639–49, jun. 2016.

SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L. The light switch-off response as a putative rodent test of

innate fear. **Neuroscience**, 2 ago. 2016.

SANTOS, J. M.; GÁRGARO, A. C.; OLIVEIRA, A. R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M. L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 239–46, mar. 2005.

SANTOS, J. M.; MARTINEZ, R. C. R.; BRANDÃO, M. L. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European journal of pharmacology**, v. 542, n. 1-3, p. 121–8, 7 ago. 2006.

SHERWIN, B. B. Estrogen and cognitive functioning in women. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 217, n. 1, p. 17–22, jan. 1998.

SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C. M.; LOUREIRO, S. R.; GRAEFF, F. G. Animal defense strategies and anxiety disorders. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 97–109, mar. 2007.

SIGMON, S. T.; DORHOFER, D. M.; ROHAN, K. J.; HOTOVY, L. A.; BOULARD, N. E.; FINK, C. M. Psychophysiological, somatic, and affective changes across the menstrual cycle in women with panic disorder. **Journal of consulting and clinical psychology**, v. 68, n. 3, p. 425–31, jun. 2000.

SMITH, S. S.; GONG, Q. H.; LI, X.; MORAN, M. H.; BITRAN, D.; FRYE, C. A.; HSU, F. C. Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 14, p. 5275–84, 15 jul. 1998.

SNOEREN, E. M. S.; ÁGMO, A. The role of odors and ultrasonic vocalizations in female rat (*Rattus norvegicus*) partner choice. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 128, n. 4, p. 367–77, nov. 2014.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical record**, v. 254, n. 1, p. 116–26, jan. 1999.

TOMAZINI, F. M.; REIMER, A.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M. L. Opposite

effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. **Journal of neuroscience methods**, v. 153, n. 1, p. 114–20, 15 maio 2006.

TREIT, D.; ENGIN, E.; MCEOWN, K. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 2, p. 121–60, 2010.

VARGAS, K. G.; MILIC, J.; ZACIRAGIC, A.; WEN, K.-X.; JASPERS, L.; NANO, J.; DHANA, K.; BRAMER, W. M.; KRAJA, B.; VAN BEECK, E.; IKRAM, M. A.; MUKA, T.; FRANCO, O. H. The functions of estrogen receptor beta in the female brain: A systematic review. **Maturitas**, 4 jun. 2016.

WILLIAMS, L. M.; BARTON, M. J.; KEMP, A. H.; LIDDELL, B. J.; PEDUTO, A.; GORDON, E.; BRYANT, R. A. Distinct amygdala-autonomic arousal profiles in response to fear signals in healthy males and females. **NeuroImage**, v. 28, n. 3, p. 618–26, 15 nov. 2005.