

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (NEUROLOGIA)
Área de Concentração: Neurociências

JULIA LOPES GONÇALEZ

**Avaliação da influência do ciclo estral e os efeitos da inibição da
recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de
corticosterona nas respostas ao modelo de medo condicionado ao
contexto**

Ribeirão Preto

2023

JULIA LOPES GONÇALEZ

**Avaliação da influência do ciclo estral e os efeitos da inibição da
recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de
corticoesterona nas respostas ao modelo de medo condicionado ao
contexto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina (Neurologia) da Faculdade de medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Neurociências

Orientadora: Professora Doutora Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto

2023

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.

Catálogo na publicação

Gonçalez, Julia Lopes

Avaliação da influência do ciclo estral e os efeitos da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona nas respostas ao modelo de medo condicionado ao contexto /Julia Lopes Gonçalez; orientadora: Cláudia Maria Padovan. - 2023

63f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2023.

1. Fêmeas
2. Imipramina
3. Metirapona
4. Transtorno de estresse pós-traumático.

GONÇALEZ, Julia Lopes. **Avaliação da influência do ciclo estral e os efeitos da inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona nas respostas ao modelo de medo condicionado ao contexto.** 2023. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, Julio e Lucélia, por todo o sacrifício

para que chegássemos até aqui.

Ao meu irmão Fábio, que todos os dias

me faz querer ser melhor. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

No mês em que me matriculei como aluna de mestrado, mais de 50 mil pessoas morreram no nosso país. Milhares dessas mortes teriam sido evitadas, se não vivêssemos em um governo negacionista. Que nos negou a saúde, a ciência, a educação. Hoje, dois anos e muita luta depois, concluo essa etapa da minha vida com mais esperança. A ciência brasileira, que resistiu durante quatro anos, agora pode respirar melhor. A valorização da educação e da ciência irá nos salvar da violência, da mentira, do medo. Agradeço, do fundo do meu coração, a todos aqueles que lutaram e lutam pela nossa sociedade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a minha orientadora Cláudia, pela confiança que depositou em mim nos últimos quatro anos. Por ter embarcado junto comigo, em um território quase desconhecido. As oportunidades e experiências que tive aqui mudaram minha trajetória. Obrigada!

Ao meu amigo e conselheiro, Rodrigo. Você sabe que eu não seria um décimo de quem sou hoje, como pessoa e profissional, se nossos caminhos não tivessem se encontrado. Obrigada pelo incentivo todas as vezes que pensei que não seria capaz e por me segurar pela mão, sempre que necessário.

Aos amigos que o Laboratório me proporcionou. À Giovana, por estar do meu lado nesses últimos anos, por todas as sessões de pós-terapia juntas. À Beatriz e ao Last, pelo apoio nos meus momentos de desespero (acadêmico ou não), pelas risadas que sempre tornaram nosso trabalho mais leve.

Ao Carlos, que esteve comigo desde o início de tudo. Pelo companheirismo em todas as etapas que desbravamos juntos na Universidade.

Aos grandes amigos que cruzaram meu caminho até aqui e foram fontes de aprendizado e crescimento: Bruno, Flávio, Marina, Hugo, Ígor, Carlos Eduardo. Obrigada pelo conforto e pelos momentos vividos.

A todos os professores que lutam pelo acesso a educação pública e de qualidade. À professora Beti, uma das minhas maiores fontes de inspiração, como professora, neurocientista e ser humano.

A minha família, que sempre foi presente. Vocês sempre acreditaram em mim e isso eu não tenho como agradecer. Obrigada, eu amo vocês!

Ao meu irmão, meu maior orgulho. Obrigada por estar comigo sempre, pelo suporte e incentivo. Eu te amo!

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e apoiaram durante esse caminho. Obrigada por terem lutado tanto para que eu pudesse realizar todos os sonhos que tive até aqui. Vocês são exemplos de resiliência e cuidado. Amo vocês!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“[...]

A liberdade que sempre defendemos é a de viver com dignidade, com pleno direito de expressão, manifestação e organização.

A liberdade que eles pregam é a de oprimir o vulnerável, massacrar o oponente e impor a lei do mais forte acima das leis da civilização. O nome disso é barbárie.

[...]

Ao ódio, responderemos com amor. À mentira, com a verdade. Ao terror e à violência, responderemos com a Lei e suas mais duras consequências.

Sob os ventos da redemocratização, dizíamos: ditadura nunca mais! Hoje, depois do terrível desafio que superamos, devemos dizer: democracia para sempre!

[...]”

Luiz Inácio Lula da Silva

RESUMO

GONÇALEZ, J. L. **Avaliação da influência do ciclo estral e os efeitos da inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona nas respostas ao modelo de medo condicionado ao contexto.** 2023. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O medo condicionado é um dos paradigmas comportamentais mais utilizado no estudo do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Resultados consistentes na literatura demonstram o papel relevante dos sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e da sinalização por glicocorticoides nas respostas ao modelo de condicionamento de medo. Além disso, sabe-se que diversas estruturas encefálicas participam da coordenação dessas respostas, como o córtex pré-frontal medial, a amígdala e o hipocampo. Dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (2022) revelam a prevalência do TEPT em mulheres. Nos últimos anos, a literatura vem demonstrando que os hormônios gonadais poderiam de alguma maneira participar da resposta de medo. Dessa forma, diversas evidências indicam uma possível modulação dos sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e de sinalização por glicocorticoides, pelo estradiol. Sendo assim, buscamos caracterizar as respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto em fêmeas, em todas as fases do ciclo estral. Além disso, buscamos entender como os tratamentos com imipramina (antidepressivo tricíclico) ou metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) afetariam as respostas comportamentais e a extinção da memória aversiva de medo, nas fases de proestro (altas concentrações plasmáticas de estradiol) ou metaestro (baixas concentrações plasmáticas de estradiol). Portanto, as fêmeas (PND=50) tiveram o ciclo estral determinado, durante 10 dias consecutivos. Após a verificação das fases do ciclo, foram submetidas ao protocolo de condicionamento de medo, que consistiu nas sessões de habituação, condicionamento e teste, sendo o condicionamento realizado em cada fase do ciclo estral, de acordo com o grupo experimental. Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos, os animais também tiveram o ciclo estral determinado e foram condicionados durante o proestro ou o metaestro, sendo previamente tratados com imipramina, metirapona ou veículo. Observamos que durante o condicionamento, ratas na fase de proestro congelaram significativamente menos que aquelas em metaestro ou estro. Em relação aos efeitos dos tratamentos, em ratas condicionadas durante o proestro, tanto a imipramina quanto a metirapona atenuaram a resposta comportamental de medo

durante o condicionamento e, ainda, facilitaram a extinção da memória aversiva. Por outro lado, quando as ratas foram condicionadas durante o metaestro, não foram observadas diferenças nas sessões de condicionamento ou durante a extinção. Entretanto, a metirapona aumentou a resposta comportamental de medo durante o texto. Sendo assim, os efeitos dos tratamentos no protocolo de condicionamento de medo, foi dependente da fase do ciclo estral. Nossos dados demonstram que as fases do ciclo estral influenciaram as respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto e, ainda, que a serotonina e os glicocorticoides participam dessas respostas, bem como as flutuações de hormônios gonadais ao longo do ciclo estral.

Palavras-chave: Fêmeas. Imipramina. Metirapona. Transtorno de estresse pós-traumático.

ABSTRACT

GONÇALEZ, J. L. **Evaluation of the influence of estrous cycle and the effects of serotonin and noradrenaline reuptake inhibition and corticosterone synthesis inhibition on responses to conditioned contextual-fear conditioning model.** 2023. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Fear conditioning is one of the most widely used behavioral paradigms in the study of post-traumatic stress disorder (PTSD). Consistent results in the literature demonstrate the relevant role of the serotonergic neurotransmission systems and glucocorticoid signaling in responses to the conditioning fear model. In addition, it is known that various brain structures participate in the coordination of these responses, such as the medial prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus. Epidemiological data from the World Health Organization (2022) reveal the prevalence of PTSD in women. In recent years, the literature has shown that gonadal hormones may participate in the fear response. Thus, several pieces of evidences indicate a possible modulation of the serotonergic neurotransmission and glucocorticoid signaling systems by estradiol. Therefore, we aimed to characterize the responses to the contextual fear conditioning protocol in females in all phases of the estrous cycle. In addition, we sought to understand how treatments with imipramine (tricyclic antidepressant) or metyrapone (corticosterone synthesis inhibitor) would affect behavioral responses and aversive fear memory extinction in the proestrus (high plasma estradiol concentrations) or metestrus (low plasma estradiol concentrations) phases. Therefore, female rats (PND=50) had their estrous cycle determined for 10 consecutive days. After verifying the cycle phases, they were subjected to the conditioning fear protocol, which consisted of habituation, conditioning, and testing sessions, with conditioning being performed in each estrous cycle phase according to the experimental group. For the evaluation of treatment effects, the animals also had their estrous cycle determined and were conditioned during proestrus or metestrus, and were previously treated with imipramine, metyrapone, or vehicle. We observed that during conditioning, rats in the proestrus phase froze significantly less than those in metestrus or estrus. Regarding treatment effects, in rats conditioned during proestrus, both imipramine and metyrapone attenuated the behavioral fear response during conditioning and facilitated aversive memory extinction. On the other hand, when rats were conditioned

during metestrus, no differences were observed during conditioning or extinction sessions. However, metyrapone increased the behavioral fear response during the test. Thus, treatment effects in the fear conditioning protocol were dependent on the estrous cycle phase. Our data demonstrate that the estrous cycle phases influenced the responses to the contextual fear conditioning protocol and that serotonin and glucocorticoids participate in these responses, as well as the fluctuations of gonadal hormones throughout the estrous cycle.

Keywords: Female. Imipramin. Metyrapone. Post traumatic stress disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Concentrações de GCs ao longo do dia em camundongos.....	17
Figura 2 – Concentrações de E2 e P4 ao longo do ciclo estral de ratas.....	19
Figura 3 – Determinação do ciclo estral.....	20
Figura 4 – Determinação das fases do ciclo estral a partir de lavados vaginais.....	28
Figura 5 – Delineamento experimental do Estudo 1.....	29
Figura 6 – Delineamento experimental do Estudo 2.....	30
Figura 7 – Influência das fases do ciclo no protocolo de medo condicionado ao contexto.....	34
Figura 8 – Condicionamento durante o proestro	35
Figura 9 – Condicionamento durante o metaestro.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ACTH	Adrenocorticotropina
ALO	Alopregnolona
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo leito da estria terminal
CeA	Amígdala central
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
E2	Estradiol
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ER	Receptor de estradiol
FSH	Hormônio folículoestimulante
GCs	Glicocorticoides
HIP	Hipocampo
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LCE	Labirinto em cruz elevado
LH	Hormônio luteinizante
mPFC	Córtex pré-frontal medial
NIH	National Institute of Health
NDR	Núcleos dorsais da rafe

NMR	Núcleos mediais da rafe
NR	Núcleos da rafe
OMS	Organização Mundial de Saúde
P4	Progesterona
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PNV	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais de experimentação	27
3.2 Determinação do ciclo estral	27
3.3 Delineamento experimental	28
3.4 Equipamentos, procedimentos e fármacos	30
3.4.1 Protocolo de medo condicionado ao contexto	30
3.4.2 Fármacos	31
3.4.3 Análise do comportamento	31
3.5 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Estudo 1 - Caracterização das respostas de fêmeas ciclando naturalmente ao protocolo de medo condicionado ao contexto	34
4.2 Estudo 2 - Efeitos da imipramina ou da metirapona nas respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto, durante o proestro ou metaestro	34
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

O comportamento, assim como características fisiológicas e morfológicas, foi selecionado durante milhares de anos de evolução. Em muitas espécies existem rituais de acasalamento, construção de ninhos e tocas, sendo tais características importantes para a sobrevivência. Em 1872, Darwin reconhece que as emoções fazem parte do processo evolutivo e, a partir disso, passou-se a compreender a importância dessas para o aumento do *fitness* individual (PLUTCHIK, 2001).

Desde então, as definições de emoção continuam como uma discussão atual (LEDOUX, 2012). Uma das muitas definições que podem ser aplicadas, é que as emoções são estados de curta duração, elicitados por um estímulo, induzindo mudanças fisiológicas, cognitivas e motoras (HESS; THIBAUT, 2009). Outra definição relevante é conduzida por Nesse (1990):

As emoções são modos especializados de operações moldadas pela seleção natural, para ajustar parâmetros fisiológicos, psicológicos e comportamentais de um organismo, de maneira que aumente sua capacidade e tendência de responder adaptativamente as ameaças e situações de características específicas.

Nesse contexto evolutivo, as emoções possuem alto valor adaptativo, visto que podem ser interpretadas como resultados do processamento de circuitarias, detectando e respondendo a eventos ambientais (ADOLPHS, 2013; LEDOUX, 2012). Entretanto, a depender da intensidade e duração desses estímulos, esses podem ser entendidos como estressores e a persistência pode acarretar processos mal adaptativos (MCEWEN, 2012). Tais processos podem eliciar o surgimento de transtornos psiquiátricos, como os transtornos depressivos e de ansiedade. De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS; 2022), 970 milhões de pessoas convivem atualmente com algum transtorno psiquiátrico, sendo 31% transtornos de ansiedade. Desse modo, os transtornos psiquiátricos tornam-se uma questão de saúde pública, sendo essencial o investimento em novos estudos que possam contribuir para o avanço de novas terapias.

Até recentemente, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) era considerado um tipo de transtorno de ansiedade, entretanto, atualmente o TEPT está classificado em uma categoria própria, que inclui outros transtornos relacionados ao trauma e medo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al, 2014). De fato, a neurociência comportamental dependeu algumas dezenas de anos diferenciando medo e ansiedade. Conceitualmente, ambas as emoções podem ser consideradas como estados, causados por estímulos externos ou internos, subjacentes a um conjunto de reações comportamentais, fisiológicas e hormonais (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Por conta dessa proximidade conceitual, os limites entre cada uma

delas permanecem incertos (SYLVERS; LILIENFELD; LAPRAIRIE, 2011). Usualmente, a ansiedade é definida como um estado de hipervigilância a uma ameaça incerta ou futura (distal), enquanto o medo é uma reação aversiva, causada pela percepção de um estímulo ameaçador (proximal), condicionado ou não (STEIMER, 2002).

O TEPT pode ser desenvolvido por indivíduos que vivenciaram experiências de caráter traumático, como guerras, desastres ou abusos sexuais. Pacientes diagnosticados com TEPT podem experimentar constantes *flashbacks*, passando a evitar situações ou lugares que evocam as memórias de medo, levando a sintomas de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al, 2014). Nas últimas décadas, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas a fim de esclarecer os possíveis mecanismos de desenvolvimento do TEPT, como fatores genéticos e ambientais (BROEKMAN; OLFF; BOER, 2007; DIGANGI et al., 2013). Nesse contexto, os modelos animais destacam-se pela relevância na contribuição da elucidação de mecanismos neurobiológicos subjacentes ao TEPT (COHEN et al., 2012; FLANDREAU; TOTH, 2017).

Dentre os modelos animais, um dos mais utilizados é o medo condicionado (FLANDREAU; TOTH, 2017; VERBITSKY; DOPFEL; ZHANG, 2020). Nesse paradigma, o animal é exposto a um estímulo inicialmente neutro, como um determinado contexto ou tom sonoro, o estímulo condicionado (EC), que é pareado a um estímulo aversivo incondicionado (EI), como o choque nas patas. Posteriormente, a apresentação apenas do EC é capaz de revelar uma resposta de medo, mesmo na ausência do EI (BAUER, 2015). Sendo assim, o condicionamento consiste em um modelo de aprendizagem em que é construída uma associação entre EC e EI (BITTERMAN, 2006). Em roedores, a resposta comportamental de medo é definida pelo congelamento, caracterizado pela ausência completa de movimentos, inclusive das vibrissas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1971; FANSELOW, 1980). Além da resposta comportamental também ocorrem respostas fisiológicas, dentre elas, são observadas alterações autonômicas, como aumento da pressão arterial (LEDOUX et al., 1988), aumento da adrenalina pela ativação do eixo simpato-adreno-medular (NIJSEN et al., 1998), e aumento na secreção de glicocorticoides (GCs) devido à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA; WOODRUFF et al., 2018).

Diversos estudos contribuíram para o esclarecimento destas respostas, bem como as estruturas encefálicas envolvidas na circuitaria de medo (BURGHARDT; BAUER, 2013). Dentre as estruturas chaves para o processamento da aquisição, consolidação, evocação e extinção da memória aversiva destaca-se a amígdala basolateral (BLA), o hipocampo (HIP) e o córtex pré-frontal medial (mPFC; YAVAS; GONZALEZ; FANSELOW, 2019). O BLA

recebe projeções convergentes provenientes de regiões corticais somatossensoriais (ROMANSKI et al., 1993), enquanto a amígdala central (CeA) envia projeções para sistemas efetores, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG; BAUER, 2015). Já o hipocampo estabelece conexões recíprocas com o BLA e o mPFC, sendo essencial para o pareamento do EC e EI (CHAAAYA; BATTLE; JOHNSON, 2018; VERTES, 2006). O mPFC e o BLA também estabelecem conexões recíprocas entre si (ARNSTEN et al., 2015; MILLER; COHEN, 2001). O núcleo leito da estria terminal (BNST) recebe projeções do BLA e estabelece conexões com sistemas efetores, assim como a CeA (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; RESSTEL et al., 2008). A comunicação entre cada uma dessas estruturas está estreitamente relacionadas à sistemas de neurotransmissão, neuropeptídeos e neuroendócrinos.

Em relação aos sistemas de neurotransmissão, a serotonina (5-HT) desempenha um papel relevante (ALMADA; COIMBRA; BRANDÃO, 2015; BAUER, 2015; BORELLI et al., 2005). Na clínica, um dos tratamentos de primeira linha para pacientes diagnosticados com TEPT são os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS), que atuam bloqueando o transportador de 5-HT (SERT), inibindo sua recaptação e, conseqüentemente aumentando a concentração desse neurotransmissor nas fendas sinápticas e, assim, facilitando a neurotransmissão serotoninérgica (BORELLI et al., 2005; BURGHARDT et al., 2013). Estudos realizados em roedores, utilizando o paradigma do medo condicionado, demonstraram que, assim como na clínica, a administração sistêmica dos antidepressivos, diminuem a resposta de medo (BURGHARDT et al., 2013; HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1996; INOUE; KITAICHI; KOYAMA, 2011). Entretanto, os efeitos dos antidepressivos parecem seletivos para o 5-HT, uma vez que os inibidores da recaptação de noradrenalina não exercem os mesmos efeitos na atenuação do medo condicionado (SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006).

A ação do 5-HT no sistema nervoso central (SNC) ocorre a partir da ligação com os seus receptores. Atualmente, são conhecidas 7 famílias e 15 subtipos de receptores de 5-HT, que são expressos em diferentes regiões encefálicas. A participação da 5-HT nos transtornos psiquiátricos e no modelo de medo condicionado não está totalmente elucidada, entretanto, estudos realizados utilizando agonistas e/ou antagonistas de receptores 5-HT contribuem para esse entendimento.

No encéfalo, os núcleos da rafe (NR) são o principal núcleo de projeção de serotonina, sendo que o receptor 5-HT_{1A} é expresso como autorreceptor, contribuindo para a manutenção do tônus serotoninérgico (GARTSIDE et al., 1999). Nas demais estruturas, os receptores 5-HT_{1A} são heterorreceptores, como no HIP (CHALMERS; WATSON, 1991). Nesse sentido, foi demonstrado que a ativação desses receptores na amígdala gera uma inibição (STEIN;

DAVIDOWA; ALBRECHT, 2000). Sendo assim, a ativação de 5-HT_{1A} no mPFC (ALMADA; COIMBRA; BRANDÃO, 2015), no HIP dorsal (ALMADA et al., 2009) e no núcleo mediano da rafe (BORELLI et al., 2005) foram capazes de reduzir a expressão de medo. Por outro lado, a ativação de receptores do tipo 5-HT₃ e 5-HT₂ parecem estar associados à excitação da amígdala (STEIN; DAVIDOWA; ALBRECHT, 2000). A ativação de receptores do tipo 5-HT₃ poderia estar relacionada a um maior condicionamento de medo ao contexto, mas não com a presença de pistas (BAUER, 2015). Da mesma forma, a ativação de receptores 5-HT₂ no BLA e BNST estariam relacionados ao aumento do aprendizado de medo (MACEDO et al., 2007). Sendo assim, o papel da 5-HT no paradigma do medo condicionado depende do tipo do estímulo, do receptor envolvido e, ainda, a estrutura encefálica em que esses receptores estão expressos.

Para além dos sistemas de neurotransmissão, a regulação neuroendócrina, especialmente o sistema de sinalização por GCs, é fundamental durante as respostas aos estressores (DONLEY; SCHULKIN; ROSEN, 2005), bem como durante processos de memória e aprendizagem (LUPIEN; MCEWEN, 1997). Os GCs são uma classe de hormônios derivados do colesterol, sintetizados pela glândula adrenal, que incluem cortisol, corticosterona, androstenediona e aldosterona. O principal GCs circulante em seres humanos é o cortisol, enquanto em roedores é a corticosterona (CORT; GRANNER; WANG; YAMAMOTO, 2015). Os níveis de GCs plasmáticos são influenciados pelo ritmo circadiano (Fig. 1; GONG et al., 2015), aumentando diante de estímulos estressores, a partir da ativação do eixo HPA. Ao receber projeções provenientes do CeA o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN; CHROUSOS, 1992) sintetiza e secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH; DE SOUZA, 1995). O CRH estimula a síntese de adrenocorticotropina (ACTH) pela hipófise anterior, que por sua vez, atuará no córtex da glândula adrenal, levando a síntese e secreção de GCs (TAFET; NEMEROFF, 2020).

Figura 1 – Concentrações de GCs ao longo do dia em camundongos

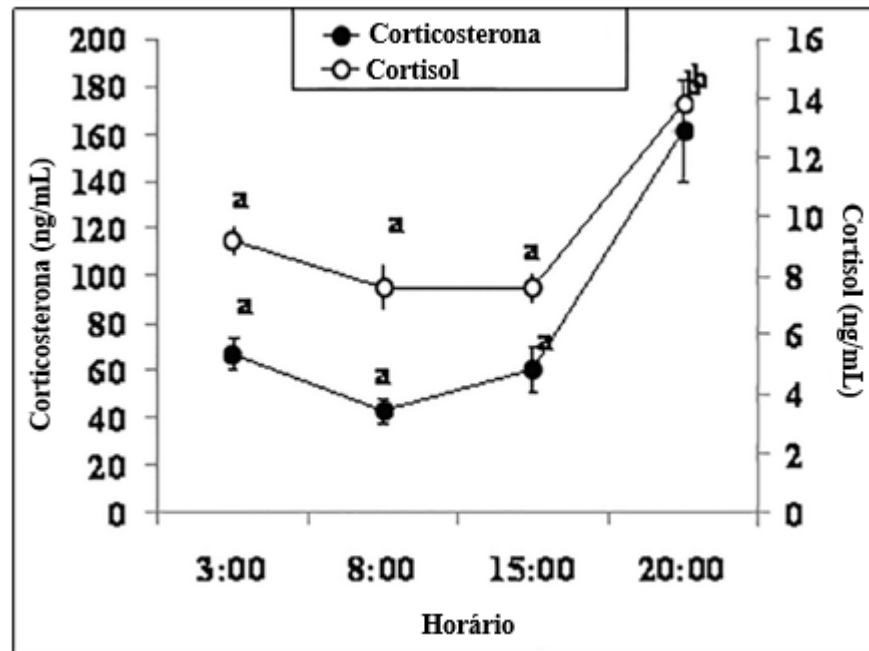


Figura 1 – Concentrações de corticosterona e cortisol plasmáticos de camundongos machos em diferentes horários do dia. Valores sem letra comum diferem dentro de cada grupo ($p < 0,05$; $n=6$). Fonte: Gong et al. (2015), modificado.

Os GCs são importantes para tarefas cognitivas e de aprendizado (MEIR DREXLER; WOLF, 2017; SAZMA; SHIELDS; YONELINAS, 2019). Assim, possuem efeitos em diferentes regiões alvo, a partir da ligação aos receptores MR e GR (DONLEY; SCHULKIN; ROSEN, 2005). Durante a presença de um estressor, inicialmente, o aumento da circulação plasmática de CORT leva a uma maior mobilização energética e alterações na expressão gênica das células alvo (DE KLOET; KARST; JOËLS, 2008). Durante o aprendizado de medo, a CORT participa de diferentes etapas nessa circuitaria, sendo importante para a aquisição e consolidação dessas memórias (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2017a; KORTE, 2001). Além disso, os GCs também participam da extinção do condicionamento (BLUNDELL et al., 2011a), visto que esse processo consiste em um novo aprendizado. Nesse contexto, a administração sistêmica de metirapona, afeta as respostas de medo (BARRETT; GONZALEZ-LIMA, 2004; CONRAD; MAULDIN-JOURDAIN; HOBBS, 2001; KELLER et al., 2015; WOODRUFF et al., 2018). A metirapona é um fármaco que inibe a enzima 11- β -hidroxilase, responsável pela conversão de 11-Deoxicortisol em CORT na biossíntese dos hormônios esteroides.

Dados epidemiológicos da OMS (2022) têm demonstrado uma prevalência de TEPT quase duas vezes maior em mulheres quando comparadas aos homens, o que já vem sendo discutido na literatura (BRESLAU, 2009; KESSLER, 1995). Todavia, os trabalhos publicados que utilizaram fêmeas no modelo de condicionamento e extinção do medo, não superam 2% (LEBRON-MILAD; MILAD, 2012), visto que historicamente não é comum a utilização de fêmeas em diversas áreas da ciência (BEERY; ZUCKER, 2011).

As fêmeas de mamíferos apresentam flutuações endócrinas cíclicas, como o ciclo menstrual em humanos e o ciclo estral em roedores, que possui duração média de 4-5 dias. O ciclo estral é caracterizado pelas fases de proestro, estro, metaestro e diestro (GEORGE J. KRINKE, 2000). O estro corresponde à fase em que as fêmeas são receptivas à cópula, sendo que mudanças nas concentrações basais dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) permitem a ovulação. Além desses dois hormônios, também ocorrem flutuações de estrógenos e progesterona (P4) ao longo do ciclo estral (Fig. 2; BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). As fases de metaestro e diestro são correspondentes a fase folicular do ciclo menstrual dos seres humanos. Durante o metaestro ainda há uma concentração intermediária de P4 devido ao corpo lúteo e os níveis de estrógenos são basais. Já no diestro, tanto os estrógenos como P4 estão em níveis reduzidos. O proestro é a fase pré-ovulatória, onde os estrógenos aumentam rapidamente, atingindo os picos mais elevados, bem como as concentrações de P4, que começam a aumentar poucas horas após os estrógenos (BECKER et al., 2002).

Figura 2 – Concentrações de E2 e P4 ao longo do ciclo estral de ratas

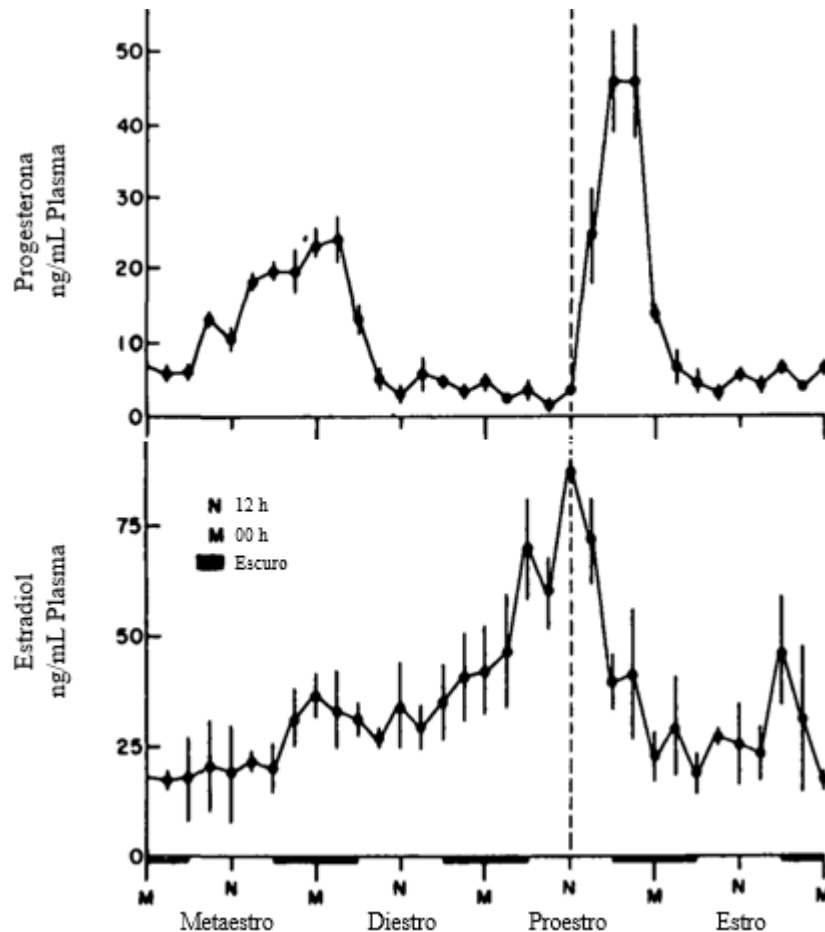


Figura 2: Concentrações plasmáticas (\pm EPM) de P4 e E2 ao longo do ciclo estral de ratas. Intervalo de 3 h entre cada coleta (n=5). Fonte: Butcher; Collins; Fugo (1974), modificado.

Os estrógenos são uma classe de hormônios esteroides, que incluem estrona, estriol, estetrol e estradiol, sendo sintetizados principalmente nos ovários e em níveis reduzidos na adrenal (NELSON; KRIEGSFELD, 2017). O hormônio que possui maior afinidade com os receptores é o 17β -estradiol (E2; KUIPER et al., 1997), que também pode ser produzido a partir da conversão da testosterona pela enzima aromatase, abundante em algumas regiões encefálicas, como hipotálamo, amígdala, hipocampo, e córtex (ROSELLI, 2007). O pico de E2 ocorre durante o proestro até o início do estro, sendo basais durante o metaestro e subindo novamente ao final do diestro (TAXIER; GROSS; FRICK, 2020). Da mesma forma, P4 também é um hormônio esteroide, sintetizado principalmente nos ovários e nas glândulas adrenais, atingindo o pico de concentrações plasmáticas durante o proestro. Assim como o E2, P4 também pode ser sintetizado no encéfalo, em neurônios ou células da glia (GUENNOUN et al., 2015).

Cada fase do ciclo possui duração média de algumas horas, que podem ser determinadas a partir de diferentes técnicas, como a medição direta das concentrações plasmáticas do E2 e P4 ou a análise histológica dos ovários. Uma das técnicas mais utilizadas é a observação das células encontradas no epitélio vaginal, que pode ser realizada a partir do lavado ou esfregaço vaginal (BECKER et al., 2005). Essa técnica consiste na classificação e na predominância dos tipos celulares encontrados na citologia vaginal (Fig. 3). A determinação consecutiva ao longo dos dias permite a avaliação da regularidade do ciclo, sendo consideradas regulares aquelas que possuem a alternância entre fases correta (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Figura 3 – Determinação das fases do ciclo estral

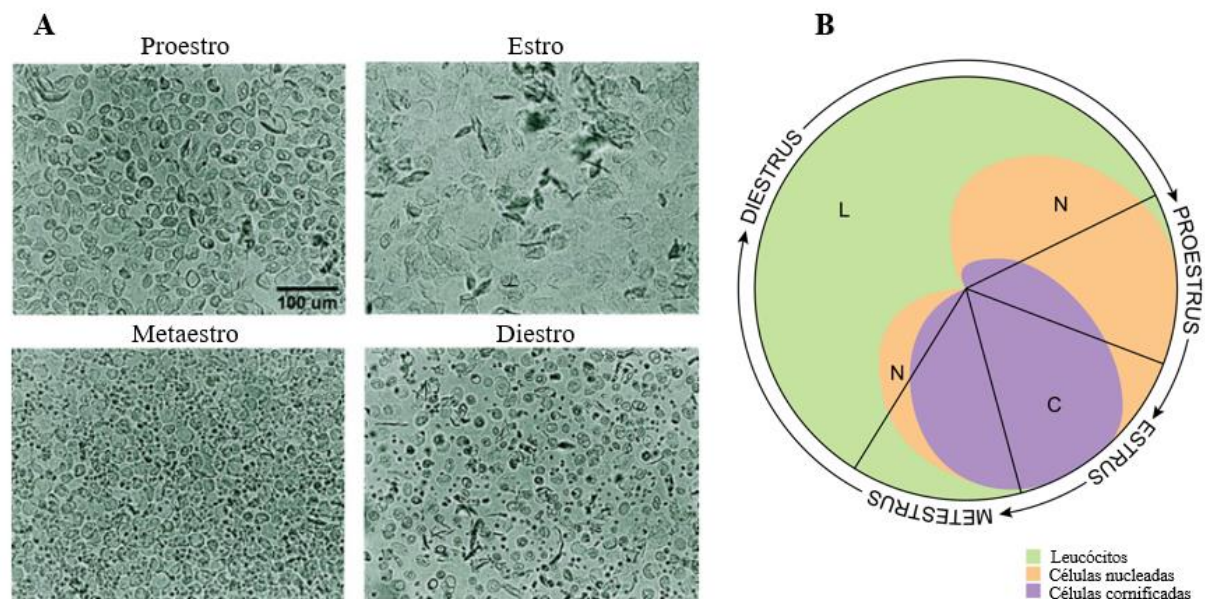


Figura 3 – Painel A: fotomicrografias dos lavados vaginais, sem coloração, ao longo das 4 fases ciclo estral. Fonte: Hubscher; Brooks; Johnson, (2005), modificado. Painel B: representação dos tipos celulares e proporção relativa entre eles nas 4 fases do ciclo estral. Fonte: Byers et al., (2012), modificado.

Diversos estudos já demonstraram que durante o ciclo estral são observadas uma série de mudanças. Dentre elas, ocorrem alterações metabólicas, como menor ingestão de alimentos (FANTINO; BRINNEL, 1986), redução do peso corporal e aumento do gasto energético durante o estro em comparação ao diestro (PARKER et al., 2001). Além disso, também são observadas alterações comportamentais para além dos comportamentos sexuais (LOVICK; ZANGROSSI, 2021).

Para elucidar possíveis diferenças sexuais em transtornos psiquiátricos, uma série de trabalhos foram realizados comparando machos e fêmeas em diferentes modelos animais. Nesse sentido, fêmeas demonstram menos comportamentos do tipo ansiosos no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (KNIGHT et al., 2021). No modelo do nado forçado, fêmeas apresentam níveis menores de imobilidade em comparação aos machos (MARTÍNEZ-MOTA et al., 2011). Já nos modelos de condicionamento de medo, fêmeas congelam significativamente menos em comparação aos machos (GRESACK et al., 2009; MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994). Sendo assim, parece que apesar da literatura limitada, a existência de diferenças sexuais nesse contexto é um consenso.

Quando as fases do ciclo são consideradas nos protocolos experimentais, a literatura é bastante controversa. Em modelos de ansiedade, alguns estudos demonstraram níveis de ansiedade reduzidos no proestro em comparação a outras fases do ciclo (D'SOUZA; SADANANDA, 2017; MARCONDES et al., 2001; WALF; FRYE, 2007). Contrariamente, outros autores não reportaram a influência do ciclo estral (CHARI et al., 2020; SAKAE et al., 2015). O mesmo ocorre em relação ao condicionamento de medo, sendo que uma parte significativa dos estudos revelaram que fêmeas na fase de proestro congelam significativamente menos em relação as outras fases do ciclo (GRUENE et al., 2015a; MARKUS; ZECEVIC, 1997; MILAD et al., 2009). Em contrapartida, outros autores não revelaram diferenças em relação as fases do ciclo (CHANG et al., 2009; COSSIO et al., 2016). Portanto, é imprescindível que novos estudos sejam conduzidos para o esclarecimento da influência das fases do ciclo estral nesses modelos, contribuindo para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos da maior vulnerabilidade de mulheres aos transtornos de ansiedade e medo.

Ao longo dos últimos anos, uma série de trabalhos vêm demonstrando o papel modulador do E2 nos sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e de sinalização por GCs.

Em relação ao sistema serotoninérgico, o E2 pode participar de diferentes etapas, desde a síntese até a degradação de 5-HT (BETHEA et al., 2002). Desse modo, foi demonstrado que o tratamento com E2 em primatas não humanos aumenta significativamente o mRNA da enzima triptofano hidroxilase, passo limitante na síntese de 5-HT (BETHEA et al., 2002). Além disso, o E2 também participa da modulação da expressão de receptores de 5-HT. Nesse sentido o tratamento com E2 aumenta a densidade do receptor 5-HT_{2A} no córtex (SUMNER; FINK, 1995) e, em combinação com a progesterona, aumenta a densidade do mRNA do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo, enquanto diminui no núcleo dorsal da rafe (BIRZNIECE et al., 2001). O tratamento com E2 também promove a diminuição de mRNA do transportador de 5-HT no NR (PECINS-THOMPSON; A. BROWN; BETHEA, 1998) e da densidade da enzima monoamina

oxidase (GUNDLAH; LU; BETHEA, 2002). Esses resultados indicam que o E2 parece modular a transmissão serotoninérgica, o que poderia estar associado a possíveis diferenças sexuais em transtornos psiquiátricos. Dessa forma, compreender os efeitos de antidepressivos durante as flutuações de E2 é fundamental para entender a relação entre esse hormônio e o sistema serotoninérgico.

Em relação ao sistema de sinalização por glicocorticoides, diferenças sexuais têm sido apontadas pela literatura (HANDA et al., 1994; HANDA; WEISER, 2014). Evidências demonstram um nível maior de CORT em fêmeas em comparação aos encontrados em machos (BABB et al., 2013; IWASAKI-SEKINO et al., 2009). Além disso, após a ativação do eixo HPA, as concentrações de CORT demoram mais tempo para voltar ao nível basal em fêmeas em comparação aos machos, o que poderia indicar diferenças na retroalimentação negativa do eixo (IWASAKI-SEKINO et al., 2009). Ademais, durante o proestro, as concentrações plasmáticas de CORT são maiores em comparação as outras fases do ciclo (CAREY et al., 1995; VIAU; MEANEY, 1991). Da mesma forma, o tratamento com E2 em ratas ovariectomizadas, aumenta a concentração de CORT (LIU et al., 2012) e a administração de antagonista de receptores de E2 (ER) inibem a liberação de CORT (ISGOR et al., 2003). De maneira contraditória, Kashefi e Rashidy-Pour (2014) observaram que quando os níveis de E2 são baixos, a CORT tem um efeito negativo na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, diminuindo a resposta comportamental de congelamento. Por outro lado, quando os níveis de E2 são altos, o tratamento com CORT aumenta a consolidação da memória, aumentando também a resposta comportamental de congelamento (KASHEFI; RASHIDY-POUR, 2014). Uma das possíveis explicações poderia ser a ação de E2 em estruturas encefálicas que envolvem o processamento do condicionamento de medo ao contexto. O HIP está altamente relacionado as memórias aversivas contextuais (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001) e é uma região sensível ao aumento de GCs (ROOZENDAAL, 2002). Em vista disso, foi demonstrado que durante a fase de proestro há um aumento na densidade de espinhas dendríticas de neurônios piramidais da região CA1 no HIP (WOOLLEY; MCEWEN, 1992). Sendo assim, esses resultados demonstram que ocorrem interações entre os GCs e o E2, mas que os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados.

Em relação às diferenças sexuais no modelo de medo condicionado ao contexto, a literatura é bastante consistente. Contudo, a influência das fases do ciclo nessas respostas ainda permanece incerta. Portanto, buscamos caracterizar as respostas de fêmeas, de maneira criteriosa, em todas as fases do ciclo estral. Evidências apontam para a participação dos GCs e do sistema de neurotransmissão serotoninérgica na regulação das respostas ao medo

condicionado. Por outro lado, as possíveis interações entre os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e de sinalização por GCs e E2 permanecem pouco esclarecidas. Além disso, apesar dos efeitos dos antidepressivos e da metirapona serem descritos no medo condicionado (CAMPOS-CARDOSO, 2022), não existem evidências na literatura dos efeitos de ambos os tratamentos em fêmeas nesse modelo. Sendo assim, nossa hipótese é que o tratamento com imipramina antes do condicionamento, levaria a uma inibição global da recaptção de serotonina e noradrenalina atenuando a resposta comportamental de congelamento e facilitando a extinção da memória aversiva. De forma similar, o tratamento com a metirapona, e consequente diminuição da concentração plasmática de CORT, durante o condicionamento, poderia atenuar a aquisição da memória aversiva e levar a facilitação da extinção. Além disso, os efeitos poderiam ser dependentes da fase do ciclo estral, em vista das flutuações endócrinas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas de fêmeas ao protocolo de medo condicionado ao contexto e a influência das fases do ciclo estral em tais respostas. Além disso, buscamos avaliar os efeitos da imipramina, um antidepressivo tricíclico, e da metirapona, inibidor da síntese de corticosterona, em duas fases do ciclo estral.

2.1 Objetivos específicos

- I. Avaliar a influência do ciclo estral nas respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto.
- II. Avaliar os efeitos da imipramina ou da metirapona, antes do condicionamento, durante as fases de proestro ou metaestro.
- III. Investigar os efeitos da imipramina ou da metirapona, antes do condicionamento, durante as fases de proestro ou metaestro, na extinção da memória aversiva de medo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Para o protocolo experimental foram obtidas fêmeas prenhes primigestas da linhagem *Wistar Hannover* do Biotério Central do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em biotério, mantido em ciclo claro-escuro de 12 h, com início do ciclo claro às 6:30 h e temperatura controlada ($23\pm 1^\circ\text{C}$). Os animais sempre tiveram livre acesso à água filtrada e ração comercial (Nuvilab®), com exceção dos períodos de higienização das caixas e durante os procedimentos experimentais.

Até o nascimento dos filhotes, as fêmeas prenhes foram mantidas aos pares em microisoladores de polisulfona (medidas 41x34x16) em *rack* ventilada (ALESCO®), com 20 trocas de ar/hora). Após o nascimento dos filhotes, a mãe e sua ninhada foram alojadas em outro microisolador, permanecendo juntos até o desmame, aos 21 dias de vida. Após o desmame, os animais foram alojados aos pares, de acordo com o sexo. Os machos provenientes dessas ninhadas foram utilizados em outros projetos do laboratório.

Os cuidados com os animais foram orientados pelos Princípios Éticos na Experimentação Animal. Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo n°: 2019.1.1451.59.6.

3.2 Determinação do ciclo estral

Ao completarem 50 dias de vida, as ratas passaram pelo protocolo de determinação do ciclo estral. Cada animal teve seu ciclo determinado e registrado uma vez ao dia entre 8 h e 10 h da manhã, a partir do lavado vaginal (BECKER et al., 2005) por no mínimo 10 dias consecutivos. Foram utilizadas uma pipeta e 40 μL de solução salina 0,9%, a gota foi inserida no canal vaginal e coletada entre 4 e 5 vezes. O fluido foi colocado sob uma lâmina de vidro e posteriormente analisado em microscópio (DM 5500B, Leica Microsystems, Alemanha).

Cada fase do ciclo foi determinada a partir da presença e/ou ausência e proporção entre as células epiteliais presentes no lavado vaginal (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005). Durante o proestro (Fig. 4.A) é possível observar células epiteliais nucleadas e arredondadas, com alta densidade celular. Já durante o estro (Fig. 4.B) a predominância é de células cornificadas fusiformes. Tanto durante o metaestro (Fig. 4.C) como durante o diestro (Fig. 4.D), há presença de leucócitos. Durante o metaestro há uma alta densidade celular e presença de outros tipos celulares, como células epiteliais anucleadas e células fusiformes. Já durante o diestro, a densidade celular é baixa e o predomínio de leucócitos é evidente.

Figura 4 – Determinação das fases do ciclo estral a partir de lavados vaginais

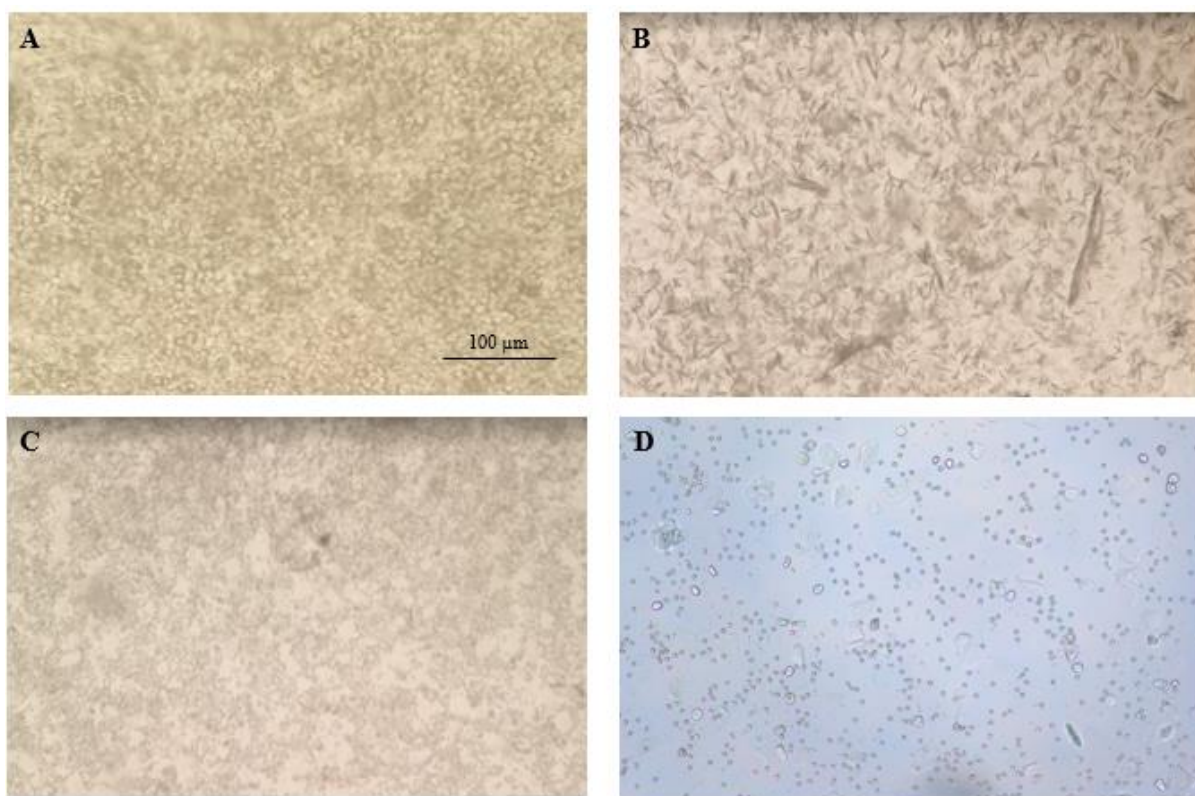


Figura 4 – Fotomicrografias das lâminas de lavado vaginal, em lentes objetivas de 10x. (A) Proestro. (B) Estro. (C) Metaestro. (D) Diestro.

3.3 Delineamento experimental

Após a determinação das fases do ciclo, as ratas foram submetidas aos protocolos experimentais. Os experimentos comportamentais foram divididos em duas etapas diferentes: estudo 1 e estudo 2. Os procedimentos consistiram nas sessões de habituação, condicionamento, teste e quatro reexposições ao contexto para avaliar a extinção da memória aversiva, que serão descritos detalhadamente adiante.

No estudo 1, o objetivo foi caracterizar as respostas de fêmeas ciclando naturalmente ao protocolo de medo condicionado ao contexto (Fig. 5). As ratas foram condicionadas nas diferentes fases do ciclo estral, a fim de avaliar a influência de cada uma das fases dos ciclos em tais respostas.

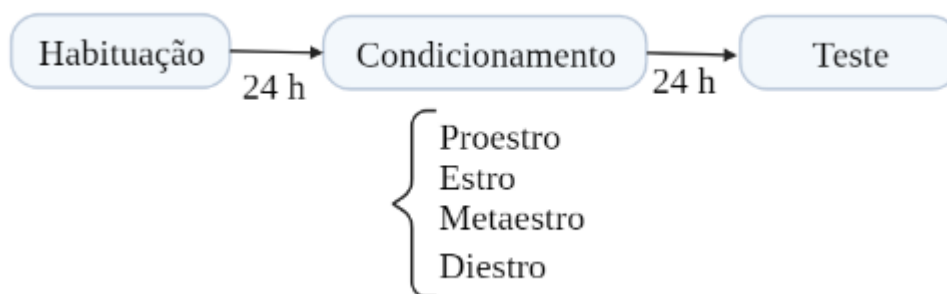
Figura 5 – Delineamento experimental do Estudo 1

Figura 5 – Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Estudo 1. Fonte: autor.

No estudo 2, os objetivos foram avaliar os efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona entre a sessão de habituação e condicionamento nas fases de proestro ou metaestro, além de avaliar a extinção da memória aversiva de medo (Fig. 6). Em cada uma das duas fases do ciclo avaliadas, os animais foram divididos nos grupos controle, imipramina e metirapona. Os tratamentos ocorreram da seguinte forma: o grupo controle recebeu três injeções de veículo, a primeira imediatamente após a habituação, a segunda 19 h antes do condicionamento e a terceira 1 h antes do condicionamento. O grupo imipramina seguiu os mesmos intervalos de tempo que o grupo controle. Já os animais do grupo metirapona, receberam as duas primeiras injeções de veículo e a terceira injeção de metirapona 30 min antes do condicionamento.

Figura 6 – Delineamento experimental do Estudo 2

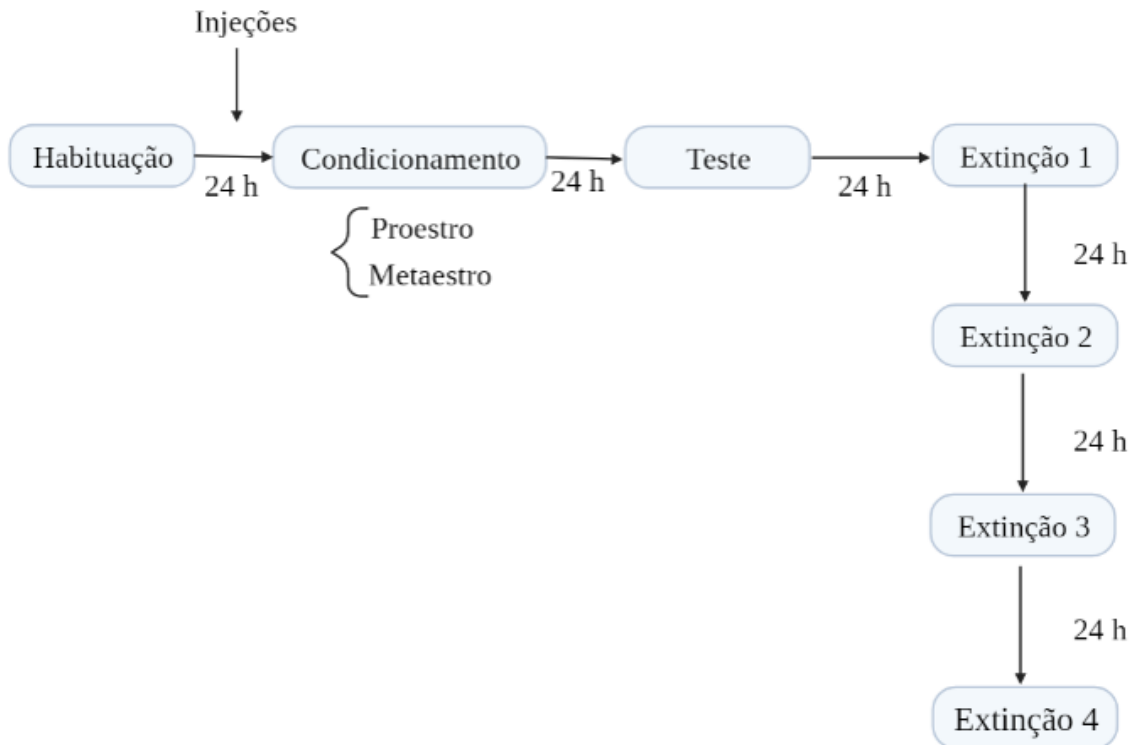


Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Estudo 2. Fonte: autor.

3.4 Equipamentos, procedimentos e fármacos

3.4.1 Protocolo de medo condicionado ao contexto

Para o protocolo de medo condicionado ao contexto foi utilizada uma caixa de vai-e-vem (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, modelo EP-111), com medidas 48 x 27 x 30 cm. Sob a tampa da caixa, confeccionada em material acrílico transparente, foi posicionada uma câmera GoPro Hero+® para registro do comportamento. A caixa é conectada ao *software* Esquiva Ativa 3.8.9.1 (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto) e está posicionada dentro de uma caixa de isolamento acústico (Bonther Equipamentos, Ribeirão Preto), com sistema de exaustão. O piso da caixa de vai-e-vem é confeccionado em barras de aço inox, onde podem ser liberados choques de acordo com a programação registrada no *software*.

As sessões ocorreram sempre a cada 24 h, sendo todas elas registradas para a análise do comportamento descrita adiante. Durante a sessão de habituação as ratas puderam explorar a caixa livremente durante 10 min, sem a presença de qualquer estímulo.

O condicionamento ocorreu nos dias específicos de cada fase do ciclo. Os animais foram colocados na caixa, onde permaneceram por 2 min sem a presença de estímulos. Após esse período, os choques nas patas foram iniciados. Cada animal recebeu 6 choques de intensidade 1 mA, duração de 3 s, em intervalos randômicos entre 30 e 90 s.

Para o teste e as subsequentes sessões de extinção, os animais foram novamente apresentados ao contexto do condicionamento, durante 10 min, sem a presença de qualquer estímulo. Metade dos animais passaram pelo procedimento de eutanásia após o teste, enquanto a outra metade, após a sessão de extinção 4.

3.4.2 Fármacos

Em todos os grupos experimentais as injeções foram administradas por via intraperitoneal. A imipramina foi administrada em três injeções de 15 mg/Kg (dissolvida em salina 0,9%/etanol 5%, Sigma Aldrich®; CAMPOS-CARDOSO et al., 2021). Já a metirapona foi administrada em dose única de 50 mg/Kg (dissolvida em salina 0,9%/etanol 5%, Sigma Aldrich®; CAMPOS-CARDOSO et al., 2023).

3.4.3 Análise do comportamento

Como medida de comportamento, foi analisado o congelamento, definido pela ausência de movimentos, inclusive das vibrissas (FANSELOW, 1980). Durante a sessão de condicionamento, o comportamento foi analisado nos primeiros 2 min, onde não havia a presença de estímulos incondicionados e, ainda, os 30 s após o término de cada choque, totalizando 300 s. Nas sessões teste e extinções foram analisados os 10 min totais. Todos os resultados estão expressos como a porcentagem de tempo gasta em congelamento durante cada sessão.

3.5 Análise estatística

No Estudo 1, realizamos uma ANOVA de medidas repetidas comparando os tempos de congelamento entre a habituação e o condicionamento, sendo os fatores *tempo* (habituação X condicionamento) e *ciclo* (proestro X estro X metaestro X diestro). Para a sessão teste, foi realizada uma ANOVA de uma via comparando-se os efeitos do fator *ciclo*. No estudo 2, realizamos uma ANOVA de medidas repetidas comparando os tempos de congelamento entre a habituação e o condicionamento, sendo os fatores *tempo* (habituação X condicionamento) e *tratamento* (veículo X imipramina X metirapona). Para as sessões de extinção, foi realizada novamente uma ANOVA de medidas repetidas, sendo os fatores analisados *tempo* (extinção 1

X extinção 2 X extinção 3 X extinção 4) e *tratamento* (veículo X imipramina X metirapona. Tanto a ANOVA de uma via quanto a de medidas repetidas foram seguidas pelo teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8.0®. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ e os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1 - Caracterização das respostas de fêmeas ciclando naturalmente ao protocolo de medo condicionado ao contexto

Em um primeiro momento, buscamos avaliar a influência das fases do ciclo estral nas respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto. Para tanto, as ratas tiveram o ciclo estral determinado, a fim de garantir sua regularidade, e passaram pelas sessões de habituação, condicionamento e teste (Fig. 5). Ao analisarmos o condicionamento (Fig.7A), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos ao comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 40) = 233,8$; $p < 0,05$]. Além disso, a fase de proestro congelou significativamente menos em comparação as fases de metaestro e estro [*ciclo* $F(3, 47) = 4,861$; $p < 0,05$]. Também foi observada uma interação entre os fatores *tempo* e *ciclo* [$F(2, 62) = 11,34$; $p < 0,05$]. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre os grupos durante o teste (Fig. 4B).

Figura 7 – Influência das fases do ciclo no protocolo de medo condicionado ao contexto

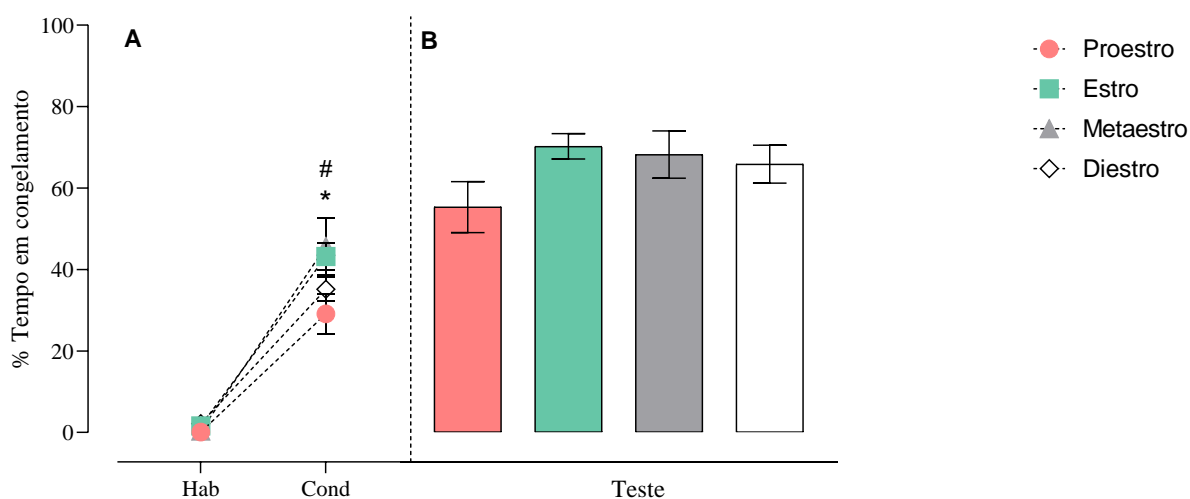


Figura 7 – Durante o condicionamento a fase de proestro congela significativamente menos que as fases de metaestro e estro (A). Durante o teste (B), não foram encontradas diferenças significativas entre as fases do ciclo. As barras e os símbolos representam a média (\pm EPM) da porcentagem do tempo em congelamento. Hab = habituação, Cond = condicionamento. Os dados representados no painel A foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, enquanto no painel B foi utilizado a ANOVA de um fator. $n = 6-12$ por grupo. Fonte: autor

4.2 Estudo 2 - Efeitos da imipramina ou da metirapona nas respostas ao protocolo de medo condicionado ao contexto, durante o proestro ou metaestro

No estudo 2, foram avaliados os efeitos dos tratamentos com imipramina ou metirapona, entre a habituação e o condicionamento, durante as fases de proestro ou metaestro (Fig. 6).

Quando as ratas foram condicionadas durante o proestro (Fig. 8A), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos ao comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 62) = 164,7$; $p < 0,05$]. Foram verificados efeitos do fator *tratamento* [*tratamento* $F(2, 62) = 6,118$; $p < 0,05$], sendo que os grupos imipramina e metirapona congelaram significativamente menos que o grupo controle. Também foi verificado a interação entre os fatores [$F(2, 62) = 11,34$]. Durante o teste (Fig. 8B), não foram reveladas diferenças significativas entre os grupos [*tratamento* $F(2, 54) = 0,1453$; $p > 0,05$]. Todos os grupos passaram pelo processo de extinção da memória aversiva (Fig. 8C), [*tempo* $F(3, 102) = 33,48$; $p < 0,05$]. Tanto a imipramina quanto a metirapona facilitaram a extinção [*tratamento* $F(2, 34) = 4,792$; $p < 0,05$]. Por outro lado, não foram encontradas interações entre os fatores.

Figura 8 – Condicionamento durante o proestro

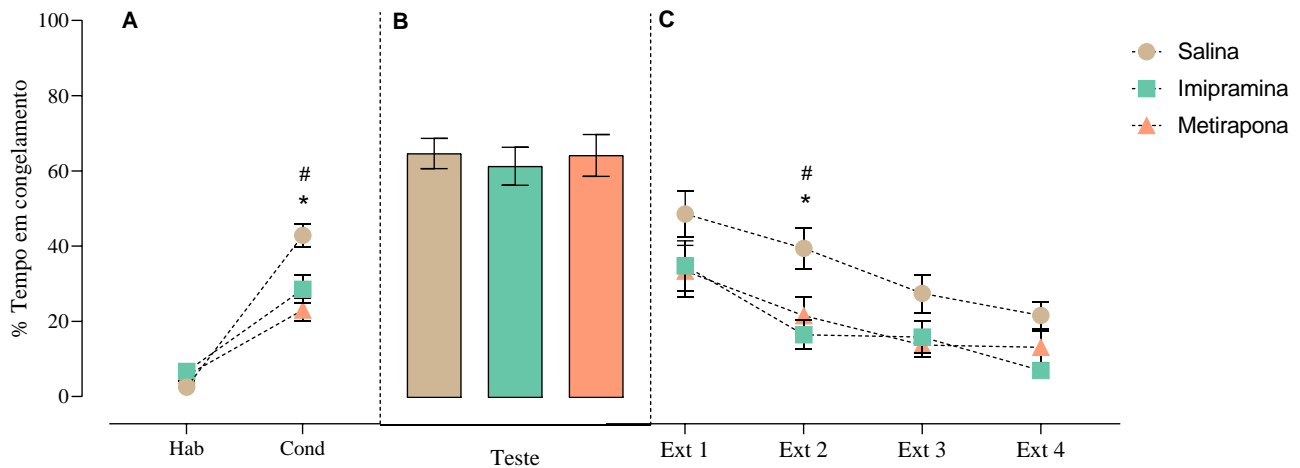


Figura 8 - Durante o condicionamento os tratamentos com imipramina e metirapona reduzem os níveis de congelamento em comparação ao grupo controle (A). Durante o teste (B), não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Durante a extinção (C), ambos os tratamentos facilitaram a extinção da memória aversiva. As barras e os símbolos representam a média (\pm EPM) da porcentagem do tempo em congelamento. Hab = habituação, Cond = condicionamento. Os dados representados no painel A e C foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, enquanto no painel B foi utilizado a ANOVA de um fator. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Painel A, $n = 19-23$ por grupo; painel B, $n = 20$ por grupo; painel C, $n = 11-14$ por grupo. *diferença significativa no grupo imipramina em relação ao grupo controle. #diferença significativa no grupo metirapona em relação ao grupo controle. Fonte: autor.

Quando o condicionamento ocorreu durante o metaestro (Fig. 9), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos significativos ao comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 66) = 360,7$; $p < 0,05$]. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos durante a sessão de condicionamento (Fig. 9A), [*tratamento* $F(2, 66) = 0,5574$; $p > 0,05$]. Não foram reveladas interações entre os fatores. Por outro lado, durante o teste (Fig. 9B), o grupo metirapona congelou significativamente mais que o grupo controle [*tratamento* $F(2, 78) = 8$; $p < 0,05$]. Durante as sessões de extinção (Fig. 9C), todos os grupos passaram pelo processo de extinção da memória aversiva [*tempo* $F(3, 101) = 38,06$; $p < 0,05$]. Nesse caso, não houve facilitação do processo de extinção pelos tratamentos [*tratamento* $F(2, 36) = 1,179$; $p > 0,05$]. Da mesma forma, não houve interação entre os fatores [$F(6, 101) = 1,010$; $p > 0,05$].

Figura 9 – Condicionamento durante o metaestro

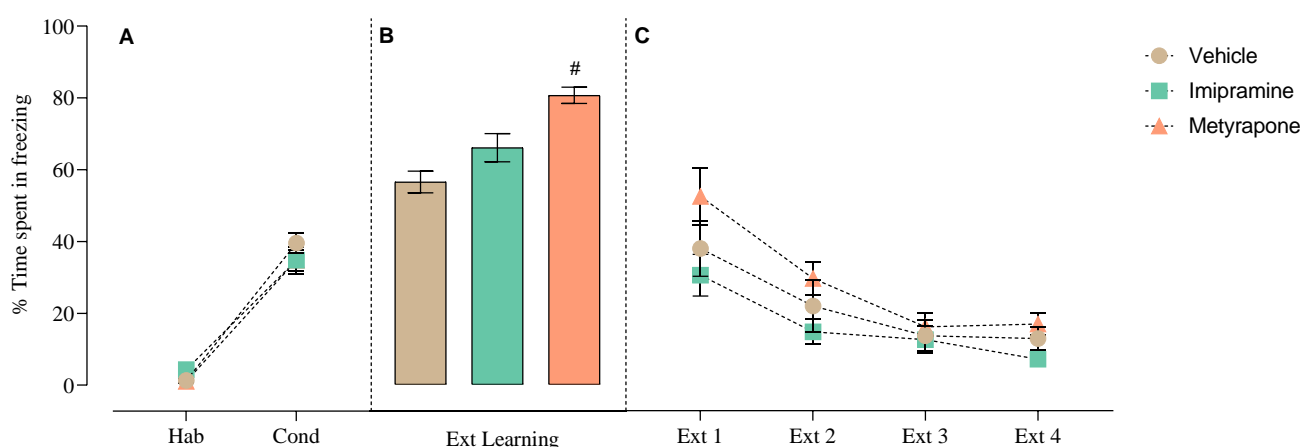


Figura 9 - Durante o condicionamento não houve efeitos significativos dos tratamentos (A). Durante o teste (B), o grupo metirapona congelou significativamente mais em relação ao grupo controle. Durante a extinção (C), não foram revelados efeitos significativos dos tratamentos. As barras e os símbolos representam a média (\pm EPM) da porcentagem do tempo em congelamento. Durante a extinção (C), ambos os tratamentos facilitaram a extinção da memória aversiva. Hab = habituação, Cond = condicionamento. Os dados representados no painel A e C foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, enquanto no painel B foi utilizado a ANOVA de um fator. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Painel A, $n = 22-24$ por grupo; painel B, $n = 25-29$ por grupo; painel C, $n = 13-14$ por grupo. #diferença significativa no grupo metirapona em relação ao grupo controle. Fonte: autor.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados revelaram que as fases do ciclo influenciaram o comportamento de congelamento das ratas durante o condicionamento, em resposta ao choque nas patas. Desta forma, ratas em proestro congelaram significativamente menos quando comparadas com aquelas em estro ou metaestro durante a sessão de condicionamento. Além disso, ratas condicionadas durante o proestro, previamente tratadas com imipramina ou metirapona, exibiram níveis de congelamento menores em relação ao grupo controle. Apesar de não observarmos diferenças durante o teste, ambos os tratamentos facilitaram a extinção da memória aversiva. Por outro lado, quando as ratas foram condicionadas durante o metaestro, não observamos diferenças significativas entre os tratamentos durante o condicionamento ou a extinção da memória aversiva. Entretanto, 24 h após o condicionamento, o grupo metirapona apresentou níveis de congelamento significativamente maiores quando comparado ao grupo controle.

Quando submetemos as ratas em diferentes fases do ciclo ao nosso protocolo de condicionamento de medo (Estudo 1; Fig. 5), nossos dados corroboram parte dos resultados encontrados na literatura em relação às fêmeas ciclando naturalmente (CUSHMAN et al., 2014; GRUENE et al., 2015a; MILAD et al., 2009; VANTREASE et al., 2022). Nesse sentido, autores que utilizaram diferentes modelos de ansiedade e depressão também revelaram diferenças dependentes da fase do ciclo estral, o que poderia indicar uma participação relevante de hormônios gonadais em circuitarias neurais subjacentes aos transtornos psiquiátricos (BLUME et al., 2019; DAY; STEVENSON, 2020; KUNDAKOVIC; ROCKS, 2022). Nossos dados revelaram que durante o condicionamento houve uma diminuição da expressão comportamental de medo de ratas em proestro, o que corresponde a fase do ciclo com níveis de E2 plasmático mais altos (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). Todavia, outros trabalhos não revelaram influência das fases do ciclo nas respostas aos protocolos de medo condicionado (CARVALHO et al., 2021; FRANZEN et al., 2023). Tais divergências nos resultados podem estar relacionadas a variações de linhagens dos animais utilizados nos diferentes estudos (PRYCE; LEHMANN; FELDON, 1999), ou ainda diferenças nos protocolos (EMTYAZI et al., 2022), sendo que foi demonstrado que até mesmo a duração da sessão de habituação pode influenciar o comportamento durante o teste (TROTT; KRASNE; FANSELOW, 2022).

No Estudo 2 (Fig. 6), observamos que o efeito dos tratamentos antes do condicionamento foi dependente da fase do ciclo estral, visto que foram encontrados resultados diferentes quando o condicionamento ocorreu nas fases de proestro ou metaestro.

Quando as fêmeas foram condicionadas durante o proestro, observamos efeitos de ambos os tratamentos atenuando a expressão do congelamento durante a sessão de

condicionamento e a facilitação da extinção, mas não durante o teste. A ausência de efeitos durante o teste pode parecer controversa, entretanto, resultados similares podem ser encontrados na literatura. Ao realizarem reposição de E2 em ratas ovariectomizadas antes do condicionamento, Chang et al. (2009) não observaram diferenças durante o teste, mas a reposição foi capaz de facilitar a extinção. Ao compararem duas fases do ciclo, Milad et al. (2009) também observaram diferenças comportamentais durante o condicionamento e a extinção, mas nenhuma diferença foi encontrada durante o teste.

O tratamento com imipramina antes do condicionamento atenuou o congelamento na sessão de condicionamento e facilitou a extinção da memória aversiva de medo. Em machos, o tratamento com antidepressivos antes do condicionamento, no protocolo de medo condicionado são inconsistentes. Alguns estudos encontraram uma redução do comportamento de congelamento após 24 h (HASHIMOTO et al., 2009; HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1996). Por outro lado, também foi relatado um aumento desse comportamento (MONTEZINHO et al., 2010). Já quando o tratamento ocorre entre a sessão de condicionamento e o teste, os resultados encontrados demonstram a redução da resposta comportamental de medo (HASHIMOTO et al., 2009; MONTEZINHO et al., 2010; MURAKI; INOUE; KOYAMA, 2008; SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006).

Os antidepressivos são amplamente utilizados na clínica para o tratamento de transtornos psiquiátricos. Neste trabalho, utilizamos a imipramina, um antidepressivo tricíclico, sendo que o mecanismo de ação ocorre a partir da inibição dos transportadores de noradrenalina e 5-HT, reduzindo a recaptação desses neurotransmissores e, conseqüentemente, aumentando a disponibilidade nas fendas sinápticas (BARBACCIA, 1983). De maneira geral, os antidepressivos diminuem a expressão de comportamentos do tipo-ansiosos em modelos animais, pelo menos em machos (FUCHS; FLÜGGE, 2006). Foi verificado que o tratamento com imipramina em um modelo de estresse por abstinência ao etanol, reduz a expressão de SERT no hipocampo e atenua os efeitos do estresse no teste do nado forçado (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021). Da mesma forma, os antidepressivos também reduzem a expressão de medo no paradigma do medo condicionado, reforçando o papel da 5-HT nessa circuitaria neural (BAUER, 2015). Além disso, foi demonstrado que os choques nas patas aumentam a metilação do DNA no PFC e HIP, sendo que a imipramina pode atenuar esses efeitos (SALES; JOCA, 2018).

Os efeitos divergentes entre machos e fêmeas do tratamento com antidepressivo podem estar relacionados a diferenças na modulação do sistema serotoninérgico pelo E2. Foi demonstrado que a injeção sistêmica ou intra-amigdalár de E2 induz efeitos ansiolíticos no LCE

(FRYE; WALF, 2004). Esses efeitos parecem ser mediados por $ER\beta$, visto que a ativação desses receptores no NDR reverte comportamentos do tipo ansiosos em fêmeas (CAMPOS et al., 2019). Tais resultados podem ser parcialmente explicados pelo aumento na expressão da enzima triptofano-hidroxilase (DONNER; HANDA, 2009; SUZUKI et al., 2013), aumentando a disponibilidade global da serotonina. Além disso, o tratamento com imipramina em fêmeas reduziu comportamentos do tipo depressivo no teste do nado forçado e diminuiu a ativação do BLA e HIP, enquanto aumentou a ativação da CeA (NGUYEN et al., 2018).

Uma segunda abordagem deste estudo foi utilizar a inibição da síntese de CORT antes do condicionamento. Quando as ratas foram condicionadas durante o metaestro, a metirapona aumentou o congelamento durante o teste. Na circuitaria do medo, os efeitos da CORT no cérebro, são altamente dependentes do momento do tratamento (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2017). Após um evento estressor, as concentrações plasmáticas de GCs aumentam devido a ativação do eixo HPA. Esse aumento é importante para a aquisição e consolidação da memória, visto que o tratamento com um antagonista de receptor GR diminui a resposta de congelamento após 24 h no modelo de medo condicionado (DONLEY; SCHULKIN; ROSEN, 2005). Por outro lado, a administração de CORT imediatamente antes do teste de memória espacial, prejudica a evocação da memória (DE QUERVAIN; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1998). Já a extinção é um processo em que uma resposta condicionada é diminuída se o EI for reapresentado repetidamente sem a presença de um evento aversivo (QUIRK; MUELLER, 2008). Portanto, a extinção é um novo processo de aprendizagem, e a administração de CORT melhora a aquisição dessa nova memória, facilitando o processo de extinção (CAI et al., 2006). Dessa forma, a administração de metirapona prejudica o processo de extinção (BLUNDELL et al., 2011b).

No entanto, em fêmeas, a regulação da aquisição, consolidação, expressão e extinção do medo pelos GCs parece depender de um mecanismo diferente do que o que ocorre em machos, com um importante papel de hormônios gonadais. As concentrações basais de ACTH e corticosterona em ratas são mais elevadas que em machos (DAVIU et al., 2014). O E2 aumenta a sensibilidade da glândula adrenal para o ACTH e, portanto, as concentrações de corticosterona plasmáticas, em resposta ao estresse (FIGUEIREDO et al., 2007). Ao tratarem pacientes com diagnóstico de TEPT com metirapona, Inslicht et al. (2014) observaram um aumento nas concentrações plasmáticas de ACTH, P4 e ALO (INSLICHT et al., 2014). Já em outro estudo, com modelo animal, foi demonstrado que a injeção de agonista GR na amígdala de ratas ovariectomizadas diminuiu comportamentos exploratórios no labirinto em cruz elevado, enquanto a infusão de agonistas dos receptores $ER\beta$ e GR levaram ao aumento destes

comportamentos (WEISER; FORADORI; HANDA, 2010). Apesar de contraditórios, esses resultados podem indicar que há uma regulação cruzada entre estradiol e GCs, porém esses mecanismos ainda precisam de mais estudos para serem elucidados. Aqui, demonstramos que o tratamento prévio ao condicionamento de ratas tratadas em proestro não revelaram efeitos em comparação ao grupo controle; entretanto, o tratamento com metirapona anteriormente ao condicionamento de ratas em metaestro aumentou o nível de congelamento em comparação ao grupo controle. Sendo assim, a diminuição dos níveis endógenos de E2 poderia estar de alguma maneira interagindo com os níveis reduzidos de CORT devido ao tratamento com metirapona. Nesse sentido, Kashefi e Rashidy-Pour (2014) observaram que com o nível de E2 endógeno mais alto, uma única dose de CORT antes do teste aumentou o congelamento. Por outro lado com o nível de E2 mais baixo, a dose de CORT diminuiu o congelamento (KASHEFI; RASHIDY-POUR).

Além dos sistemas de neurotransmissão e de sinalização por GCs, as diferenças sexuais nas estruturas encefálicas e na própria circuitaria do medo condicionado devem ser consideradas. Um estudo recente demonstrou que o padrão de atividade do BLA é alterado de maneira ciclo dependente e que o estresse pode prejudicar esse padrão (BLUME et al., 2019). Nesse sentido, também foi verificado que em fêmeas, o BLA é mais ativado que em machos em resposta ao choque nas patas (COLON; POULOS, 2020). Já o BNST, parece não participar das respostas de medo condicionado ao contexto em fêmeas assim como ocorre em machos (URIEN; BAUER, 2022). Entender o papel de cada estrutura e da circuitaria como um todo em fêmeas é fundamental para entender os mecanismos subjacentes a maior vulnerabilidade de mulheres aos transtornos psiquiátricos e TEPT.

Dados recentes do nosso laboratório revelaram que em machos adultos, o tratamento com imipramina antes do condicionamento, no mesmo protocolo de medo condicionado ao contexto, reduziu os níveis de congelamento e a ativação cortical apenas durante o teste (CAMPOS-CARDOSO, 2022). Esses efeitos divergem do que observamos ao utilizar fêmeas, sendo que a diminuição do congelamento durante o teste não ocorreu nas fases de proestro ou metaestro, mas houve a diminuição do congelamento durante o condicionamento e a facilitação da extinção da memória aversiva durante o proestro. Já a metirapona atenuou as respostas de medo durante as sessões de condicionamento e teste, e ainda, facilitou a extinção. Além disso, o tratamento com metirapona reduziu a ativação neuronal no BLA. Aqui, quando as ratas foram condicionadas durante o proestro, o tratamento com metirapona reduziu o congelamento durante o condicionamento e facilitou a extinção. Por outro lado, quando o condicionamento ocorreu durante o metaestro, a metirapona aumentou o congelamento durante o teste. Sendo

assim, é importante ressaltar que em conjunto, esses resultados evidenciam a influência dos hormônios gonadais na circuitaria envolvida no medo e transtornos psiquiátricos, demonstrando a importância de novos estudos visando a investigação desses mecanismos.

Apesar dos resultados inconsistentes em relação à influência das fases do ciclo no protocolo de medo condicionado, a participação do E2 nessas respostas parece clara. O E2 exerce suas ações a partir da ligação com seus receptores (ER), sendo os mais conhecidos ER α e ER β . A expressão e localização dos ER sofrem influência direta das fases do ciclo estral (MENDOZA-GARCÉS et al., 2011; ROMEO et al., 2005). Estudos que utilizaram agonistas de receptores do tipo ER β demonstraram a diminuição da expressão do medo, enquanto agonistas de ER α não apresentaram efeitos, sugerindo que a participação do E2 no medo condicionado ocorra através do ER β (CHANG et al., 2009; ZEIDAN et al., 2011).

Já a participação de P4 tem sido muito menos investigada em relação ao E2 nos protocolos de medo condicionado. Chang et al. (2009) não observaram efeitos da reposição de P4 em comparação ao veículo, enquanto Fox et al. (2023) revelaram uma maior aquisição de medo. No SNC a P4 é ativamente convertida em alopregnanolona (ALO; COMPAGNONE; MELLON, 2000), que interage com o receptor GABA-A (BELELLI; LAMBERT, 2005). O GABA é um neurotransmissor inibitório, que ativa os receptores ionotrópicos GABA-A e os metabotrópicos GABA-B. O receptor GABA-A é composto por duas subunidades α , duas β e uma γ ou δ (JACOB, 2019). A ALO pode promover a fosforilação (ADAMS; THOMAS; SMART, 2015) e, ainda, alterar a composição dessas subunidades (GRAVIELLE, 2018). Nesse sentido, foi verificado que a diminuição drástica nos níveis de P4 durante o diestro está associada a uma super expressão de receptores GABA-A com a subunidade δ na PAG (GRIFFITHS; LOVICK, 2005; LOVICK, 2006). A diminuição nos níveis de P4 parecem estar relacionadas ao aumento de comportamentos do tipo ansiosos e dos níveis de CORT no LCE (ISLAS-PRECIADO et al., 2022). Além disso, os receptores GABA-A estão envolvidos no aprendizado espacial da memória contextual (ZHU et al., 2023). Da mesma forma, a literatura vem apontando para a participação da ALO em transtornos psiquiátricos, sendo encontrada em níveis reduzidos em situações de estresse crônico e ansiedade (BALI; JAGGI, 2014; SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014). Sendo assim, é possível que assim como o E2, a P4 também esteja influenciando as respostas de medo condicionado ao contexto ao longo do ciclo estral.

Assim, devido à literatura escassa e a falta de financiamento em pesquisas que envolvem fêmeas (MIRIN, 2021) os mecanismos neurobiológicos que contribuem para uma maior vulnerabilidade de mulheres a desenvolverem TEPT e transtornos de ansiedade permanecem

desconhecidos. Portanto, medidas como as determinadas pelo *National Institute of Health* (NIH), que desde 2014 consideram o sexo como uma variável biológica em estudos clínicos e pré-clínicos, são de extrema importância para a elucidação desses mecanismos e para o desenvolvimento de terapias efetivas (CLAYTON; COLLINS, 2014).

Muitos autores argumentam que fêmeas geram alta variabilidade nos dados, devido ao ciclo estral, o que poderia reduzir o poder de testes estatísticos, justificando a prevalência de machos em pesquisas de diversas áreas de pesquisa (MAMLOUK et al., 2020). Nos últimos anos, esforços vêm sendo empregados a fim de desmistificar tais premissas (BEERY, 2018; PRENDERGAST; ONISHI; ZUCKER, 2014), mas também é preciso uma mudança cultural da ciência como um todo (SHANSKY; MURPHY, 2021).

É importante ressaltar que a medida comportamental utilizada nesse trabalho foi o tempo gasto em congelamento, contudo, estudos recentes têm descrito uma possível estratégia comportamental distinta em fêmeas, o *darting* (COLOM-LAPETINA et al., 2019; GREINER et al., 2019; GRUENE et al., 2015b). O *darting* é caracterizado como um movimento rápido na caixa de condicionamento, que aparece durante os últimos tons do medo condicionado com pistas em 40% das fêmeas (MITCHELL et al., 2022). Até o momento, nenhum estudo que utilizou o modelo de medo condicionado ao contexto demonstrou esse comportamento e, apesar de não termos analisado sistematicamente, não foi possível perceber a presença de *darting*. A importância desse comportamento para as diferenças sexuais e o mecanismo através do qual é organizado ainda não foram esclarecidos, sendo necessário estudos com maior enfoque nesse comportamento.

Além disso, o presente trabalho não considerou a possibilidade de dependência de estado, sendo que as ratas foram condicionadas em uma fase específica e testada em outras. O contexto do condicionamento é formado por pistas externas, como iluminação e odores, mas também por pistas internas, como o estado fisiológico (BLAIR et al., 2022). A injeção de ALO diretamente no BNST de machos foi capaz de induzir a dependência de estado (ACCA et al., 2017). Sendo assim, uma possibilidade seria a dependência de estado de acordo com as diferentes fases do ciclo. Blair et al. (2022), observaram dependência de estado quando o condicionamento ocorreu na fase de diestro, mas não em proestro. Entretanto, esses efeitos não foram observados em ratas ovariectomizadas com reposição de P4 (BLAIR et al., 2022). No contexto do medo condicionado a dependência de estado passou a ser considerada apenas muito recentemente, sendo necessários mais estudos para esclarecer esses eventos.

Nossos resultados demonstraram que as fases do ciclo estral de ratas influenciam as respostas de medo condicionado ao contexto. Os tratamentos com imipramina e metirapona

induzem efeitos distintos a depender da fase do ciclo. Considerando as flutuações endócrinas ao longo do ciclo estral, provavelmente essas diferenças devem-se a interação entre o E2 e os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e de sinalização por GCs. Os mecanismos envolvidos nessa interação ainda precisam de novos estudos. Uma primeira abordagem poderia ser a avaliação de possíveis alterações na expressão de receptores de 5-HT, GCs e E2. Além disso, a verificação das concentrações plasmáticas de CORT e E2 poderiam revelar como a interação entre esses sistemas influenciam os comportamentos.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que as fases do ciclo influenciam as respostas ao modelo de medo condicionado ao contexto em fêmeas ciclando naturalmente, no protocolo proposto. Ratas condicionadas durante o proestro congelam significativamente menos que aquelas em metaestro ou estro durante o condicionamento. A imipramina e a metirapona induzem respostas comportamentais diferentes quando as ratas são condicionadas durante o proestro ou metaestro. Durante o proestro, ambos os tratamentos diminuem o comportamento de congelamento durante o condicionamento e facilitam a extinção da memória aversiva. Durante o metaestro, a metirapona aumenta a expressão de medo durante o teste. De maneira geral, observamos influência das fases do ciclo nas respostas ao modelo de medo condicionado ao contexto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCA, G. M. et al. Allopregnanolone induces state-dependent fear via the bed nucleus of the stria terminalis. **Hormones and Behavior**, v. 89, p. 137–144, mar. 2017.
- ADAMS, J. M.; THOMAS, P.; SMART, T. G. Modulation of neurosteroid potentiation by protein kinases at synaptic- and extrasynaptic-type GABAA receptors. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 63–73, jan. 2015.
- ADOLPHS, R. The biology of fear. **Current Biology**, v. 23, n. 2, p. R79–R93, 2013.
- ALMADA, R. C. et al. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus–dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 2, p. 279–287, nov. 2009.
- ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: Intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988–997, 2015.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. **Hippocampus**, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.
- ARNSTEN, A. F. T. et al. The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 89–99, jan. 2015.
- BABB, J. A. et al. Sex differences in activated corticotropin-releasing factor neurons within stress-related neurocircuitry and hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis hormones following restraint in rats. **Neuroscience**, v. 234, p. 40–52, mar. 2013.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Multifunctional aspects of allopregnanolone in stress and related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 64–78, jan. 2014.
- BARBACCIA, M. On the mode of action of imipramine: Relationship between serotonergic axon terminal function and down-regulation of β -adrenergic receptors. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 3, p. 373–383, mar. 1983.
- BARRETT, D.; GONZALEZ-LIMA, F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. **Neuroscience Letters**, v. 371, n. 2–3, p. 91–96, 2004.
- BAUER, E. P. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 68–77, 2015.
- BECKER, J. et al. Neuroendocrinology of sexual behavior in the female. Em: **Behavioral endocrinology**. 2. ed. [s.l.] Cambridge, MA: MIT Press/Bradford Books, 2002. p. 117–151.
- BECKER, J. B. et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1650–1673, 2005.

- BEERY, A. K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 23, p. 143–149, out. 2018.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, jan. 2011.
- BELELLI, D.; LAMBERT, J. J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 565–575, 15 jul. 2005.
- BETHEA, C. L. et al. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 41–100, 2002.
- BIRZNIECE, V. et al. Serotonin 5-HT1A receptor mRNA expression in dorsal hippocampus and raphe nuclei after gonadal hormone manipulation in female rats. **Neuroendocrinology**, v. 74, n. 2, p. 135–142, 2001.
- BITTERMAN, M. E. Classical Conditioning since Pavlov. **Review of General Psychology**, v. 10, n. 4, p. 365–376, 1 dez. 2006.
- BLAIR, R. S. et al. Estrous cycle contributes to state-dependent contextual fear in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 141, p. 105776, jul. 2022.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, v. 2, n. 4, p. 351–362, nov. 1971.
- BLUME, S. R. et al. Disruptive effects of repeated stress on basolateral amygdala neurons and fear behavior across the estrous cycle in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.
- BLUNDELL, J. et al. Neurobiology of Learning and Memory Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n. 4, p. 453–460, 2011a.
- BLUNDELL, J. et al. Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n. 4, p. 453–460, maio 2011b.
- BORELLI, K. G. et al. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, v. 387, n. 2, p. 105–110, 2005.
- BRESLAU, N. The Epidemiology of Trauma, PTSD, and Other Posttrauma Disorders. **Trauma, Violence, & Abuse**, v. 10, n. 3, p. 198–210, 30 jul. 2009.
- BROEKMAN, B. F. P.; OLFF, M.; BOER, F. The genetic background to PTSD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 348–362, jan. 2007.
- BURGHARDT, N. S. et al. Chronic antidepressant treatment impairs the acquisition of fear extinction. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 11, p. 1078–1086, 2013.
- BURGHARDT, N. S.; BAUER, E. P. Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: Implications for underlying fear circuits. **Neuroscience**, v. 247, p. 253–272, 2013.

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–1708, jun. 1974.

BYERS, S. L. et al. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35538, 13 abr. 2012.

CAI, W.-H. et al. Postreactivation Glucocorticoids Impair Recall of Established Fear Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 37, p. 9560–9566, 13 set. 2006.

CAMPOS, G. V. et al. Estrogen receptor β activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 357–358, p. 57–64, jan. 2019.

CAMPOS-CARDOSO, R. et al. Imipramine attenuates anxiety- and depressive-like effects of acute and prolonged ethanol-abstinence in male rats by modulating SERT and GR expression in the dorsal hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 408, n. November 2020, p. 113295, jun. 2021.

CAMPOS-CARDOSO, R. et al. The resilience of adolescent male rats to acute stress-induced delayed anxiety is age-related and glucocorticoid release-dependent. **Neuropharmacology**, v. 226, p. 109385, mar. 2023.

CARDOSO, R. C. **Efeitos da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 22 jul. 2022.

CAREY, M. P. et al. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. **Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 311–321, fev. 1995.

CARVALHO, M. C. et al. Influence of estrous cycle stage on acquisition and expression of fear conditioning in female rats. **Physiology and Behavior**, v. 234, n. February, p. 113372, 2021.

CHAAAYA, N.; BATTLE, A. R.; JOHNSON, L. R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 92, n. March, p. 43–54, 2018.

CHALMERS, D. T.; WATSON, S. J. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain - a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. **Brain Research**, v. 561, n. 1, p. 51–60, 1991.

CHANG, Y. J. et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear extinction in rats through estrogen receptor β . **Hippocampus**, v. 19, n. 11, p. 1142–1150, 2009.

CHARI, T. et al. The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 30 jun. 2020.

CHROUSOS, G. P. The Concepts of Stress and Stress System Disorders. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244, 4 mar. 1992.

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282–283, 14 maio 2014.

- COHEN, H. et al. Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 715–724, fev. 2012.
- COLOM-LAPETINA, J. et al. Behavioral Diversity Across Classic Rodent Models Is Sex-Dependent. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, 6 mar. 2019.
- COLON, L. M.; POULOS, A. M. Contextual processing elicits sex differences in dorsal hippocampus activation following footshock and context fear retrieval. **Behavioural Brain Research**, v. 393, p. 112771, set. 2020.
- COMPAGNONE, N. A.; MELLON, S. H. Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 21, n. 1, p. 1–56, jan. 2000.
- CONRAD, C. D.; MAULDIN-JOURDAIN, M. L.; HOBBS, R. J. Metyrapone Reveals That Previous Chronic Stress Differentially Impairs Hippocampal-dependent Memory. **Stress**, v. 4, n. 4, p. 305–318, 7 jan. 2001.
- COSSIO, R. et al. Sex differences and estrous cycle effects on foreground contextual fear conditioning. **Physiology and Behavior**, v. 163, p. 305–311, 2016.
- CUSHMAN, J. D. et al. The Role of the δ GABA(A) Receptor in Ovarian Cycle-Linked Changes in Hippocampus-Dependent Learning and Memory. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 6, p. 1140–1146, 26 jun. 2014.
- DAVIU, N. et al. Sex differences in the behavioural and hypothalamic–pituitary–adrenal response to contextual fear conditioning in rats. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 5, p. 713–723, nov. 2014.
- DAY, H. L. L.; STEVENSON, C. W. The neurobiological basis of sex differences in learned fear and its inhibition. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 2466–2486, 2020.
- DE QUERVAIN, D. J.-F.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. **Nature**, v. 394, n. 6695, p. 787–790, ago. 1998.
- DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 7–19, 24 jan. 2017a.
- DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 7–19, 24 jan. 2017b.
- DE SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 8, p. 789–819, 1995.
- DIGANGI, J. A. et al. Pretrauma risk factors for posttraumatic stress disorder: A systematic review of the literature. **Clinical Psychology Review**, v. 33, n. 6, p. 728–744, ago. 2013.
- DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1–2, p. 192–246, 2001.

DONLEY, M. P.; SCHULKIN, J.; ROSEN, J. B. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 197–205, 2005.

DONNER, N.; HANDA, R. J. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 705–718, out. 2009.

D'SOUZA, D.; SADANANDA, M. Estrous Cycle Phase-Dependent Changes in Anxiety- and Depression-Like Profiles in the Late Adolescent Wistar-Kyoto Rat. **Annals of Neurosciences**, v. 24, n. 3, p. 136–145, 2017.

EMTYAZI, D. et al. Sex differences in long-term fear and anxiety-like responses in a preclinical model of PTSD. **Journal of Psychiatric Research**, v. 151, p. 619–625, jul. 2022.

FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **The Pavlovian Journal of Biological Science : Official Journal of the Pavlovian**, v. 15, n. 4, p. 177–182, 1980.

FANTINO, M.; BRINNEL, H. Body weight set-point changes during the ovarian cycle: Experimental study of rats using hoarding behavior. **Physiology & Behavior**, v. 36, n. 6, p. 991–996, jan. 1986.

FIGUEIREDO, H. F. et al. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 4, 2007.

FLANDREAU, E. I.; TOTH, M. Animal Models of PTSD: A Critical Review. Em: [s.l: s.n.]. p. 47–68.

FRANZEN, J. M. et al. Cannabidiol attenuates fear memory expression in female rats via hippocampal 5-HT_{1A} but not CB₁ or CB₂ receptors. **Neuropharmacology**, v. 223, p. 109316, fev. 2023.

FRYE, C. A.; WALF, A. A. Estrogen and/or Progesterone Administered Systemically or to the Amygdala Can Have Anxiety-, Fear-, and Pain-Reducing Effects in Ovariectomized Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 306–313, 2004.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 323–333, 30 set. 2006.

GARTSIDE, S. E. et al. Effects of (-)-tertatolol, (-)-penbutolol and (±)-pindolol in combination with paroxetine on presynaptic 5-HT function: An in vivo microdialysis and electrophysiological study. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 1, p. 145–152, 1999.

GEORGE J. KRINKE. **George J. Krinke-The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals)-Academic Press (2000).pdf**. , 2000.

GONG, S. et al. Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117503, 20 fev. 2015.

GRAVIELLE, M. C. Regulation of GABA_A receptors by prolonged exposure to endogenous and exogenous ligands. **Neurochemistry International**, v. 118, p. 96–104, set. 2018.

GREINER, E. M. et al. Sex differences in fear regulation and reward-seeking behaviors in a fear-safety-reward discrimination task. **Behavioural Brain Research**, v. 368, p. 111903, ago. 2019.

GRESACK, J. E. et al. Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 451–467, mar. 2009.

GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express $\alpha 4$, $\beta 1$ and δ GABAA receptor subunits: Plasticity of expression during the estrous cycle. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 457–466, jan. 2005.

GRUENE, T. M. et al. **Archival Report Sex-Specific Neuroanatomical Correlates of Fear Expression in Prefrontal-Amygdala Circuits**. **Biological Psychiatry** Elsevier, , 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.014>>

GRUENE, T. M. et al. Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. **eLife**, v. 4, 14 nov. 2015b.

GUENNOUN, R. et al. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 48–61, fev. 2015.

GUNDLAH, C.; LU, N. Z.; BETHEA, C. L. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 3, p. 271–282, 2002.

HANDA, R. J. et al. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. **Hormones and Behavior**, v. 28, n. 4, p. 464–476, dez. 1994.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 197–220, abr. 2014.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of acute citalopram on the expression of conditioned freezing in naive versus chronic citalopram-treated rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 113–117, fev. 2009.

HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; KOYAMA, T. Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 123, n. 2, p. 182–186, 1996.

HESS, U.; THIBAUT, P. Darwin and Emotion Expression. **American Psychologist**, v. 64, n. 2, p. 120–128, 2009.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 79–87, 2005.

INOUE, T.; KITAICHI, Y.; KOYAMA, T. SSRIs and conditioned fear. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 8, p. 1810–1819, 2011.

- INSLICHT, S. S. et al. Sex differences in neurosteroid and hormonal responses to metyrapone in posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 17, p. 3581–3595, 21 set. 2014.
- ISGOR, C. et al. Estrogen receptor β in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 837–845, 2003.
- ISLAS-PRECIADO, D. et al. Anxiety-like Behavior and GABAAR/BDZ Binding Site Response to Progesterone Withdrawal in a Stress-Vulnerable Strain, the Wistar Kyoto Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7259, 30 jun. 2022.
- IWASAKI-SEKINO, A. et al. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p. 226–237, fev. 2009.
- JACOB, T. C. Neurobiology and Therapeutic Potential of $\alpha 5$ -GABA Type A Receptors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 24 jul. 2019.
- KASHEFI, A.; RASHIDY-POUR, A. Effects of corticosterone on contextual fear consolidation in intact and ovariectomized female rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 236–241, out. 2014.
- KELLER, S. M. et al. Inhibiting corticosterone synthesis during fear memory formation exacerbates cued fear extinction memory deficits within the single prolonged stress model. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 182–186, 2015.
- KESSLER, R. C. Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 12, p. 1048, 1 dez. 1995.
- KNIGHT, P. et al. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 204, p. 173168, maio 2021.
- KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2, p. 117–142, mar. 2001.
- KUIPER, G. G. J. M. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and α and β . **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863–870, 1997.
- KUNDAKOVIC, M.; ROCKS, D. Sex hormone fluctuation and increased female risk for depression and anxiety disorders: From clinical evidence to molecular mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 66, p. 101010, jul. 2022.
- LEBRON-MILAD, K.; MILAD, M. R. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2012.
- LEDOUX, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653–676, 2012.
- LEDOUX, J. E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2517–2529, 1988.

- LIU, J. et al. Intrahypothalamic estradiol modulates hypothalamus-pituitary-adrenal-axis activity in female rats. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 3337–3344, 2012.
- LOVICK, T. A. Plasticity of GABA_A receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 4, p. 655–660, 1 jul. 2006.
- LOVICK, T. A.; ZANGROSSI, H. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 31 ago. 2021.
- LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosteroids on cognition: Integration of animal and human model studies. **Brain Research Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–27, 1997.
- MACEDO, C. E. et al. 5-HT₂- and D₁-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. **Behavioural Brain Research**, v. 177, n. 1, p. 100–108, fev. 2007.
- MAMLOUK, G. M. et al. Sex bias and omission in neuroscience research is influenced by research model and journal, but not reported NIH funding. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 57, p. 100835, abr. 2020.
- MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 435–440, nov. 2001.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 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, 1994.
- MARKUS, E. J.; ZECEVIC, M. Sex differences and estrous cycle changes in hippocampus-dependent fear conditioning. **Psychobiology**, v. 25, n. 3, p. 246–252, 1997.
- MARTÍNEZ-MOTA, L. et al. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 900–905, out. 2011.
- MCEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. supplement_2, p. 17180–17185, 16 out. 2012.
- MEIR DREXLER, S.; WOLF, O. T. The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, p. 126–134, jul. 2017.
- MENDOZA-GARCÉS, L. et al. Differential Expression of Estrogen Receptors in Two Hippocampal Regions During the Estrous Cycle of the Rat. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 294, n. 11, p. 1913–1919, nov. 2011.
- MILAD, M. R. et al. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 887–895, 2009.

- MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 167–202, mar. 2001.
- MIRIN, A. A. Gender Disparity in the Funding of Diseases by the U.S. National Institutes of Health. **Journal of Women's Health**, v. 30, n. 7, p. 956–963, 1 jul. 2021.
- MITCHELL, J. R. et al. Darting across space and time: parametric modulators of sex-biased conditioned fear responses. **Learning & Memory**, v. 29, n. 7, p. 171–180, 16 jul. 2022.
- MONTEZINHO, L. P. et al. The effects of acute treatment with escitalopram on the different stages of contextual fear conditioning are reversed by atomoxetine. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 2, p. 131–143, 2010.
- MURAKI, I.; INOUE, T.; KOYAMA, T. Effect of co-administration of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100,635 and selective 5-HT_{1B/1D} receptor antagonist GR 127,935 on anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1–3, p. 171–178, maio 2008.
- NELSON, R. J.; KRIEGSFELD, L. J. **An Introduction to Behavioral Endocrinology 5th edition**. [s.l.: s.n.].
- NGUYEN, E. T. et al. Differential effects of imipramine and CORT118335 (Glucocorticoid receptor modulator/mineralocorticoid receptor antagonist) on brain-endocrine stress responses and depression-like behavior in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 99–110, jan. 2018.
- NIJSEN, M. J. M. A. et al. Conditioned fear-induced tachycardia in the rat; vagal involvement. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, n. 2–3, p. 211–222, 1998.
- PARKER, G. C. et al. Whole-body metabolism varies across the estrous cycle in Sprague–Dawley rats. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 3, p. 399–403, out. 2001.
- PECINS-THOMPSON, M.; A. BROWN, N.; BETHEA, C. L. Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. **Molecular Brain Research**, v. 53, n. 1–2, p. 120–129, jan. 1998.
- PRENDERGAST, B. J.; ONISHI, K. G.; ZUCKER, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 40, p. 1–5, mar. 2014.
- 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. 753–759, dez. 1999.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56–72, 19 jan. 2008.
- RESSTEL, L. B. M. et al. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 869–876, 2008.
- ROMANSKI, L. M. et al. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 444–450, 1993.

- ROMEO, R. D. et al. Sex Differences in Hippocampal Estradiol-Induced N-Methyl-D-Aspartic Acid Binding and Ultrastructural Localization of Estrogen Receptor-Alpha. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 6, p. 391–399, 2005.
- ROOZENDAAL, B. Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 3, p. 578–595, nov. 2002.
- ROSELLI, C. F. Brain aromatase: Roles in reproduction and neuroprotection. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 106, n. 1–5, p. 143–150, 2007.
- SAKAE, D. Y. et al. Relative luminosity in the plus maze upon the exploratory behaviour of female Wistar rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 7, p. 601–606, jul. 2015.
- SALES, A. J.; JOCA, S. R. L. Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 343, p. 8–15, maio 2018.
- 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. 121–128, 2006.
- SAZMA, M. A.; SHIELDS, G. S.; YONELINAS, A. P. The effects of post-encoding stress and glucocorticoids on episodic memory in humans and rodents. **Brain and Cognition**, v. 133, p. 12–23, jul. 2019.
- SCHÜLE, C.; NOTHDURFTER, C.; RUPPRECHT, R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. **Progress in Neurobiology**, v. 113, p. 79–87, fev. 2014.
- SHANSKY, R. M.; MURPHY, A. Z. **Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture.** *Nature Neuroscience* Nature Research, , 1 abr. 2021.
- STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231–249, 30 set. 2002.
- STEIN, C.; DAVIDOWA, H.; ALBRECHT, D. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition and 5-HT₂ as well as 5-HT₃ receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. **Synapse**, v. 38, n. 3, p. 328–337, 1 dez. 2000.
- SUMNER, B. E. H.; FINK, G. Estrogen increases the density of 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 54, n. 1–2, p. 15–20, 1995.
- SUZUKI, H. et al. Involvement of estrogen receptor β in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 674–680, 5 jun. 2013.
- SYLVERS, P.; LILIENFELD, S. O.; LAPRAIRIE, J. L. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 1, p. 122–137, fev. 2011.
- TAFET, G. E.; NEMEROFF, C. B. Pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: The Role of the HPA Axis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, n. May, p. 1–11, 2020.

- TAXIER, L. R.; GROSS, K. S.; FRICK, K. M. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 535–550, 2 out. 2020.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 20 jun. 2015.
- TROTT, J. M.; KRASNE, F. B.; FANSELOW, M. S. Sex differences in contextual fear learning and generalization: a behavioral and computational analysis of hippocampal functioning. **Learning & Memory**, v. 29, n. 9, p. 283–296, 2 set. 2022.
- URIEN, L.; BAUER, E. P. Sex Differences in BNST and Amygdala Activation by Contextual, Cued, and Unpredictable Threats. **eneuro**, v. 9, n. 1, p. ENEURO.0233-21.2021, jan. 2022.
- VANTREASE, J. E. et al. Sex Differences in the Activity of Basolateral Amygdalar Neurons That Project to the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Their Role in Anticipatory Anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 22, p. 4488–4504, 1 jun. 2022.
- VERBITSKY, A.; DOPFEL, D.; ZHANG, N. **Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. Translational Psychiatry** Springer Nature, , 1 dez. 2020.
- VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1–20, 2006.
- VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2503–2511, nov. 1991.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. **Stress**, v. 10, n. 3, p. 251–260, 7 jan. 2007.
- WEISER, M. J.; FORADORI, C. D.; HANDA, R. J. Estrogen receptor beta activation prevents glucocorticoid receptor-dependent effects of the central nucleus of the amygdala on behavior and neuroendocrine function. **Brain Research**, v. 1336, p. 78–88, 2010.
- WOODRUFF, E. R. et al. Coordination between Prefrontal Cortex Clock Gene Expression and Corticosterone Contributes to Enhanced Conditioned Fear Extinction Recall. **eneuro**, v. 5, n. 6, p. ENEURO.0455-18.2018, nov. 2018.
- WOOLLEY, C.; MCEWEN, B. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat [published erratum appears in J Neurosci 1992 Oct;12(10):following table of contents]. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2549–2554, 1 jul. 1992.
- YAVAS, E.; GONZALEZ, S.; FANSELOW, M. S. Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory. **F1000Research**, v. 8, p. 1292, 31 jul. 2019.
- ZEIDAN, M. A. et al. Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 920–927, 2011.

ZHU, M. et al. Control of contextual memory through interneuronal $\alpha 5$ -GABAA receptors. **PNAS Nexus**, v. 2, n. 4, 3 abr. 2023.