

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA SOBRE O
CONGELAMENTO CONDICIONADO EM MACHOS E FÊMEAS EM DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL**

JOYCE NONATO CHIOSSI

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. AMANDA RIBEIRO DE OLIVEIRA

SÃO CARLOS – FEVEREIRO 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA SOBRE O
CONGELAMENTO CONDICIONADO EM MACHOS E FÊMEAS EM DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL**

JOYCE NONATO CHIOSSI

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. AMANDA RIBEIRO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Psicologia.

SÃO CARLOS – FEVEREIRO 2024

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Joyce Nonato Chiossi, realizada em 20/02/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Midea Cuccovia Vasconcelos Reis (UCLA)

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do fornecimento de Bolsa de Mestrado (processo no. 88887.696758/2022-00).

A pesquisa também contou com apoio financeiro da CAPES por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX; Código de Financiamento 001), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio de Auxílio à Pesquisa Projeto Inicial (processo no. 2022/02986-0).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da CAPES ou da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por todo incentivo.

A Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira, pela orientação, dedicação, incentivo e apoio, um agradecimento carinhoso pela excelente orientação.

A minha banca examinadora, Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza e ao pesquisador Fernando Midea Cuccovia V Reis que gentilmente aceitaram a participar e colaborar com este trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Psicologia de Aprendizagem, pelo acolhimento e aprendizado diário.

A Universidade e a todo seu corpo docente pelo meu crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro CAPES/PROEX.

CHIOSSI, J.N. (2024). *Efeitos do bloqueio da síntese de corticosterona sobre o congelamento condicionado em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos. 63 pp.

RESUMO

A metirapona, um inibidor da síntese de corticosteroides adrenais, tem sido associada a alterações da resposta condicionada de congelamento em ratos machos. No entanto, os efeitos da metirapona no condicionamento aversivo em fêmeas, cujo encéfalo opera em um contexto de variação cíclica de hormônios sexuais, permanecem pouco estudados. Paralelamente, estudos anteriores demonstraram um desempenho inferior na extinção do medo contextual em fêmeas, sugerindo uma possível relação entre diferenças sexuais e o medo condicionado. Assim, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a participação da corticosterona na expressão e extinção da resposta condicionada de congelamento em ratos machos e fêmeas, considerando diferentes fases do ciclo estral. Esperava-se que o bloqueio da síntese de corticosterona, por meio da administração de metirapona, reduzisse a expressão do congelamento condicionado em machos e fêmeas, sem afetar a atividade motora, com resultados mais robustos durante o proestro/estro. Para isso, avaliamos os efeitos da metirapona (30 e 60 mg/kg) no condicionamento aversivo contextual em ratos Wistar adultos (45 machos e 93 fêmeas; protocolo CEUA 9367190422). As fêmeas destinadas aos experimentos foram agrupadas, conforme a fase do ciclo estral no dia do teste, em proestro/estro e metaestro/diestro. Os animais foram submetidos a um protocolo de condicionamento aversivo contextual, envolvendo a apresentação de choques elétricos durante a sessão de treinamento. Após 24 horas, metirapona ou veículo foi administrado, seguido por uma sessão de teste para avaliar a resposta de congelamento. A retenção da extinção foi avaliada em uma sessão de reteste realizada 24 horas após o teste. A catalepsia e a atividade motora no campo aberto foram avaliadas nos animais 48 horas após o reteste. De maneira geral, o bloqueio da síntese de corticosterona com metirapona diminuiu a expressão do medo condicionado apenas em machos. Por outro lado, a metirapona prejudicou a extinção da resposta condicionada de congelamento contextual em machos e fêmeas. Adicionalmente, a metirapona não produziu comprometimento motor em machos, conforme avaliado pelos testes de catalepsia e campo aberto. Já nas fêmeas, a metirapona aumentou a exploração horizontal no campo aberto. Esses resultados sugerem a importância da corticosterona para o condicionamento aversivo contextual, com envolvimento na expressão do medo condicionado sendo sexo-dependente, ao passo que o papel na extinção parece ocorrer de forma independente do sexo e da fase do ciclo estral, mas com resultados mais robustos para machos e fêmeas em metaestr/diestro.

Palavras-chave: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, Metirapona, Condicionamento Aversivo Contextual, Proestro/Estro, Metaestro/Diestro.

CHIOSSI, J.N. (2024). *Effects of blocking corticosterone synthesis on conditioned freezing in males and females at different stages of the estrous cycle*. Master's Degree. Graduate Program in Psychology, Federal University of Sao Carlos. 63 pp.

ABSTRACT

Metyrapone, an inhibitor of adrenal corticosteroid synthesis, has been associated with alterations in the conditioned freezing response in male rats. However, the effects of metyrapone on aversive conditioning in females, whose brain operates in a context of cyclic variation of sexual hormones, remain underexplored. Simultaneously, previous studies have demonstrated poorer performance in contextual fear extinction in females, suggesting a potential relationship between sex differences and conditioned fear. Thus, the overall aim of this study was to assess the involvement of corticosterone in the expression and extinction of the conditioned freezing response in both male and female rats, considering different phases of the estrous cycle. It was anticipated that blocking corticosterone synthesis through metyrapone administration would reduce the expression of conditioned freezing in both males and females, without affecting motor activity, with more robust results during proestrus/estrus. To achieve this, we evaluated the effects of metyrapone (30 and 60 mg/kg) in contextual aversive conditioning in adult Wistar rats (45 males and 93 females; CEUA protocol 9367190422). The female rats designated for experiments were grouped based on the estrous cycle phase on the day of testing, into proestrus/estrus and metestrus/diestrus. Animals underwent a contextual aversive conditioning protocol, involving the presentation of electric footshocks during the training session. After 24 hours, metyrapone or vehicle was administered, followed by a test session to assess the freezing response. Retention of extinction was evaluated in a retest session conducted 24 hours after the test. Catalepsy and motor activity in the open field were assessed in animals 48 hours after retesting. Overall, blocking corticosterone synthesis with metyrapone impaired the extinction of conditioned contextual freezing response in both males and females. On the other hand, metyrapone reduced the expression of conditioned fear only in males. Additionally, metyrapone did not produce motor impairment in males, as assessed by catalepsy and open field tests. In females, however, metyrapone increased horizontal exploration in the open field. These results suggest the importance of corticosterone in contextual aversive conditioning, with sex-dependent involvement in conditioned fear expression, while its role in extinction appears to be independent of sex and estrous cycle phase, but more robust for males and metaestrus/diestrus females.

Keywords: Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Metyrapone, Contextual Fear Conditioning, Proestrus/Estrus, Metestrus/Diestrus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas. A seta amarela indica uma célula nucleada. A seta vermelha indica uma célula cornificada. A seta verde indica um leucócito.

Figura 2. Fotografia da caixa experimental utilizada nas fases de treino, teste e reteste de todos os grupos.

Figura 3. Fotografia da caixa experimental utilizada para o teste de catalepsia.

Figura 4. Fotografia da arena que foi usada para o teste de campo aberto.

Figura 5. (A) Delineamento experimental para a avaliação do medo condicionado contextual. (B) Delineamento experimental para controle motor. Em todas as etapas do protocolo ocorreu a checagem do ciclo estral nas fêmeas.

Figura 6. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em machos. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste, dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (B) Tempo médio de congelamento durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). &, diferente do início do treino; @, diferente de B1; \$, diferente de B2; +, diferente de B3; *, diferente do grupo controle; #, diferente do mesmo grupo na sessão Teste. Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. n = 13-15 por grupo.

Figura 7. Efeitos sobre o controle motor em machos tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. Média \pm EPM. ANOVA de uma via. n = 13-17 por grupo.

Figura 8. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro/estro. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste. (B) Tempo médio de congelamento dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle) durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). &, diferente do início do treino; +, diferente de B1, B4 e B5; @, diferente de B2 e B3; #, diferente do mesmo grupo na sessão teste. Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. n = 17-20 por grupo.

Figura 9. Efeitos sobre o controle motor em fêmeas proestro/estro tratadas com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. #, superior ao controle. Média \pm EPM. ANOVA de uma via. n = 13-17 por grupo.

Figura 10. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas metaestro/diestro. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste. (B) Tempo médio de congelamento dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle) durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). &, diferente do início do treino. @, diferente de B1; \$, diferente de B2; *, diferente do grupo controle; #, diferente do controle no teste. Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. n = 12-13 por grupo.

Figura 11. Efeitos sobre o controle motor em fêmeas em metaestro/diestro tratadas com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (D) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. *, superior ao grupo controle. Média \pm EPM. ANOVA de uma via. n = 13-17 por grupo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro e estro separadamente.

LISTA DE SIGLAS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico;

ANOVA: Análise de Variância;

CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina;

CS: Estímulo Condicionado;

EPM: Erro Padrão da Média;

HPA: Eixo Hipotálamo-Hipófise Adrenal;

M/D: Metaestro/Diestro;

MET 30: Metirapona na dose de 30 mg/kg;

MET 60: Metirapona na dose de 60 mg/kg.

MET: Metirapona;

P/E: Proestro/Estro;

US: Estímulo Incondicionado;

SUMÁRIO

1	Introdução	12.
1.1	Condicionamento Aversivo Respondente	12.
1.2	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).....	14.
1.3	Corticosterona e Condicionamento Aversivo	17.
1.4	Diferenças Sexuais	19.
2	Objetivos.....	23.
2.1	Objetivo Geral.....	23.
2.2	Objetivos Específicos.....	23.
3	Material e métodos	24.
3.1	Animais	24.
3.2	Determinação da Fase do Ciclo Estral	24.
3.3	Drogas	25.
3.4	Equipamentos e Procedimentos	25.
3.5	Delineamento Experimental.....	29.
3.6	Análise Estatística	30.
4	Resultados.....	31.
4.1	Machos	31.
4.2	Fêmeas Proestro/Estro.....	35.
4.3	Fêmeas Metaestro/Diestro.....	39.
5	Discussão.....	44.
6	Conclusões	51.
7	Referências Bibliográficas.....	52.
8	ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar...63.	

1. INTRODUÇÃO

Medo e ansiedade têm origem nas manifestações de defesa que os animais apresentam diante de estímulos aversivos, os quais podem vir a prejudicar sua integridade física. Tais reações teriam sido relevantes para a conservação das espécies (DARWIN, 1872). Em geral, as palavras medo e ansiedade são utilizadas para fazer menção à ativação do sistema comportamental defensivo que inicia um conjunto de modificações de natureza autonômica, neuroendócrina e comportamental que são desencadeadas perante estímulos considerados ameaçadores no ambiente (MCNAUGHTON & CORR, 2004). Essas emoções têm sido frequentemente estudadas no laboratório, sendo o condicionamento aversivo respondente uma das abordagens amplamente utilizadas (PAVLOV, 1927; BOLLES & COLLIER, 1976; FENDT & FANSELOW, 1999; LEDOUX, 2014).

1.1 Condicionamento Aversivo Respondente

No condicionamento aversivo respondente, ao longo da etapa de aquisição (treino), um estímulo afetivamente neutro, que pode ser sonoro, visual ou o próprio contexto experimental, é pareado com um estímulo aversivo incondicionado, como um choque elétrico de baixa intensidade. Como consequência, o estímulo que antes era neutro passa a eliciar respostas condicionadas de caráter defensivo quando, futuramente, é apresentado sozinho ao longo da etapa de expressão do experimento (teste), tornando-se assim um estímulo condicionado aversivo (FENDT & FANSELOW, 1999; PEZZE & FELDON, 2004). Tais respostas condicionadas podem, na sequência, ser gradativamente atenuadas se o estímulo condicionado for apresentado muitas vezes sem a presença do estímulo incondicionado (teste/reteste). Esse processo inibe ao invés de apagar a associação original e é conhecido como extinção (MILAD et al., 2009; MILAD & QUIRK, 2012).

O condicionamento aversivo é um modo de aprendizagem associativa muito utilizado para compreender os mecanismos relacionados aos processos de memória de caráter aversivo (RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009). A aprendizagem associativa é um processo de

natureza adaptativa que possibilita que um ser vivo aprenda a antecipar eventos. Com o objetivo de aperfeiçoar a prática clínica, pesquisas com comportamentos condicionados em roedores são relevantes, uma vez que muitos dos sintomas manifestados por indivíduos em sofrimento psíquico estão associados às vivências de medo e/ou ansiedade e englobam repertórios comportamentais aprendidos ou condicionados mais do que comportamentos inatos ou incondicionados. No estudo da ansiedade, o condicionamento aversivo contextual parece ser um modelo experimental mais adequado do que aquele relacionado aos estímulos discretos, como um som ou uma luz. Isso ocorre porque a ansiedade é provocada de maneira menos discriminatória e com elevado índice de incerteza e conflito (PHILLIPS & LEDOUX, 1992; OHMAN & MINEKA, 2001; GRILLON, 2002; ALBRECHET-SOUZA et al., 2011; ALBRECHET-SOUZA et al., 2013).

No encéfalo, as principais áreas envolvidas no condicionamento aversivo contextual são amígdala, hipocampo, córtex frontal e córtex cingulado. O córtex frontal e o córtex cingulado são regiões de aprendizagem atencional e estão envolvidas na aquisição de novas memórias. Estudos mostram que lesões ou a inativação farmacológica dessas áreas provocam déficits no condicionamento ao contexto (PEZZE & FELDON, 2004). A aprendizagem aversiva contextual também requer a atividade coordenada do hipocampo e da amígdala (TOVOTE, 2015). Estudos anteriores apontam que danos no hipocampo podem prejudicar o condicionamento de respostas de medo a estímulos contextuais, enquanto lesões na amígdala podem prejudicar o condicionamento de respostas de medo tanto a estímulos contextuais quanto a estímulos sonoros (PHILLIPS & LEDOUX, 1992). Além disso, neurônios hipocámpais da parte ventral de CA1 codificam e transmitem a representação contextual através de projeções monossinápticas para a amígdala, que induz o comportamento defensivo (KIM, 2020; XU, 2016; TOVOTE, 2016).

Em ratos, o condicionamento aversivo contextual é geralmente avaliado por meio do comportamento de congelamento. O congelamento é caracterizado por uma ausência completa de movimentos, exceto pelos movimentos associados à respiração, e uma postura corporal tensa resultante do aumento da tonicidade muscular nesse estado defensivo (KALIN & SHELTON, 1989;

FANSELOW, 1994). O congelamento é uma resposta de medo que pode ser observada tanto em reação a estímulos de natureza condicionada quanto em reação a estímulos incondicionados (ROSEN, 2004). Dessa forma, o congelamento faz parte de um repertório de comportamentos defensivos adaptativos característicos da espécie, sendo que algumas espécies possuem uma tendência inata pelo congelamento, enquanto outras espécies dificilmente irão congelar (BOLLES, 1970). No que tange ao medo condicionado ao contexto, a literatura aponta que a resposta de congelamento é baixa para os animais que são testados em um contexto diferente daquele em que receberam choques nas patas, enquanto aqueles animais que são testados no mesmo contexto apresentam resposta de congelamento elevada (BOLLES & COLLIER, 1976; DE SOUZA CAETANO et al., 2013; ALVES et al., 2022). O medo condicionado avaliado em ratos por meio da resposta de congelamento está também associado à elevação da concentração plasmática de corticosterona (RODRIGUES et al., 2009).

1.2 Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)

A corticosterona, em roedores, e o cortisol, em primatas, são hormônios corticosteroides cujas origens estão no córtex das glândulas adrenais, sendo liberados em resposta à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (RODRIGUES et al., 2009). O eixo HPA é um dos elementos fundamentais do sistema de estresse. O eixo HPA funciona através de um mecanismo de sincronização circadiana em que as concentrações de corticosteroides apresentam oscilações diárias, atingindo pico próximo ao acordar e concentrações mais baixas durante o período de inatividade (KALSBECK et al., 2012).

No que tange à fisiologia do eixo HPA, os neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo liberam o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e seu co-secretagogo arginina-vasopressina, além de outros neuropeptídeos que modulam o eixo HPA (DE KLOET et al., 1998). Faz parte do eixo HPA a glândula pituitária que está localizada abaixo do hipotálamo. As células corticotróficas na glândula pituitária anterior, em resposta ao CRH, sintetizam e secretam o

hormônio adrenocorticotrófico ou corticotropina (ACTH), que estimula a secreção de cortisol (em primatas) e corticosterona (em roedores) pelas glândulas adrenais em resposta ao estresse, além de elevar os andrógenos adrenais (SEOANE & DIEGUEZ, 2018). Em resposta a um estímulo estressor, esses hormônios impulsionam a energia através do metabolismo da glicose, lipólise e proteólise, ao mesmo tempo em que inibem o crescimento, a reprodução e o sistema imunológico (MCEWEN & GIANAROS, 2011).

A regulação do eixo HPA necessita do feedback negativo dos corticosteroides (BANGASSER & VALENTINO, 2014). Tanto o cortisol quanto a corticosterona regulam negativamente a síntese e secreção do CRH e do ACTH (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018). O efeito de retroalimentação negativa do cortisol e da corticosterona acontecem através da ativação dos receptores mineralocorticoides (MRs) e/ou receptores glicocorticoides (GRs) localizados em diversas áreas encefálicas e na pituitária, com efeitos genômicos e não genômicos tanto rápidos quanto lentos (KELLER-WOOD, 2015).

Outras regiões-alvo do cortisol e da corticosterona são: o complexo basolateral da amígdala, onde as manifestações emocionais são organizadas; o hipocampo, onde as respostas emocionais são classificadas em relação ao tempo, ao espaço e ao contexto para a conservação da vivência na memória; regiões do córtex pré-frontal, que estão relacionadas ao processo cognitivo, ao planejamento e ao controle, também envolvidas nas diversas manifestações comportamentais de caráter social e comportamentos impulsionados pela recompensa ou pelo medo (DE KLOET & JOELS, 2013). No complexo amigdalóide, por exemplo, os corticosteroides são capazes de elevar a excitabilidade sináptica e favorecer a arborização dendrítica (RODRIGUES et al., 2009).

Ademais, as proteínas de ligação plasmática, esteroides sexuais e o sistema nervoso autônomo também podem exercer função na regulação do eixo HPA. A disfunção desse eixo pode ser produto de anormalidades envolvendo o hipotálamo, a hipófise ou as glândulas adrenais. Visto isso, quando ocorre a deficiência de cortisol ou corticosterona, o organismo não consegue lidar com eventos

estressantes de maneira apropriada (KARACA; GROSSMAN; KELESTIMUR, 2021). Por outro lado, a literatura aponta que a exposição prolongada à corticosterona pode modificar a plasticidade em áreas cerebrais relacionadas à cognição (MARKS et al., 2015). Hipocampo e amígdala são especialmente afetados, uma vez que ambas as estruturas possuem um elevado número de receptores de glicocorticoides (MORIMOTO et al., 1996; FELDMAN & WEIDENFELD, 1999). Nesse sentido, estudo anterior revelou efeitos dependentes da dose de corticosterona na recuperação da memória – ratos tratados com corticosterona congelaram significativamente mais do que os animais o grupo controle, havendo prejuízo da extinção (MARKS et al., 2015).

A administração aguda de glicocorticoides pode ter efeitos semelhantes nos processos de memória tanto em condições de estresse agudo quanto de estresse crônico (QUERVAIN et al., 2009). Estudo anterior mostrou que a administração de glicocorticoides reduz a recordação da memória relacionada ao trauma no Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) e aumenta a extinção do medo em pessoas com TEPT e com fobias. Ademais, os efeitos da administração aguda de glicocorticoides na recuperação da memória também são observados em humanos cujas concentrações de glicocorticoides são cronicamente elevadas como consequência do uso de medicação (COLLUCIA et al., 2008).

Visto isso, estudo anterior indica que os glicocorticoides podem ter efeitos opostos em diferentes processos de memória, incluindo consolidação, recuperação, extinção e reconsolidação (QUERVAIN et al., 2016). No que tange à consolidação da memória, os glicocorticoides são facilitadores para informações com forte conteúdo emocional a depender da dose administrada. Por outro lado, elevadas concentrações de glicocorticoides podem interferir de forma negativa no processo de recuperação da memória (QUERVAIN et al., 2016). Ainda no mesmo artigo, os pesquisadores apontam que os glicocorticoides facilitam a consolidação das memórias de extinção recém-formadas. Por último, cabe dizer que a reconsolidação da memória depende da sinalização de glicocorticoides sendo que, a administração de antagonistas de glicocorticoides após a reativação, interrompe o processo (QUERVAIN et al., 2016).

A síntese da corticosterona e do cortisol pode ser inibida pela metirapona, um fármaco que age como bloqueador da produção endógena de corticosteroides adrenais, sendo proveniente da piridina. A metirapona é um inibidor da enzima 11- β -hidroxilase adrenal, que é responsável pela conversão de 11-desoxicortisol em corticosterona/cortisol (KARACA; GROSSMAN; KELESTIMUR, 2021). A metirapona é comumente utilizada na clínica para diagnóstico e tratamento da Síndrome de Cushing, patologia na qual ocorre uma combinação de anormalidades clínicas originadas pela presença prolongada de concentrações elevadas de cortisol ou corticóides relacionados em humanos (CECCATO et al., 2018). No entanto, alguns estudos investigam o uso desse fármaco para o tratamento de depressão em pacientes refratários ao tratamento com antidepressivos já disponíveis no mercado (MCALLISTER-WILLIAMS et al., 2016; CALDIROLI et al., 2021). Estudo anterior realizado com humanos demonstrou que a redução das concentrações de glicocorticóides por meio da administração de metirapona é uma maneira eficiente de diminuir a intensidade de uma memória emocional de forma duradoura (MARIE-FRANCE MARIN et al., 2011).

A metirapona é frequentemente utilizada em pesquisas envolvendo roedores como ferramenta para modular a produção de corticosterona e estudar os efeitos dessa manipulação em processos fisiológicos e comportamentais. Por exemplo, literatura anterior que estudava o estresse demonstrou que a administração da metirapona reduziu a expressão de comportamentos defensivos no labirinto em cruz elevado em ratos (CALVO et al., 1998).

1.3 Corticosterona e Condicionamento Aversivo

No que tange à relação entre a corticosterona e o condicionamento aversivo, estudo anterior demonstrou que a administração de corticosterona pós-treino realizada imediatamente após a vivência de eventos de intensidade leve e moderada afetou tanto a consolidação da memória quanto a generalização do medo referente ao tempo em ratos machos (DOS SANTOS CORRÊA et al., 2021). Outro estudo apontou que o pré-tratamento com metirapona não afetou o aumento do medo

condicionado de ratos machos em uma sessão de estresse múltiplo (RYOKE et al., 2014). Ainda em ratos machos, a metirapona atenuou a expressão da resposta de congelamento quando administrada antes do teste, enquanto a corticosterona não apresentou efeitos significativos (ATSACK et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2013; REIS et al., 2016).

O eixo HPA possui relação com diversas neurotransmissões, uma delas é a neurotransmissão dopaminérgica. Sobre isso, estudo que investigou a associação entre a ativação do eixo HPA e a neurotransmissão dopaminérgica na expressão de respostas de medo condicionado mostrou que o bloqueio da síntese de corticosterona, através da administração da metirapona, reduziu tanto a liberação de dopamina no complexo basolateral da amígdala quanto a resposta de congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2013). Na sequência, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores mineralocorticóides, realizado de forma local na região da área tegmental ventral, também diminuiu a liberação de dopamina na amígdala basolateral e a expressão do congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2014). Visto isso, os dados apontam que a ativação do eixo HPA e a ação da dopamina na via área tegmental ventral-amígdala basolateral parecem ser etapas relevantes em uma resposta de caráter neuroendócrino, neuroquímico e comportamental integrada quando o organismo se encontra em situação de ameaça e exibe reações para manejar esta circunstância (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Em relação à neurotransmissão dopaminérgica, estudos anteriores indicam que a elevação da concentração de dopamina no sistema límbico está relacionada ao medo condicionado, e que uma redução na atividade da dopamina na região da amígdala basolateral diminui a manifestação do medo condicionado em roedores (DE OLIVEIRA et al., 2011; DE SOUZA-CAETANO et al., 2013) da mesma forma que o bloqueio de receptores dopaminérgicos D2 por meio da administração intraperitoneal de sulpirida (DE OLIVEIRA et al., 2006; DE SOUZA-CAETANO et al., 2013; DE VITA et al., 2021). Nesse mesmo sentido, em estudo recente sobre a expressão e extinção do medo condicionado ao contexto em fêmeas, o bloqueio dos receptores D2 reduziu consideravelmente a resposta de congelamento condicionado em ratas nas fases de proestro/estro do ciclo estral. Por

outro lado, as ratas em metaestro/diestro não manifestaram os efeitos do bloqueio de D2 de maneira significativa, sugerindo que pode haver uma relevante modulação hormonal no que diz respeito à ação da neurotransmissão dopaminérgica no medo condicionado (ALVES et al., 2022).

Mediante o exposto, considerando que o bloqueio da síntese de corticosterona através da administração intraperitoneal de metirapona reduziu a concentração de dopamina na amígdala basolateral em machos (DE OLIVEIRA et al., 2013) e que o bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 reduziu a resposta de congelamento condicionado contextual tanto em machos (DE SOUZA-CAETANO et al., 2013; DE VITA et al., 2021) quanto em fêmeas em proestro/estro (ALVES et al., 2022), ampliar o estudo do envolvimento do eixo HPA no congelamento condicionado em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral se revela uma questão relevante.

1.4 Diferenças Sexuais

É sabido que as mulheres possuem maior predisposição a manifestar transtornos associados ao medo e/ou ansiedade assim como transtornos de humor (BROMET et al., 2011; WITTCHEN et al., 2011; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BOLEA-ALAMANAC et al., 2018). O encéfalo feminino atua em um ambiente de alterações químicas provocadas pela síntese cíclica dos hormônios sexuais, conhecido como ciclo menstrual nas mulheres e ciclo estral em grande parte dos demais mamíferos (KINRYS et al., 2005). Desta forma, o desenvolvimento da ansiedade na mulher pode estar relacionado à oscilação cíclica dos hormônios gonadais. Apesar disso, alguns autores enumeram em seus estudos alguns motivos pelos quais os pesquisadores evitam fazer pesquisa básica com fêmeas e apresentam contraposições a essas ideias (ROCKS et al., 2022). Alguns motivos enumerados são: acredita-se que os animais do sexo feminino não apresentem maior variabilidade do que os machos; acredita-se que o acompanhamento do ciclo estral represente um estressor e possa ser uma variável oculta nos dados uma vez incorporada à pesquisa; entende-se que as pesquisas devam iniciar com coortes menores que envolvam animais de ambos os sexos, e só depois avançar para estudos de acompanhamento mais abrangentes, caso necessário; afirma-se que

o acompanhamento do ciclo estral necessita de profissional especialista em endocrinologia reprodutiva (ROCKS et al., 2022). No entanto, a literatura contrapõe-se a esses motivos, defendendo que levar em consideração o ciclo estral das fêmeas pode fazer com que haja melhor compreensão dos dados e aumento da capacidade de identificação e explicação sobre diferenças sexuais (ROCKS et al., 2022).

O ciclo estral das ratas possui um período aproximado de 4 a 5 dias de duração e se distribui em fases, sendo elas: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro e o estro possuem duração de aproximadamente 12 horas cada um, o metaestro se estende por cerca de 21 horas, e o diestro se prolonga por aproximadamente 57 horas (ANDRADE et al., 2002). A ovulação pode ocorrer desde o início do proestro até o final do estro (YOUNG et al., 1941; SCHWARTZ, 1964). Durante o ciclo estral, as concentrações de prolactina e hormônio luteinizante atingem concentrações mais elevadas na fase do proestro e se mantêm baixas em estro, metaestro e diestro. As concentrações de hormônio folículo estimulante possuem dois picos, um em proestro e o outro em estro, enquanto que em metaestro e diestro os valores são mais baixos (SPORTNITZ et al., 1999; SMITH et al., 1975). No que tange aos hormônios sexuais progesterona e estradiol, na fase do proestro observa-se, pela manhã, valores mais baixos de progesterona e mais elevadas de estradiol, enquanto que no período da tarde, ocorre a elevação da progesterona até o seu ápice, e o estradiol cai rapidamente, enquanto que no estro, a progesterona e o estradiol se mantêm baixos e estáveis ao longo dessa fase do ciclo (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975). No que diz respeito ao metaestro, observa-se aumento do estradiol e da progesterona nesta fase do ciclo (SPORTNITZ et al., 1999; SMITH et al., 1975). Por último, no diestro, observa-se no começo dessa fase do ciclo a produção de progesterona que começa a elevar gradualmente as suas concentrações até a manhã do segundo dia, quando ela para de subir, o que provoca uma rápida queda, ao passo que o estradiol permanece com uma relativa estabilidade durante o diestro (LOVICK & ZANGROSSI, 2021).

Desta forma, durante o ciclo estral, o estradiol e a progesterona, que são os principais hormônios sexuais, apresentam oscilações intensas e desalinhas nas suas concentrações de

secreção. Considerando a capacidade dessas moléculas, que são esteróides e lipofílicas, de atravessar com facilidade a barreira hematoencefálica, as concentrações dessas moléculas no plasma provocam mudanças, que são proporcionais no encéfalo (LOVICK & ZANGROSSI, 2021). Com isso, estudos apontam que a queda rápida nas concentrações de progesterona no diestro pode provocar alterações na plasticidade da expressão do subtipo de receptor GABA_A, provocando mudanças importantes com relação à excitabilidade dos circuitos cerebrais ligados à ansiedade (SMITH et al., 1998; GRIFFITHS & LOVICK, 2005; DEVALL et al, 2015). Sobre isso, estudo anterior realizado com roedores machos e fêmeas demonstrou que ratas – em especial as que estavam nas fases de metaestro/diestro do ciclo estral - quando previamente tratadas com um agonista de receptores serotoninérgicos, a metaclorofenilpiperazina, manifestaram maior prejuízo em relação ao comportamento de extinção do medo condicionado ao contexto do que os machos (REIMER et al., 2018).

Esses achados apontam para uma provável associação entre diferenças sexuais, oscilação de hormônios sexuais e a expressão do medo condicionado em fêmeas. De fato, a literatura indica que machos e fêmeas possuem diferenças com relação à ativação do eixo HPA, o que pode provocar respostas distintas diante do estresse a depender do sexo, sugerindo que os esteroides sexuais tenham papel fundamental na modulação dessa resposta (PATCHEV & ALMEIDA, 1998; YOUNG, 1995).

Pesquisas anteriores com roedores observaram que fêmeas apresentam valores mais elevados de corticosterona em relação aos machos (CRITCHLOW, 1963; KOKRAS et al., 2012). No que diz respeito aos valores basais de corticosterona ao longo das fases do ciclo estral, estudo anterior constatou que a corticosterona sofreu oscilação conforme a fase do ciclo estral apresentando sua concentração mais baixa no estro e mais elevada no proestro (ATKINSON & WADDEL, 1997). Por outro lado, com relação aos machos, as concentrações de corticosterona não foram distintas das fêmeas em estro, no entanto, os valores dos machos foram muito menores do que os valores de corticosterona nas fêmeas em proestro, metaestro e diestro (ATKINSON & WADDEL, 1997). Além disso, esse mesmo estudo aponta que há uma maior responsividade do córtex adrenal quando o estradiol está alto (ATKINSON & WADDEL, 1997). Ademais, a exposição ao estresse desencadeia

um aumento mais expressivo de CRH, ACTH e corticosterona em fêmeas do que em machos (RIVIER, 1999; VIAU et al & WONG, 2005). Essa distinção pode estar relacionada às oscilações da ativação do eixo HPA ao longo do ciclo estral das fêmeas. Em pesquisa na qual as fêmeas receberam estradiol e a combinação de estradiol com progesterona, observou-se maior secreção de corticosterona depois do fim do episódio de estresse, indicando que as respostas elevadas de estresse ocorrem mais no proestro, quando o estradiol está mais elevado (VIAU & MEANEY, 1991).

Em síntese, a literatura aponta a relevância do eixo HPA e da dopamina para o medo condicionado em ratos machos, com o bloqueio da síntese da corticosterona – através da metirapona – e o bloqueio dos receptores D2 da dopamina – por meio da sulpirida – interferindo na expressão do congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2013; REIS et al., 2016; DE SOUZA-CAETANO et al., 2013; DE VITA et al., 2021). No caso da dopamina, resultados semelhantes já foram observados para fêmeas (ALVES et al., 2022). Já para o eixo HPA, o entendimento de sua importância para as diferentes fases do medo condicionado ao contexto em fêmeas continua em aberto. Em vista disso, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do bloqueio da síntese de corticosterona na expressão e extinção da resposta condicionada de congelamento em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. A hipótese considerada é a de que o bloqueio da síntese de corticosterona, por meio da administração intraperitoneal de metirapona, reduziria a expressão da resposta condicionada de congelamento em machos e fêmeas sem afetar o controle motor, com resultados mais robustos durante o proestro/estro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar a participação da corticosterona na resposta condicionada de congelamento em machos e em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

2.2 Objetivos Específicos

1. Reproduzir os achados acerca dos efeitos da metirapona, bloqueador da síntese de corticosterona, na diminuição da expressão do congelamento condicionado em machos.
2. Avaliar os efeitos da metirapona na expressão e extinção da resposta condicionada de congelamento em fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro.
3. Verificar se a metirapona é capaz de alterar a resposta condicionada de congelamento sem afetar os comportamentos motores em machos e em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 138 ratos Wistar, 45 machos e 93 fêmeas, com cerca de 60 dias de vida, com peso aproximado de 250 g para machos e 220 g para fêmeas. Os animais advieram do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem do Departamento de Psicologia da UFSCar. Foram acomodados em grupos de 4 roedores, em gaiolas de polipropileno de proporções 41 × 33 × 24 cm, forradas com maravalha, com acesso livre a alimento e água. O biotério possui temperatura controlada em 23 °C ± 1 °C, e programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro 12 × 12 h, com início do período claro às 7 horas. Todos os experimentos foram efetuados ao longo da fase clara do ciclo, no período entre 13h00 e 17h00. Os animais foram levados individualmente até a sala experimental em caixas de polipropileno forradas com maravalha, de proporções 12 × 30,5 × 19,5 cm. Todos os experimentos foram efetuados seguindo os princípios éticos da experimentação animal, e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (protocolo nº 9367190422, Anexo A).

3.2 Determinação da Fase do Ciclo Estral

Com o objetivo de identificar e acompanhar a fase do ciclo estral das ratas, foi efetuado diariamente o esfregaço vaginal. O ciclo foi observado por um período de aproximadamente 14 dias anteriormente ao início dos experimentos. As amostras do tecido epitelial vaginal foram coletadas com uma haste flexível de plástico com algodão em suas pontas que foram umedecidas em solução fisiológica e dispostas em lâminas de microscopia. Cada fase do ciclo foi determinada de acordo com a proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos observados no esfregaço (MAENG et al., 2015). As fêmeas destinadas aos experimentos foram separadas conforme o ciclo estral em proestro/estro e metaestro/diestro, considerando o dia do teste (REIMER et al., 2018; ALVES et al., 2022). O proestro pode ser reconhecido por possuir agregados de células nucleadas;

o estro pode ser reconhecido através da abundância das células cornificadas; o metaestro pode ser identificado por meio da existência dos leucócitos e da combinação de células cornificadas e nucleadas; o diestro é semelhante ao metaestro no que se refere à presença dos tipos celulares, com a exceção de serem muito mais espaçados (Fig.1).

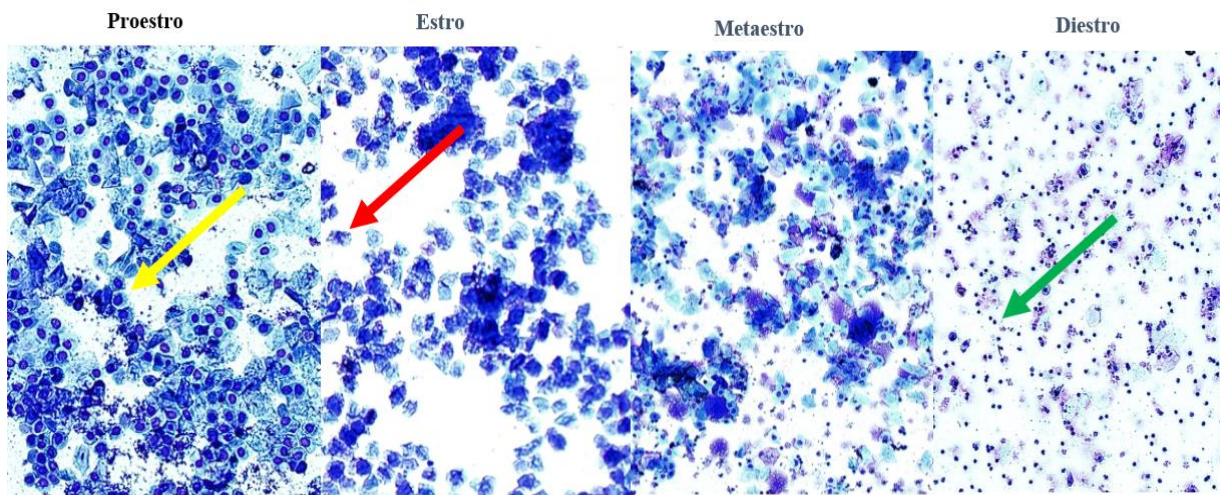


Figura 1. Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas. A seta amarela indica uma célula nucleada. A seta vermelha indica uma célula cornificada. A seta verde indica um leucócito.

3.3 Drogas

A droga utilizada foi o bloqueador da síntese de corticosterona, metirapona. A metirapona foi primeiramente misturada com Tween 80 (2%) e, em seguida, dissolvida em solução salina. Foi injetada intraperitonealmente nas doses de 30 mg/kg ou 60 mg/kg, 20 min antes da sessão de teste. Os animais controle receberam uma injeção com volume equivalente de veículo (salina contendo 2% Tween 80), 20 min antes da sessão de teste. As doses e o tempo de espera foram baseados em estudos anteriores (DE OLIVEIRA et al., 2013; REIS et al., 2016).

3.4 Equipamentos e Procedimentos

Condicionamento Aversivo

Treino: A caixa que foi utilizada para o treino do medo condicionado ao contexto possuía 26 × 20 × 20 cm (Fig.2). As paredes e o teto eram de metal de cor branca e a porta de vidro

transparente. O assoalho da caixa foi formado por 13 barras de metal de 5 mm de diâmetro com a distância de 1,5 cm entre elas. Essa caixa foi colocada dentro de uma caixa de atenuação acústica feita de alumínio de proporções 66 × 43 × 45 cm, para que não houvessem ruídos externos ao longo do teste. O próprio ambiente da caixa serviu como estímulo condicionado (CS). Foram aplicados 10 choques elétricos (estímulo incondicionado - US) de intensidade de 0,6 mA com duração de 1 s cada. No início da sessão de treino, os animais foram colocados na caixa e passaram por 5 min de habituação. Depois destes 5 min de habituação, os roedores foram expostos aos choques, os quais foram aplicados em intervalos variáveis de 30-90 s. Foi analisado o tempo da resposta de congelamento dos animais durante 2 min antes e depois da apresentação dos choques. O congelamento foi definido como inexistência de movimentos – exceto os respiratórios – associados à retração das orelhas, exoftalmia e arqueamento do dorso, por um tempo mínimo de 6 s. A duração de cada sessão de treino foi de 15 min (DE VITA et al., 2021; ALVES et al., 2022).



Figura 2. Fotografia da caixa experimental utilizada nas fases de treino, teste e reteste de todos os grupos.

Teste: A sessão de teste foi realizada depois de 24 horas do treino, com a ausência da apresentação de choques nas pastas. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de metirapona ou veículo, 20 minutos antes da sessão de teste. Os roedores foram submetidos por 10 min à mesma caixa na qual ocorreu o treino. A avaliação do medo ocorreu pelo tempo da resposta de congelamento exibida durante os 10 min de teste. O comportamento de congelamento foi monitorado ao longo do teste e depois foi avaliado através de gravações de vídeo (DE OLIVEIRA et al., 2013; DE VITA et

al., 2021).

Reteste: Depois de 24 h da realização do teste, os roedores foram recolocados na caixa experimental (Fig.2), desta vez também sem apresentação de choques, e foi analisado o medo por meio do comportamento de congelamento. O reteste teve duração de 10 min e teve como intuito verificar a retenção da extinção (DE VITA et al., 2021; ALVES et al., 2022).

Controle motor

Após 48 h da sessão de reteste do protocolo de condicionamento aversivo houve a avaliação do desempenho motor dos animais, que consistiu nos testes de catalepsia e campo aberto.

Teste de catalepsia: Para a realização deste teste foi usada uma caixa com proporções 41 × 33 × 17 cm, na qual encontrava-se uma barra de acrílico horizontal, localizada à 8 cm acima do chão da caixa, com 30 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro. Acima da caixa encontrava-se uma câmera de vídeo que registrou os comportamentos dos ratos. As patas dianteiras dos animais foram colocadas sobre essa barra, enquanto as patas traseiras continuaram no chão. A latência para descer da barra horizontal foi medida 15 e 45 min após a administração da metirapona ou veículo. Se em qualquer das tentativas o animal não permanecesse por pelo menos de 20 s na barra, seria colocado novamente no mesmo instante na barra para uma nova tentativa, podendo ser realizadas até quatro investidas sequenciais. A informação utilizada foi a maior latência observada nas tentativas. O tempo máximo de permanência na barra foi fixado em 5 minutos. O protocolo experimental para o teste de catalepsia foi embasado em estudos anteriores (COLOMBO et al., 2013; BARROCA et al., 2019; WAKU et al., 2021, 2022).



Figura 3. Fotografia da caixa experimental utilizada para o teste de catalepsia.

Teste do campo aberto: Para o teste de campo aberto, foi utilizada uma arena formada por revestimento acrílico transparente circular de proporções 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com o solo dividido em 12 partes. Acima da arena havia uma câmera de vídeo que registrou os comportamentos dos ratos. Os animais foram introduzidos na arena durante 20 min para exploração livre. Foram registrados os comportamentos a cada minuto, tais como: quantidade de cruzamentos totais, quantidade de cruzamentos no centro, tempo de permanência no centro, quantidade de levantamentos, tempo das respostas de autolimpeza e imobilidade. O protocolo experimental para o teste do campo aberto foi pautado em estudos anteriores (DE OLIVEIRA et al., 2006, DE VITA et al., 2021; ALVES et al., 2022).



Figura 4. Fotografia da arena que foi usada para o teste de campo aberto.

3.5 Delineamento Experimental

Logo em seguida à chegada dos animais do biotério central da UFSCar ao laboratório, os machos tiveram um tempo aproximado de 14 dias para a habituação e manipulação e, em seguida, foram iniciados os experimentos. No caso das fêmeas, após a chegada ao biotério setorial, diariamente foi efetuado o esfregaço vaginal para acompanhamento do ciclo estral por cerca de 14 dias antes do começo dos experimentos. Passado o tempo de adaptação ao biotério setorial, os animais passaram pelo protocolo de medo condicionado ao contexto. Durante a fase de treino, houve a apresentação dos choques nas patas. Depois de 24 h, houve administração de metirapona ou de veículo e, após 20 min, os animais foram submetidos ao teste na mesma caixa do treino. Os animais foram divididos em três subgrupos: veículo, MET 30 mg/kg, MET 60 mg/kg, considerando os grupos de machos, fêmeas proestro/estro e fêmeas metaestro/diestro. Depois de 24 h, os animais foram submetidos ao reteste. Para a avaliação motora, após 48 h, houve a administração de metirapona ou de veículo e, depois 15 e 45 min, os animais foram submetidos ao teste de catalepsia. No intervalo entre os dois testes de catalepsia, os animais passaram pelo teste de campo aberto, com duração de 20 min (Fig.5).

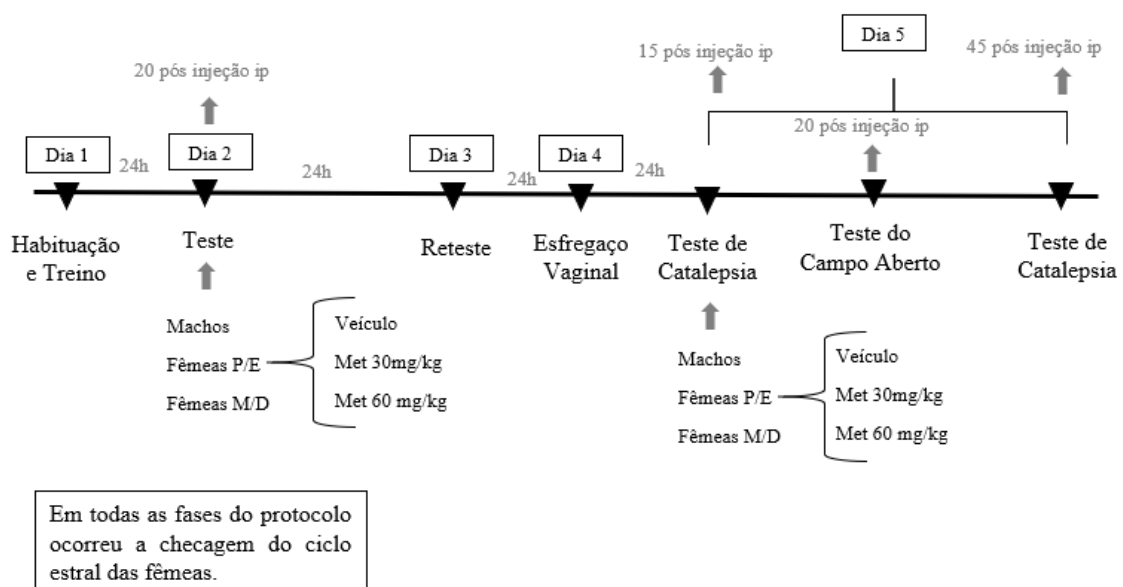


Figura 5. Delineamento experimental para a avaliação do medo condicionado contextual (dias 1-3) e controle motor (dia 5). Em todas as etapas do protocolo ocorreu a checagem do ciclo estral nas fêmeas. Os tempos pós injeção são dados em minutos. Nos dias 2 e 5 os grupos de animais machos, fêmeas P/E e fêmeas M/D foram subdivididos de acordo com o tratamento recebido em veículo, met30 e met60. P/E = proestro/estro; M/D = metaestro/diestro; Met = metirapona

3.6 Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm EPM. Para avaliação do congelamento referente ao teste e reteste de medo condicionado (expressão e extinção) foram usadas análises de variância (ANOVAs) de duas vias com medidas repetidas, com um fator para fase do procedimento (teste \times reteste) e outro para tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60). Para avaliação do congelamento ao longo de cada sessão experimental, foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com um fator para blocos (B1 \times B2 \times B3 \times B4 \times B5) e outro para tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60). Para análise dos dados de retenção da extinção (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste), foi utilizada uma ANOVA de uma via para tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60). Para a avaliação da catalepsia foram utilizadas ANOVAs de duas vias com medidas repetidas, com um fator para fase do procedimento (15 min \times 45 min) e outro para tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60). Para a avaliação dos dados do teste do campo aberto foram utilizadas ANOVAs de uma via para tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60). Em caso de significância estatística, foi usado o post-hoc de Tukey. Um valor de p menor do que 0,05 foi considerado como significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Machos

A Figura 6 apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (Met 30; n = 13) e 60 mg/kg (Met 60; n = 15) ou veículo (Controle; n = 15) sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em machos. Na Figura 6A estão representados os tempos médios de congelamento por blocos de 2 min durante o início e final da sessão Treino e durante o Teste e o Reteste. Para o Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco (Início × Fim; $F_{1,40} = 312,42$; $p < 0,05$), mas não para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 0,35$; $p > 0,05$), ou para a interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{2,40} = 0,44$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino em relação ao congelamento observado antes da apresentação dos choques ($p < 0,05$). Para o Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo tanto para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,160} = 4,05$; $p < 0,05$) quanto para o fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 3,30$; $p < 0,05$), mas não para interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,160} = 1,75$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diferença do bloco 2 em relação aos blocos 1, 4 e 5 ($p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey também indicou menor congelamento do grupo Met 60 no teste em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo tanto para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,160} = 2,91$; $p < 0,05$) quanto para o fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 3,99$; $p < 0,05$), mas não para interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,160} = 1,18$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diferença entre os blocos 3 e 5 ($p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey também indicou maior congelamento do grupo Met 30 no reteste em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Na Figura 6B podem ser observados os tempos totais médios de congelamento dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e

submetidos ao Teste e Reteste, realizados 24 e 48 h após a sessão Treino. O tempo de congelamento dos machos nestas sessões foi submetida à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que revelou efeito significativo para o fator sessão (Teste × Reteste; $F_{1,40} = 6,25$; $p < 0,05$) e para interação entre os fatores (tratamento × sessão; $F_{2,40} = 8,30$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 2,67$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição significativa do congelamento do grupo controle no reteste em relação ao mesmo grupo no teste ($p < 0,05$). Submetemos, também, os dados do Teste e do Reteste a ANOVAs de uma via de forma independente. Para o Teste, a ANOVA indicou efeito significativo para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 3,30$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diminuição significativa do congelamento do grupo Met 60 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA indicou efeito significativo para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 3,99$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de tukey indicou aumento significativo do congelamento para o grupo Met 30 em relação ao grupo controle e ao grupo Met 60 ($p < 0,05$).

Na Figura 6C podem ser observados os índices de retenção da extinção dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para os tratamentos (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,40} = 2,61$; $p > 0,05$).

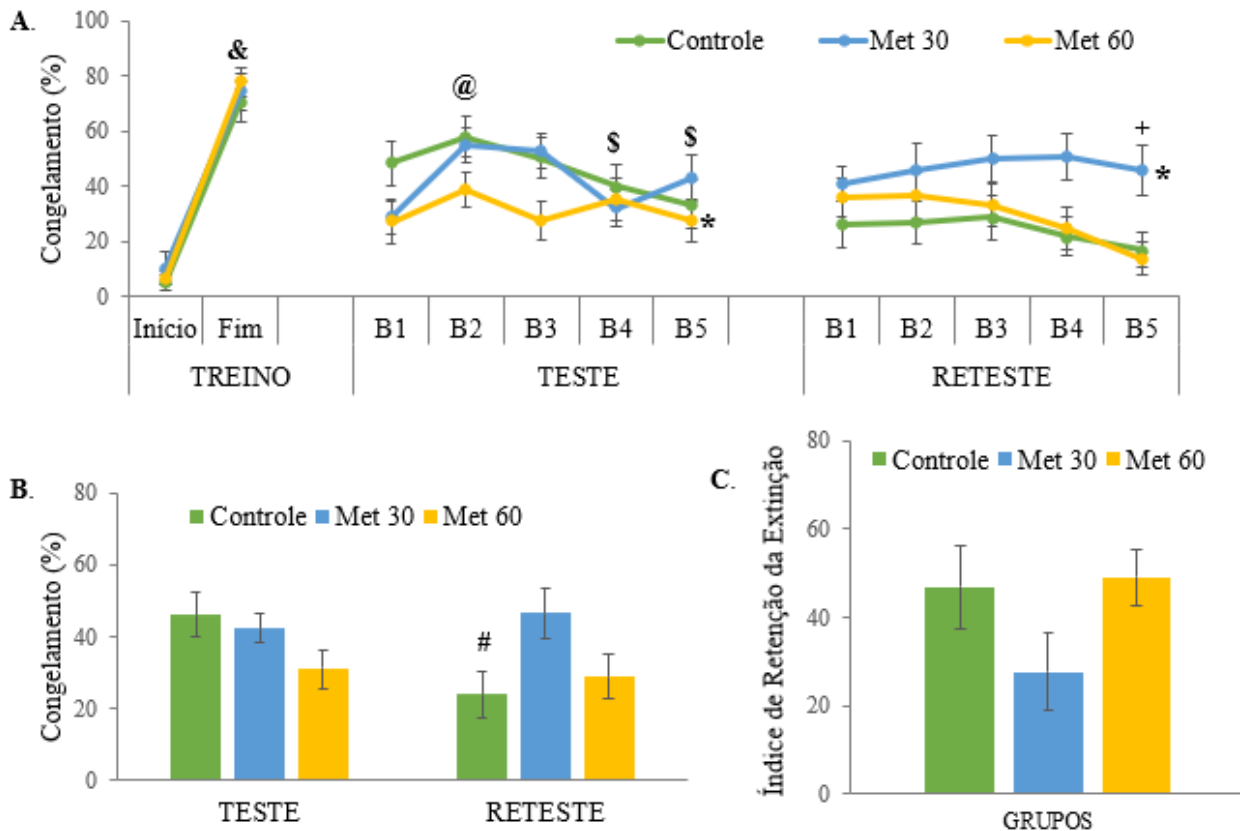


Figura 6. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em machos. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste, dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (B) Tempo médio de congelamento durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. n = 13-15 por grupo. &, diferente do início do treino; @, diferente de B1; \$, diferente de B2; +, diferente de B3; *, diferente do grupo controle; #, diferente do mesmo grupo na sessão Teste.

A Figura 7A apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (n = 13) e 60 mg/kg (n = 15) ou veículo (n = 17) sobre a latência para descer da barra no teste de Catalepsia em machos. Nela, estão contidas as médias do tempo, em segundos, dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e submetidos ao teste 15 e 45 min após a administração das drogas. As médias da latência para descer da barra dos animais nestas sessões foram submetidas à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que não revelou efeito significativo para os fatores tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,42} = 1,82$; $p > 0,05$)

ou tempo (15×45 min; $F_{1,42} = 0,47$; $p > 0,05$). Também não houve interação significativa entre os fatores (tratamento \times tempo; $F_{2,42} = 0,02$; $p > 0,05$).

As Figuras 7B, C e D apresentam os efeitos motores da administração de metirapona no teste de Campo Aberto nos machos dos grupos tratados com veículo ($n= 17$) ou metirapona nas doses de 30 mg/kg ($n= 13$) e 60 mg/kg ($n=15$), com 20 minutos de duração. Na Figura 7B, podem ser observadas as médias do número de cruzamentos totais. A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para os tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,42} = 1,86$; $p > 0,05$). Na Figura 7C, são apresentadas as médias do número de levantamentos. A ANOVA de uma via não indicou efeito significativo para os tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,42} = 0,90$; $p > 0,05$). Na Figura 7D, são apresentadas as médias de tempo, em segundos, de imobilidade. A ANOVA de uma via também não apontou diferença estatística para os tratamentos (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,42} = 0,29$; $p > 0,05$).

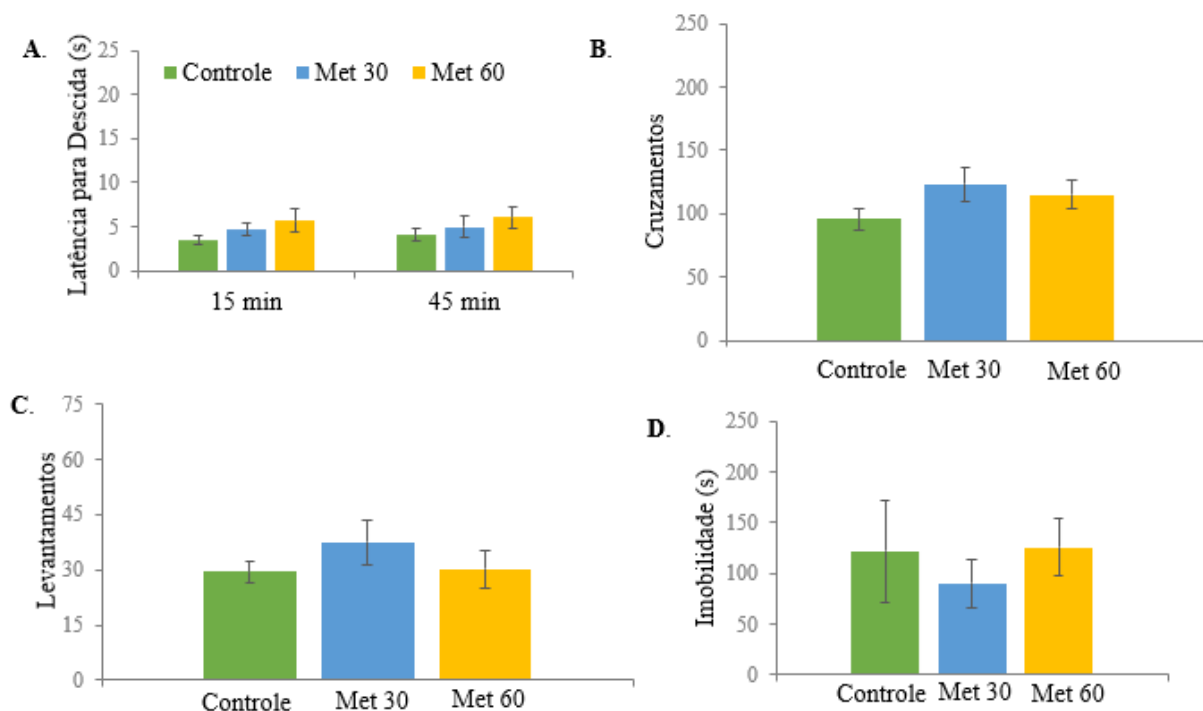


Figura 7. Efeitos sobre o controle motor em machos tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (D) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. Média \pm EPM. ANOVA de uma via. $n = 13-17$ por grupo.

4.2 Fêmeas Proestro/Estro

A Figura 8A apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (Met 30; n = 17) e 60 mg/kg (Met 60; n = 17) e veículo (Controle; n = 20) sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro/estro. Na Figura 8A estão representados os tempos médios de congelamento por blocos de 2 min durante o início e final da sessão Treino e durante o Teste e o Reteste. Para o Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco (Início × Fim; $F_{1,51} = 386,48$; $p < 0,05$), e interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{2,51} = 4,70$; $p < 0,05$), mas não para o fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,51} = 1,71$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino em relação ao congelamento observado antes da apresentação dos choques para todos os grupos ($p < 0,05$). Para o Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,204} = 6,25$; $p < 0,05$), mas não para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,51} = 1,15$; $p > 0,05$), ou interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,204} = 0,73$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diferença no bloco 2 em relação aos blocos 1, 4 e 5 ($p < 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,204} = 6,13$; $p < 0,05$), mas não para fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,51} = 2,36$; $p > 0,05$), ou para interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,204} = 1,62$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou que o bloco B5 é diferente dos blocos 2 e 3 ($p < 0,05$). Na Figura 8B podem ser observados os tempos totais médios de congelamento dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e submetidos ao Teste e Reteste, realizados 24 e 48 h após a sessão Treino. O tempo de congelamento das fêmeas em proestro/estro nestas sessões foi submetida à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que não revelou efeito significativo para os fatores sessão (Teste × Reteste; $F_{1,51} = 3,71$; $p > 0,05$) ou tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,51} = 0,87$; $p > 0,05$). No entanto, revelou efeito significativo para a interação entre os fatores (tratamento × sessão; $F_{2,51} = 3,45$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou menor congelamento

do grupo controle no reteste em relação ao teste ($p < 0,05$). Submetemos, também, os dados do Teste e do Reteste a ANOVAs de uma via de forma independente. Para o Teste, a ANOVA não revelou efeito significativo para tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,51} = 1,1$; $p > 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA não indicou efeito significativo para tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,51} = 0,42$; $p < 0,05$). Na Figura 8C podem ser observados os índices de retenção da extinção dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para o fator tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,51} = 0,42$; $p > 0,05$).

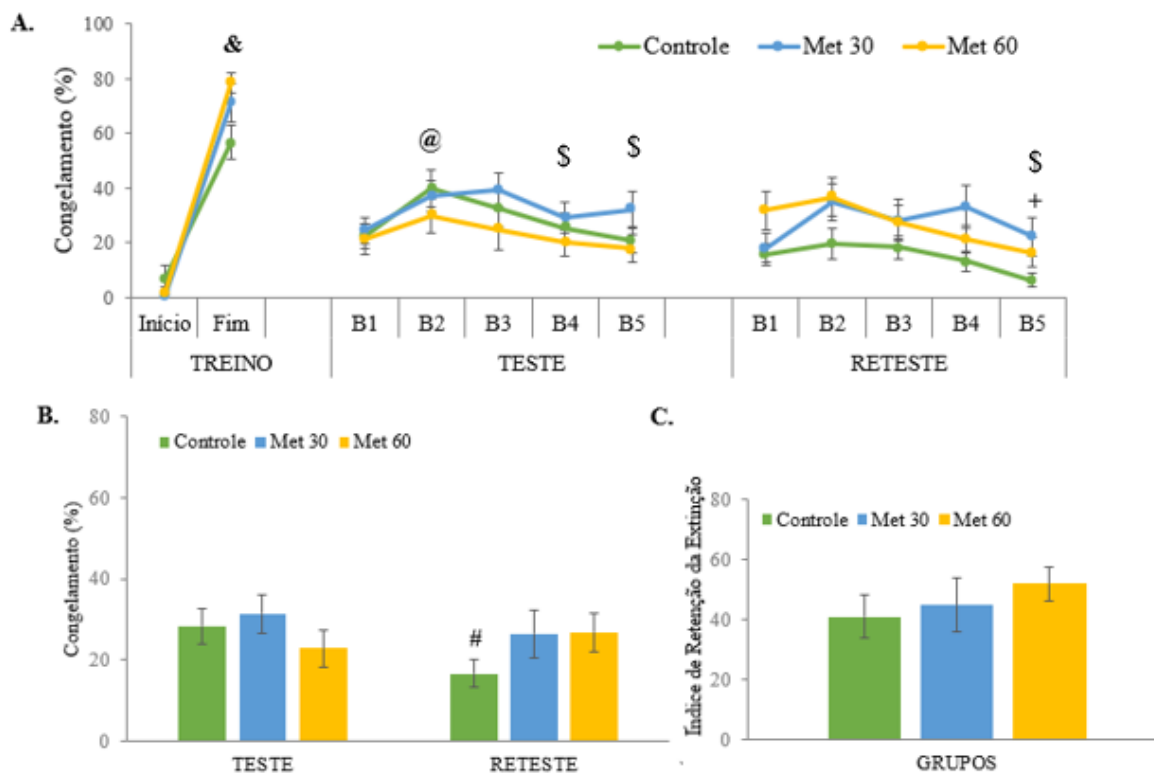


Figura 8. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro/estro. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste. (B) Tempo médio de congelamento dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle) durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. $n = 17-20$ por grupo. &, diferente do início do treino; @, diferente de B1; \$, diferente de B2; +, diferente de B3; #, diferente do mesmo grupo na sessão Teste.

A tabela 1 apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg e 60 mg/kg e veículo sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro e estro separadamente. Para proestro, as ANOVAs de uma via não revelaram efeito significativo para o congelamento no teste (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,28} = 0,38$; $p > 0,05$) ou no reteste ($F_{2,28} = 0,94$; $p > 0,05$), ou para o índice de retenção da extinção ($F_{2,28} = 0,34$; $p > 0,05$). Para estro, as ANOVAs de uma via também não revelaram efeito significativo para o congelamento no teste (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,20} = 1,32$; $p > 0,05$) ou no reteste ($F_{2,20} = 1,41$; $p > 0,05$), ou para o índice de retenção da extinção ($F_{2,20} = 0,17$; $p > 0,05$).

Tabela 1 Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em proestro e estro separadamente.

Fase do Ciclo	Grupo	Teste - Congelamento (%)	Reteste - Congelamento (%)	FEI
Proestro	Controle	30,64 ± 4,99	17,05 ± 5,74	34,62 ± 10,46
	Met 30	32,94 ± 8,22	20,52 ± 8,88	50,87 ± 14,28
	Met 60	26,95 ± 6,34	24,36 ± 4,63	54,20 ± 5,88
Estro	Controle	28,54 ± 7,72	17,59 ± 4,24	42,41 ± 10,77
	Met 30	29,83 ± 5,34	32,94 ± 7,58	38,10 ± 11,25
	Met 60	15,22 ± 5,59	31,11 ± 11,27	47,78 ± 12,10

A Figura 9A apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (Met 30 n = 17) e 60 mg/kg (Met 60 n = 16) e veículo (Controle n = 15) sobre a latência para descer da barra no teste de Catalepsia em fêmeas em proestro/estro. Nela, estão contidas as médias do tempo, em segundos, dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e submetidos ao teste 15 e 45 min após a administração das drogas. As médias da latência para descer da barra dos animais nestas sessões foram submetidas à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que não revelou efeito significativo para os fatores tratamento (Controle × Met 30

× Met 60; $F_{2,45} = 1,93$; $p > 0,05$) ou tempo (15 × 45 min; $F_{1,45} = 0,01$; $p > 0,05$). Também não houve interação significativa entre os fatores (tratamento × tempo; $F_{2,45} = 0,27$; $p > 0,05$).

As Figuras 9B, C e D apresentam os efeitos motores da administração de metirapona no teste de Campo Aberto nas fêmeas proestro/estro dos grupos tratados com veículo (n= 15) ou metirapona nas doses de 30 mg/kg (n= 17) ou 60 mg/kg (n=16), com 20 minutos de duração. Na Figura 9B, podem ser observadas as médias do número de cruzamentos totais. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,45} = 3,62$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou que o grupo Met 60 apresentou número de cruzamentos totais superior ao grupo controle ($p < 0,05$). Na Figura 9C, são apresentadas as médias do número de levantamentos. A ANOVA de uma via não indicou efeito significativo para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,45} = 1,40$; $p > 0,05$). Na Figura 9D, são apresentadas as médias de tempo, em segundos, de imobilidade. A ANOVA de uma via também não apontou diferença estatística para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,45} = 0,24$; $p > 0,05$).

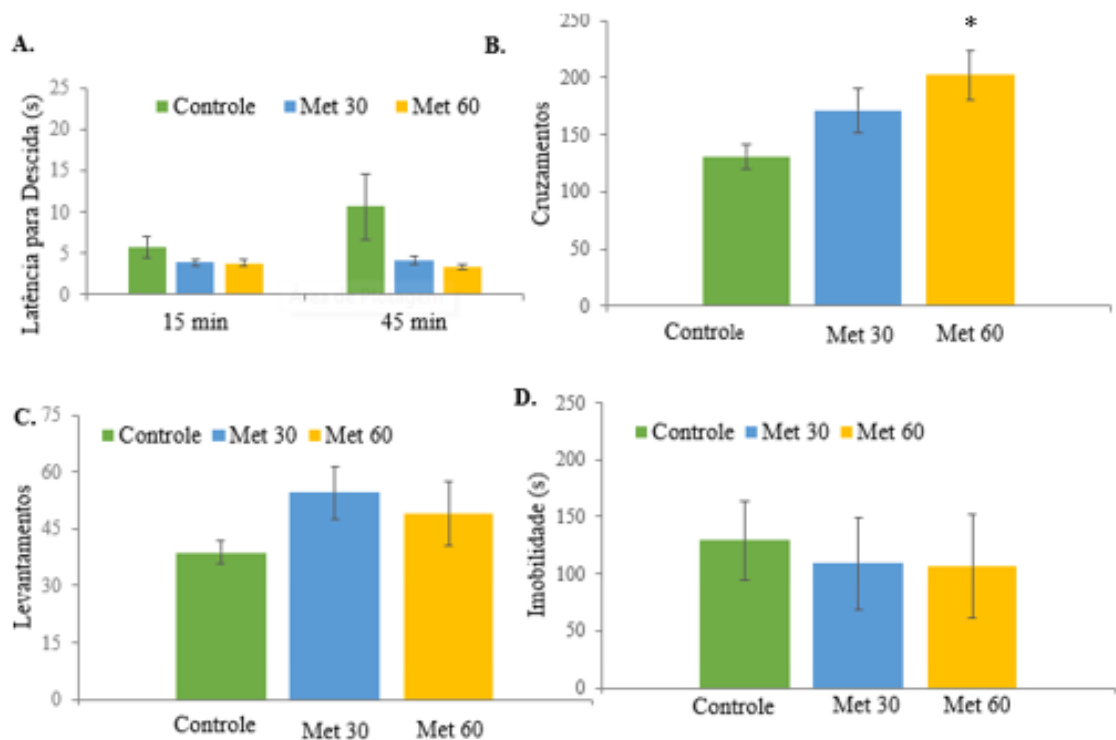


Figura 9. Efeitos sobre o controle motor em fêmeas proestro/estro tratadas com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. Média ± EPM. ANOVA de uma via. n = 13-17 por grupo. *, diferente do grupo controle.

4.3 Fêmeas Metaastro/Diestro

A Figura 10 apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (Met 30; n = 12) e 60 mg/kg (Met 60; n = 12) e veículo (Controle; n = 13) sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas em metaastro/diestro. Na Figura 10A estão representados os tempos médios de congelamento por blocos de 2 min durante o início e final da sessão Treino e durante o Teste e o Reteste. Para o Treino, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco (Início × Fim; $F_{1,34} = 304,06$; $p < 0,05$), e interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{2,34} = 4,01$; $p < 0,05$), mas não para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,34} = 2,88$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou aumento do congelamento ao final do treino em relação ao congelamento observado antes da apresentação dos choques para todos os grupos ($p < 0,05$). Para o Teste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,136} = 4,45$; $p < 0,05$), mas não para tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,34} = 0,71$; $p > 0,05$), ou interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,136} = 0,68$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou diferença no bloco 2 em relação aos blocos 1, 4 e 5 ($p < 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,34} = 8,00$; $p < 0,05$), mas não para o fator bloco ($B_1 \times B_2 \times B_3 \times B_4 \times B_5$; $F_{4,136} = 0,68$; $p > 0,05$), ou para interação entre os fatores (tratamento × bloco; $F_{8,136} = 0,48$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou que Met 60 apresentou maior congelamento que o grupo controle ($p < 0,05$).

Na Figura 10B podem ser observados os tempos totais médios de congelamento dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e submetidos ao Teste e Reteste, realizados 24 e 48 h após a sessão Treino. O tempo de congelamento das fêmeas em metaastro/diestro nestas sessões foi submetida à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que revelou efeito significativo para a interação entre os fatores (tratamento × sessão; $F_{2,34} = 7,64$; $p < 0,05$), mas não para o fator sessão (Teste × Reteste; $F_{1,34} = 1,23$; $p > 0,05$), ou fator tratamento (Controle × Met 30 × Met 60; $F_{2,34} = 2,84$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou

menor congelamento do grupo controle no reteste em relação ao teste ($p < 0,05$) e maior congelamento do grupo Met 60 no reteste em relação ao grupo controle no reteste ($p < 0,05$).

Submetemos, também, os dados do Teste e do Reteste a ANOVAs de uma via de forma independente. Para o Teste, a ANOVA não revelou efeito significativo para tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,34} = 0,7$; $p > 0,05$). Para o Reteste, a ANOVA indicou efeito significativo para tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,34} = 8,0$; $p < 0,05$). O teste post hoc de Tukey indicou aumento significativo do congelamento do grupo Met 60 no reteste em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Na Figura 10C podem ser observados os índices de retenção da extinção dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 mg/kg (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o fator tratamento (Controle \times Met 30 \times Met 60; $F_{2,34} = 5,92$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou menor retenção da extinção para o grupo Met 60 em relação tanto ao grupo controle quanto ao grupo Met 30 ($p < 0,05$).

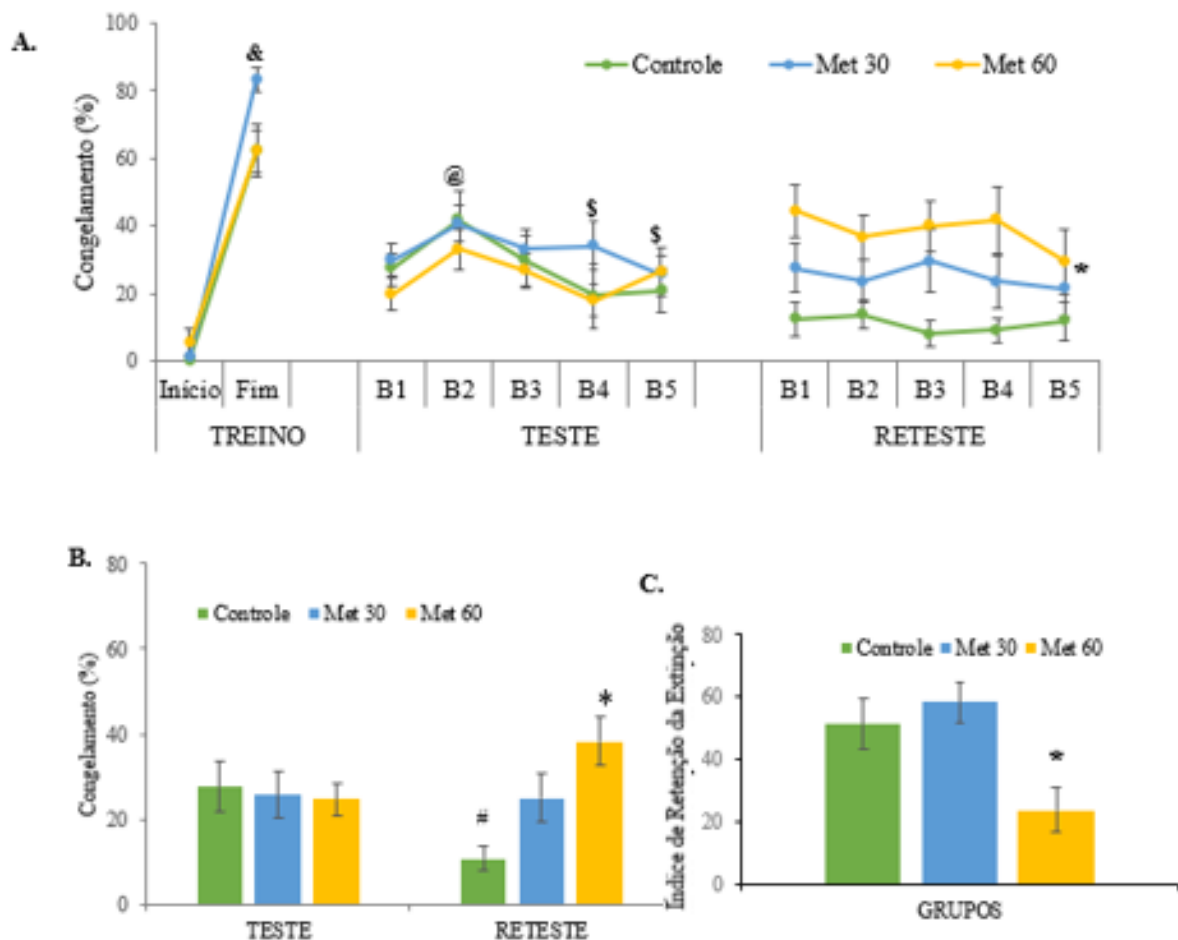


Figura 10. Efeitos da administração de metirapona sobre a expressão e extinção da resposta de congelamento no medo condicionado ao contexto em fêmeas metaestro/diestro. (A) Tempo médio de congelamento, nos dois minutos de duração de cada um dos blocos de cada sessão, treino, teste e reteste. (B) Tempo médio de congelamento dos animais tratados com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle) durante todo o Teste e Reteste. (C) FEI - Índice de retenção da extinção do medo condicionado dos mesmos animais (% congelamento exibido durante a porção final da sessão treino - % congelamento exibido durante a sessão de reteste). Média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. n = 12-13 por grupo. &, diferente do início do treino. @, diferente de B1; \$, diferente de B2; *, diferente do grupo controle; #, diferente do controle no teste.

A Figura 11A apresenta os efeitos da administração de metirapona 30 mg/kg (Met 30; n = 14) e 60 mg/kg (Met 60; n = 14) e veículo (Controle; n = 15) sobre a latência para descer da barra no teste de Catalepsia em fêmeas em metaestro/diestro. Nela, estão contidas as médias do tempo, em segundos, dos grupos tratados com veículo (Controle) ou metirapona nas doses de 30 (Met 30) ou 60 mg/kg (Met 60) e submetidos ao teste 15 e 45 min após a administração das drogas. As médias da latência para descer da barra dos animais nestas sessões foram submetidas à ANOVA de duas vias com medidas repetidas que não revelou efeito significativo para o fator tratamento (Controle \times Met

30 × Met 60; $F_{2,40} = 1,95$; $p > 0,05$) ou fator tempo (15 × 45 min; $F_{1,40} = 0,04$; $p > 0,05$). Assim como, não houve interação significativa entre os fatores (tratamento × tempo; $F_{2,40} = 0,68$; $p > 0,05$).

As Figuras 11B,C e D apresentam os efeitos motores da administração de metirapona no teste de Campo Aberto nas fêmeas metaestro/diestro dos grupos tratados com veículo (n= 15) ou metirapona nas doses de 30 mg/kg (n= 14) ou 60 mg/kg (n=14), com 20 minutos de duração. Na Figura 11B, podem ser observadas as médias do número de cruzamentos totais. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,40} = 10,58$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Tukey indicou que o grupo Met 30 e Met 60 apresentou número de cruzamentos totais superior ao grupo controle ($p < 0,05$). Na Figura 11C, são apresentadas as médias do número de levantamentos. A ANOVA de uma via não indicou efeito significativo para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,40} = 2,19$; $p > 0,05$). Na Figura 11D, são apresentadas as médias de tempo, em segundos, de imobilidade. A ANOVA de uma via também não apontou diferença estatística para os tratamentos (Controle × Met 30× Met 60; $F_{2,40} = 0,67$; $p > 0,05$).

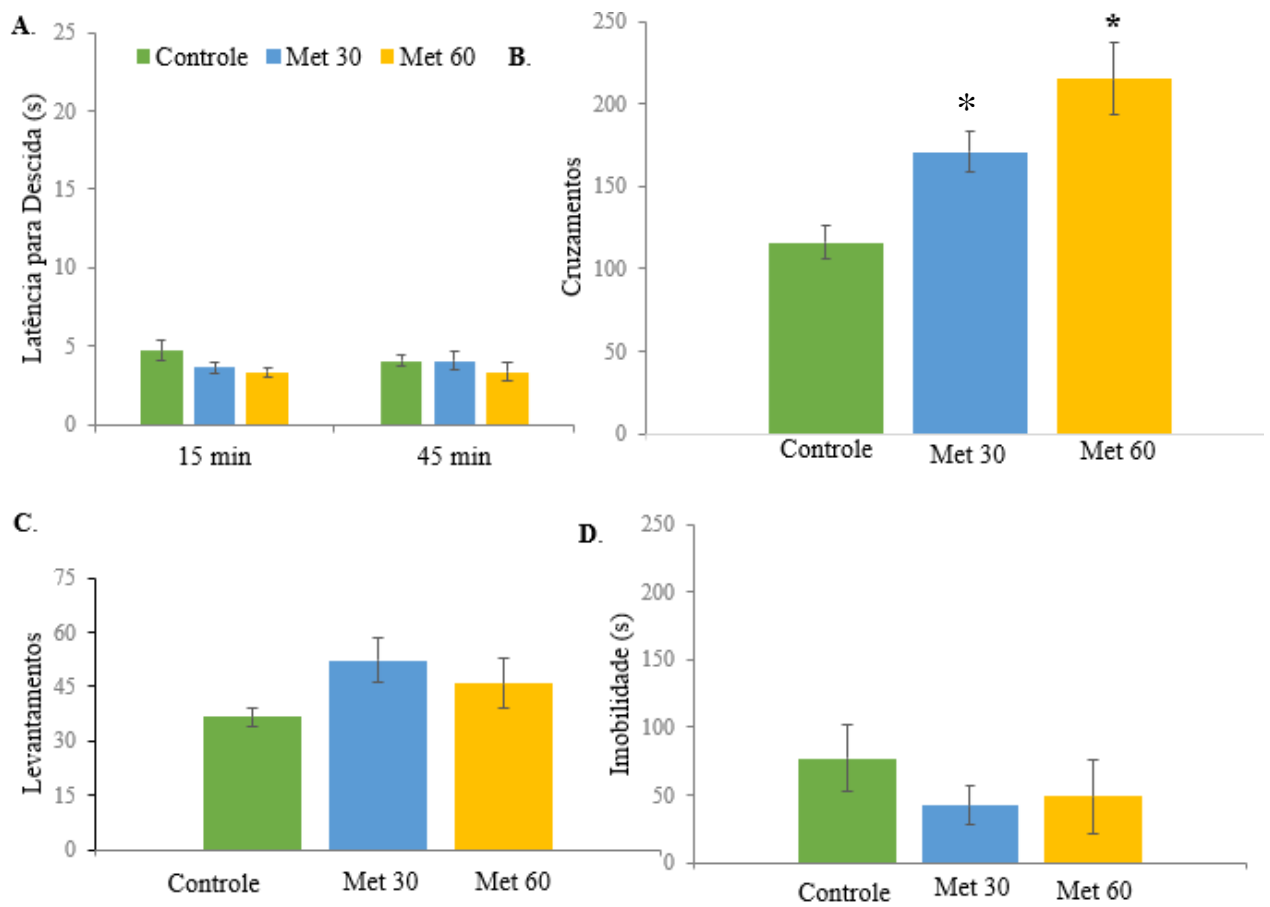


Figura 11. Efeitos sobre o controle motor em fêmeas em metaestro/diestro tratadas com metirapona nas doses 30 e 60 mg/kg ou veículo (Controle). (A) Média da latência para descida da barra no teste de catalepsia realizado 15 e 45 min após a administração das drogas. (B) Número total de cruzamentos. (C) Número de levantamentos. (D) Tempo de Imobilidade de machos submetidos ao teste do Campo Aberto 20 min após a administração das drogas. Média \pm EPM. ANOVA de uma via. n = 13-17 por grupo. *, diferente do grupo controle.

5. DISCUSSÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a participação da corticosterona na resposta condicionada de congelamento em machos e em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Para isso, nossos objetivos específicos envolviam: a reprodução dos achados acerca dos efeitos da metirapona na diminuição da expressão do congelamento condicionado em machos; a avaliação dos efeitos da metirapona na expressão e extinção da resposta condicionada de congelamento em fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro; além de verificar se a metirapona seria capaz de alterar a resposta condicionada de congelamento sem afetar os comportamentos motores em machos e em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. De forma geral, o bloqueio da síntese de corticosterona pela metirapona prejudicou a extinção da resposta condicionada de congelamento contextual, tanto em machos quanto em fêmeas. Entretanto, notou-se que a metirapona reduziu a manifestação do medo condicionado somente nos machos. Ademais, nos machos, não foi observado comprometimento motor pela metirapona, conforme indicado pelos testes de catalepsia e campo aberto. Por outro lado, nas fêmeas, a metirapona resultou em elevação da exploração horizontal no campo aberto. Os resultados encontrados apontam para a relevância da corticosterona no condicionamento aversivo contextual, com a participação na expressão do medo condicionado sendo influenciada pelo sexo, enquanto o papel na extinção parece ocorrer de maneira independente do sexo e da fase do ciclo estral.

O protocolo de condicionamento aversivo contextual foi efetivo tanto nos machos quanto nas fêmeas, levando à aquisição, expressão e posterior extinção da resposta condicionada de congelamento. Com relação ao treino, os machos e as fêmeas apresentaram um aumento significativo do congelamento no final da sessão comparado com o início da mesma, sugerindo assim que o estímulo inicialmente neutro (contexto) foi pareado com o estímulo incondicionado (choque) e se tornou um estímulo aversivo condicionado. Em relação ao teste, os machos e as fêmeas congelaram mais no segundo bloco, com o congelamento diminuindo significativamente nos blocos

finais, o que indica expressão do medo seguida por aquisição da extinção. Ou seja, o contexto eliciou respostas condicionadas de caráter defensivo no início do teste e essas respostas foram gradativamente atenuadas ao final do teste quando o estímulo condicionado foi apresentado muitas vezes sem a presença do estímulo incondicionado. Na comparação do teste com reteste, observamos a extinção em machos e em fêmeas do grupo controle, que apresentaram menor congelamento no reteste em comparação com o teste. Visto isso, em relação ao grupo controle, os resultados encontrados para machos e fêmeas no medo condicionado ao contexto estão de acordo com literatura anterior (DE VITA et al., 2021; ALVES et al., 2022), embora os animais deste estudo, de maneira geral, tenham apresentado menos congelamento em comparação aos trabalhos anteriores (ALVES et al., 2022; REIS et al., 2016).

Em relação à metirapona na expressão do congelamento condicionado contextual em fêmeas proestro/estro e metaestro/diestro, não foram observados efeitos significativos no teste, enquanto que nos machos, a metirapona na dose de 60 mg/kg diminuiu o congelamento. Em relação aos machos, esses dados em conjunto confirmam, assim, a hipótese de que a metirapona reduziria a expressão do congelamento condicionado em machos. Literatura anterior mostrou que a metirapona reduziu a resposta de congelamento em machos, apesar da diferença de metodologia utilizada em relação a este trabalho (DE OLIVEIRA et al., 2013; REIS et al., 2016). Sobre isso, um dos estudos utilizou o protocolo de medo condicionado à luz, enquanto o nosso estudo utilizou o protocolo de medo condicionado ao contexto, além disso o grupo controle apresentou congelamento superior no medo condicionado em relação aos animais controle deste trabalho (DE OLIVEIRA et al., 2013). O outro estudo avaliou o medo condicionado ao contexto nos animais por 8 minutos (REIS et al., 2016), enquanto o nosso fez 10 min de avaliação. No entanto, apesar de observamos diminuição da resposta de congelamento do grupo que recebeu metirapona na dose de 60 mg/kg em comparação ao grupo controle em machos, houve ausência de efeito da metirapona no dia do teste em relação às fêmeas. Dessa forma, com relação às fêmeas, a hipótese não se confirmou.

Sobre isso, a literatura tem mostrado distinções entre os cérebros masculinos e femininos.

Não obstante, pesquisas recentes que introduziram o estudo com fêmeas em seus protocolos de testes com fármacos encontraram resultados que corroboram a ideia de que há diferenças sexuais em relação a responsividade à droga, assim como uma responsividade à droga dependente da fase do ciclo estral à qual a fêmea se encontra (LOVICK & ZANGROSSI, 2021). Um exemplo disso é que as diferenças sexuais na resposta à fármacos benzodiazepínicos têm sido demonstradas pela literatura, sendo que os estudos tem apontado que, em geral, o sexo feminino é menos responsivo ao efeito desses fármacos em comparação ao sexo masculino (LOVICK & ZANGROSSI, 2021). Corroborando esses dados, estudo anterior demonstrou através de revisão de literatura que as patologias de caráter neuropsiquiátrico apresentam diferenças sexuais significativas, além de haver evidências de que há distinções sexuais relativas à farmacocinética e à farmacodinâmica de muitas drogas psicoativas (SEEMAN, 2021). Adicionalmente, o estudo aponta que existem evidências de que há distinções sexuais tanto na expressão quanto na atividade das proteínas de transporte, além de uma função modeladora dos hormônios gonadais (DALLA et al., 2022). Dessa forma, esses resultados se relacionam com o meu trabalho uma vez que nos machos a metirapona reduziu a expressão do congelamento condicionado e nas fêmeas não teve efeito significativo, enquanto que no Teste do Campo Aberto a metirapona aumentou consideravelmente os cruzamentos totais somente nas fêmeas. Com isso, é possível que as diferenças sexuais em relação a responsividade à droga - abordada por literatura anterior - possa auxiliar na justificativa desses efeitos diferenciais da metirapona encontrados neste trabalho. Embora tanto as fêmeas em proestro/estro quanto fêmeas em metaestro diestro tenham obtido comportamento semelhante com a administração de metirapona.

Já em relação aos efeitos da metirapona na extinção, foi observado um prejuízo na extinção tanto em machos quanto em fêmeas. No reteste, os animais tratados com metirapona no teste não extinguiram, e os machos e as fêmeas em metaestro/diestro apresentaram aumento significativo do congelamento quando foi administrada metirapona nas doses de 30 e 60 mg/kg, respectivamente. Com isso, os dados sugerem que a metirapona possivelmente prejudica a extinção, e que os efeitos são mais importantes em machos e fêmeas em metaestro/diestro. Esses achados

corroboram estudo anterior que demonstrou que tanto a dose de 25 mg/kg quanto de 50 mg/kg de metirapona prejudicou a retenção da extinção em machos Sprague-Dawley no teste de labirinto aquático, enquanto que somente a dose maior prejudicou a aquisição no mesmo teste (ROOZENDAAL et al., 1996). Nessa mesma perspectiva, outro estudo mostrou que a injeção subcutânea de metirapona bloqueou a extinção do medo condicionado em machos Sprague-Dawley quando administrada 90 minutos antes do treinamento de extinção (YANG et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a dose de 50 mg/kg de metirapona não afetou o desempenho no teste, mas facilitou efetivamente a recuperação subsequente do comportamento extinto (BARRETT & GONZALEZ-LIMA, 2004). Ademais, outro estudo revelou que a administração de metirapona na dose de 75 mg/kg, realizada 90 minutos antes do primeiro teste de condicionamento de medo contextual ou ao som, resultou em diminuição do congelamento dos animais no teste. No entanto, esse efeito não se manteve em um teste seguinte, quando a resposta condicionada foi novamente expressa (CAREAGA et al., 2015).

Estudo anterior demonstrou, adicionalmente, que a injeção subcutânea de metirapona quando administrada 90 minutos antes do treino induziu a redução da expressão do medo condicionado ao contexto em machos (CORDERO et al., 2002). Dessa forma, como a literatura mostra que a metirapona poderia afetar não somente a extinção mas também a aprendizagem durante o treino, podemos entender que o efeito observado na extinção neste trabalho poderia ser um efeito de prejuízo de aprendizagem mais amplo.

Em relação aos protocolos de catalepsia e campo aberto utilizados, os resultados obtidos para os grupos controle estão de acordo com estudos anteriores realizados com machos e fêmeas (DE OLIVEIRA et al., 2006, DE SOUZA CAETANO, 2013; COLOMBO et al., 2013; BARROCA et al., 2019, ALVES et al., 2022; DE VITA et al., 2021). A metirapona não induziu catalepsia tanto nos machos quanto nas fêmeas proestro/estro e metaestro/diestro, confirmando assim a nossa hipótese. Estudo anterior mostrou que injeção intraperitoneal de corticosterona não afetou os resultados do teste de catalepsia de roedores machos (BARROCA et al., 2019), sugerindo que a corticosterona não possui relação direta com o comportamento de catalepsia. No campo aberto, a metirapona não induziu

comprometimento motor nos machos e não afetou o tempo de imobilidade ou o número de levantamentos nas fêmeas. No que tange aos resultados dos grupos que receberam metirapona, estudo anterior observou que o controle motor de machos não é afetado pela metirapona (MIKICS et al., 2005). Já em relação ao número de cruzamentos totais das fêmeas, observamos uma maior quantidade de cruzamentos tanto nas fêmeas proestro/estro quanto nas fêmeas em metaestro/diestro que receberam metirapona 60 mg/kg em relação ao grupo controle. Isso pode indicar uma possível interação entre metirapona e hormônios sexuais. Diante dos resultados obtidos cabe o questionamento de que a ausência de efeito da metirapona na expressão do congelamento condicionado em fêmeas - diferentemente dos machos - pode estar relacionada com o efeito motor, uma vez que a metirapona provocou aumento no número de cruzamentos totais no teste do campo aberto diferentemente dos machos. Neste trabalho, observamos que a metirapona não teve efeito significativo na expressão do congelamento condicionado nas fêmeas, por outro lado, a droga elevou os cruzamentos totais das fêmeas no controle motor. Com isso, cabe considerar o potencial impacto da metirapona no aumento da locomoção sobre o congelamento em fêmeas. Com relação às fêmeas, estudo anterior observou que as fêmeas são mais ativas em comparação aos machos, os pesquisadores observaram maior atividade ambulante e de elevação no teste do campo aberto (ARCHER, 1975; BEATTY & FESSLER, 1976; BLIZARD, 1975; MASUR et al, 1980).

Existem variações observadas em estudos sobre o medo condicionado ao contexto, sugerindo diferenças sexuais e hormonais. No entanto, os distintos resultados encontrados nos estudos podem ser atribuídos às diversas abordagens utilizadas durante a condução dos experimentos. Sobre isso, alguns artigos apontam que machos foram mais bem sucedidos na aquisição do medo em comparação às fêmeas (GUPTA et al. 2001; WILTGEN et al. 2001). Enquanto que outros artigos indicam que não existem diferenças sexuais entre machos e fêmeas no medo condicionado ao contexto (WILTGEN et al. 2005; ALVES et al., 2022). Cabe ressaltar que no protocolo do medo condicionado ao contexto, as fêmeas podem ser condicionadas em uma fase do ciclo em um dia e passarem pelo teste no dia seguinte em fase do ciclo estral distinta da do dia de aquisição do

comportamento, dessa forma, é possível que o ciclo estral afete o desempenho no medo condicionado (LOVICK & ZANGROSSI, 2021).

No que tange ao comportamento de recordação da extinção, estudo anterior observou que há diferenças na comparação entre machos e fêmeas Sprague-Dawley quando se leva em consideração a fase do ciclo estral (MILAD et al., 2009). Sobre isso, as fêmeas que passaram pelo aprendizado da extinção na fase de metaestro manifestaram concentrações mais elevadas de congelamento ao longo do teste em comparação aos machos (MILAD et al., 2009). Além disso, as injeções de estradiol e progesterona quando administradas em conjunto antes do aprendizado de extinção de fêmeas em metaestro facilitou a consolidação da extinção, assim como o bloqueio dos receptores de estradiol e progesterona em fêmeas em proestro prejudicou a consolidação da extinção (MILAD et al., 2009). Nesse sentido, literatura anterior mostrou que a administração de estradiol auxilia na extinção do medo condicionado contextual (CHANG et al., 2009). Esses dados em conjunto sugerem que há interação entre os hormônios gonadais e o comportamento de extinção, sendo o estradiol e/ou a progesterona facilitadores da extinção.

Outra variável que pode interferir nos resultados das fêmeas diz respeito ao possível estresse provocado pela manipulação dos animais. Sobre isso, estudo anterior mostrou que o manuseio das fêmeas no momento de coletar amostras para verificar o ciclo estral pode ser um fator de estresse que pode provocar aumento da corticosterona plasmática com déficits associados na memória espacial (BECEGATO et al., 2021). Esses resultados se relacionam com o meu trabalho uma vez que cabe considerar que a manipulação das fêmeas pode ter elevado suas concentrações de corticosterona plasmática afetando tanto a ação da metirapona sobre a expressão do congelamento condicionado quanto o número de cruzamentos totais no controle motor. Enquanto que nos machos, a manipulação dos animais possivelmente não teve o mesmo efeito sobre as concentrações de corticosterona, agindo como um controle para essa variável.

Anteriormente, abordamos a questão da oscilação do estradiol e da progesterona ao longo das fases do ciclo estral. Sobre isso, estudo anterior constatou que os valores basais de corticosterona

sofreram oscilação conforme a fase do ciclo estral apresentando concentração mais baixa no estro e mais elevada no proestro (ATKINSON & WADDEL, 1997). Dessa forma, uma vez que o proestro possui um perfil hormonal que se altera rapidamente, o horário em que os experimentos comportamentais são realizados ao longo do dia pode ser uma possível fonte de variabilidade (LOVICK & ZANGROSSI, 2021). Diante da diferença hormonal do estradiol, progesterona e corticosterona observados no proestro e estro, cabe o questionamento se seria adequado unir em um mesmo grupo fêmeas em proestro e estro, uma vez que em proestro ocorreria maior concentração hormonal enquanto no estro seria o contrário. Diante disso, realizamos as análises de fêmeas em proestro e estro separadamente e não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, o que significa que a diferença hormonal provavelmente não está interferindo nos resultados.

Finalmente, algumas limitações e desdobramentos do presente trabalho devem ser considerados. Por exemplo, a realização de estudos com choques mais intensos nos roedores poderia trazer novos resultados sobre os efeitos da metirapona na expressão do medo condicionado. Na mesma direção, a manutenção da intensidade dos choques com exploração dos efeitos da administração de corticosterona pode ser interessante. A realização da administração da metirapona em outros momentos do protocolo de medo condicionado pode aumentar o entendimento sobre o papel da corticosterona na aquisição e consolidação do medo; assim como a utilização de protocolo de medo condicionado a estímulo explícito para explorar o potencial de generalização e/ou especificidade dos presentes achados. Estudos futuros poderiam, ainda, realizar a quantificação hormonal direta tanto da corticosterona quanto dos hormônios sexuais. Também seria interessante explorar o envolvimento da amígdala basolateral, assim como de outras estruturas relevantes para os mecanismos subjacentes ao medo e ansiedade.

6. CONCLUSÕES

De maneira geral, o bloqueio da síntese de corticosterona com metirapona diminuiu a expressão do medo condicionado apenas em machos. Por outro lado, a metirapona prejudicou a extinção da resposta condicionada de congelamento contextual em machos e fêmeas. Adicionalmente, a metirapona não produziu comprometimento motor em machos, conforme avaliado pelos testes de catalepsia e campo aberto. Já nas fêmeas, a metirapona aumentou a exploração horizontal no campo aberto. Esses resultados sugerem a importância da corticosterona para o condicionamento aversivo contextual, com envolvimento na expressão do medo condicionado sendo sexo-dependente, ao passo que o papel na extinção ocorrendo de forma independente do sexo e da fase do ciclo estral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHET-SOUZA, L. et al. Midazolam reduces the selective activation of the rhinal cortex by contextual fear stimuli. *Behavioural Brain Research*, v. 216, n. 2, p. 631–638, 20 jan. 2011.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. D1-like receptors in the nucleus accumbens shell regulate the expression of contextual fear conditioning and activity of the anterior cingulate cortex in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 16, n. 5, p. 1045–1057, 1 jun. 2013.
- ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; NEILL EPPERSON, C. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 35, n. 3, p. 320–330, ago. 2014.
- ALVES, C.O.; REIMER, A.; RIBEIRO, A.R. Involvement of D2-like dopaminergic receptors in contextual fear conditioning in female rats: influence of estrous cycle. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 28 nov. 2022.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ANDRADE, A. et al. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002.
- ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral Biology*, v. 14, n. 4, p. 451–479, ago. 1975.
- ATKINSON, H. C.; WADDELL, B. J. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle*. *Endocrinology*, v. 138, n. 9, p. 3842–3848, 1 set. 1997.
- BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 35, n. 3, p. 303–319, ago. 2014.
- BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 35, n. 3, p. 303–319, ago. 2014.
- BARAN, S. E. et al. Chronic stress and sex differences on the recall of fear conditioning and extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 91, n. 3, p. 323–332, mar. 2009.
- BARROCA, N. C. B. et al. Influence of aversive stimulation on haloperidol-induced catalepsy in rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 30, n. 2 and 3, p. 229–238, abr. 2019.
- BARRETT, D.; GONZALEZ-LIMA, F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. *Neuroscience Letters*, v. 371, n. 2-3, p. 91–96, nov. 2004.
- BEATTY, W. W.; FESSLER, R. G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 16, n. 4, p. 413–417, abr. 1976.
- BECEGATO, M. et al. Impaired discriminative avoidance and increased plasma corticosterone levels induced by vaginal lavage procedure in rats. v. 232, p. 113343–113343, 1 abr. 2021.
- BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, v. 7, n. 1, 26 jul. 2016.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 3, p. 565–572, jan. 2011.

- BLANCHARD, D. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 3, p. 205–218, maio 2001.
- BLANCHARD, D. C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 4, p. 991–998, mar. 2011.
- BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology* (Washington, D.C.: 1983), v. 100, n. 2, p. 101–107, 1 jun. 1986.
- BLIZARD, D. A.; LIPPMAN, H. ROBERT.; CHEN, J. J. Sex differences in open-field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiology & Behavior*, v. 14, n. 5, p. 601–608, maio 1975.
- BOLEA-ALAMANAC, B. et al. Female psychopharmacology matters! Towards a sex-specific psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, v. 32, n. 2, p. 125–133, fev. 2018.
- BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning & Behavior*, v. 4, n. 1, p. 6–8, mar. 1976.
- BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Medicine*, v. 9, n. 1, 26 jul. 2011.
- BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. Allopregnanolone and suppressed hypothalamo–pituitary–adrenal axis stress responses in late pregnancy in the rat. *Stress*, v. 14, n. 1, p. 6–12, 28 jul. 2010.
- 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.
- CALDIROLI, A. et al. Augmentative Pharmacological Strategies in Treatment-Resistant Major Depression: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 13070–13070, 2 dez. 2021.
- CALVO, N. et al. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. *Brain Research*, v. 800, n. 2, p. 227–235, ago. 1998.
- CAREAGA, M. et al. Pre-test metyrapone impairs memory recall in fear conditioning tasks: lack of interaction with β -adrenergic activity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 9, 3 mar. 2015.
- CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Research*, v. 858, n. 2, p. 440–445, mar. 2000.
- CECCATO, F. et al. Metyrapone treatment in Cushing’s syndrome: a real-life study. *Endocrine*, v. 62, n. 3, p. 701–711, 16 jul. 2018.
- 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, nov. 2009.
- COLOMBO, A. C. et al. Dopaminergic mechanisms underlying catalepsy, fear and anxiety: Do they interact? *Behavioural Brain Research*, v. 257, p. 201–207, nov. 2013.
- COLUCCIA, D. et al. Glucocorticoid Therapy-Induced Memory Deficits: Acute versus Chronic Effects. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 13, p. 3474–3478, 26 mar. 2008.
- CORDERO, M. I. et al. Glucocorticoid Involvement in Memory Formation in a Rat Model for Traumatic Memory. *Stress*, v. 5, n. 1, p. 73–79, jan. 2002.
- COSSIO, R. et al. Sex differences and estrous cycle effects on foreground contextual fear

- conditioning. *Physiology & Behavior*, v. 163, p. 305–311, set. 2016.
- CRAWFORD, M.; MASTERSON, F. A. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *The Pavlovian Journal of Biological Science*, v. 17, n. 4, p. 204–214, out. 1982.
- CRITCHLOW, V. et al. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. v. 205, n. 5, p. 807–815, 1 nov. 1963.
- DALLA, C. et al. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? *Neuroscience*, v. 135, n. 3, p. 703–714, 1 jan. 2005.
- DALLA, C. et al. Sex Differences in Blood–Brain Barrier Transport of Psychotropic Drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 23 maio 2022.
- D., C. P.; DARWIN, C.; MAUDSLEY, H. The Expression of Emotions in Man and Animals. *The American Journal of Psychology*, v. 94, n. 1, p. 181, mar. 1981.
- DE JONGH, R. et al. The effects of sex and neonatal maternal separation on fear-potentiated and light-enhanced startle. *Behavioural Brain Research*, v. 161, n. 2, p. 190–196, jun. 2005.
- DE KLOET, E. R. et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease¹. *Endocrine Reviews*, v. 19, n. 3, p. 269–301, jun. 1998.
- RONALD; JOËLS, M. *Stress Research: Past, Present, and Future*. p. 1979–2007, 1 jan. 2013.
- DE LANGE, A.-M. G.; JACOBS, E. G.; GALEA, L. A. M. The scientific body of knowledge: Whose body does it serve? A spotlight on women’s brain health. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 60, p. 100898, jan. 2021.
- RIBEIRO, A. et al. Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. v. 95, n. 1, p. 37–45, 1 jan. 2011.
- DE OLIVEIRA, A. R. et al. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 5, p. 379–389, maio 2013.
- DE OLIVEIRA, A. R. et al. Dopamine D2-like receptors modulate freezing response, but not the activation of HPA axis, during the expression of conditioned fear. *Experimental Brain Research*, v. 235, n. 2, p. 429–436, 1 fev. 2017.
- DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Mineralocorticoid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine efflux in the basolateral amygdala during the expression of conditioned fear. *Psychoneuroendocrinology*, v. 43, p. 114–125, maio 2014.
- DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 84, n. 1, p. 102–111, maio 2006.
- DE QUERVAIN, D. J.-F. . et al. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 30, n. 3, p. 358–370, ago. 2009.
- 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 nov. 2016.
- DE SOUZA CAETANO, K. A.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear. *Behavioural Pharmacology*, v. 24, n. 4, p. 264–274, ago. 2013.
- DEVALL, A. J. et al. Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity

- in female rats. *European Neuropsychopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 113–123, jan. 2015.
- DE VITA, V. M. et al. Dopamine D2 receptors in the expression and extinction of contextual and cued conditioned fear in rats. *Experimental Brain Research*, v. 239, n. 6, p. 1963–1974, 22 abr. 2021.
- DOS SANTOS CORRÊA, M. et al. Corticosterone differentially modulates time-dependent fear generalization following mild or moderate fear conditioning training in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 184, p. 107487, out. 2021.
- EILAM, D. Die hard: A blend of freezing and fleeing as a dynamic defense—implications for the control of defensive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1181–1191, jan. 2005.
- FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin & Review*, v. 1, n. 4, p. 429–438, dez. 1994.
- FELDMAN, S.; WEIDENFELD, J. Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli. *Brain Research*, v. 821, n. 1, p. 33–37, mar. 1999.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 23, n. 5, p. 743–760, maio 1999.
- FRANK, E. et al. Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behavioral Neuroscience*, v. 120, n. 1, p. 60–71, fev. 2006.
- FRYE, C. A.; WALF, A. A. Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 90, n. 1, p. 171–177, jul. 2008.
- GJERSTAD, J. K.; LIGHTMAN, S. L.; SPIGA, F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*, v. 21, n. 5, p. 403–416, 15 maio 2018.
- GOOD, M.; DAY, M.; MUIR, J. L. Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *European Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 12, p. 4476–4480, dez. 1999.
- 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.; LOVICK, T. Withdrawal from progesterone increases expression of $\alpha 4$, $\alpha 1$, and $\alpha 2$ GABAA receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 486, n. 1, p. 89–97, 2005.
- GRILLON, C. Associative learning deficits increase symptoms of anxiety in humans. *Biological Psychiatry*, v. 51, n. 11, p. 851–858, jun. 2002.
- GROENEWEG, F. L. et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 350, n. 2, p. 299–309, mar. 2012.
- GUPTA, R. R. et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. Published on the World Wide Web on 1 December 2000. *Brain Research*, v. 888, n. 2, p. 356–365, jan. 2001.
- HAGENAARS, M. A.; OITZL, M.; ROELOFS, K. Updating freeze: Aligning animal and human

- research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 47, p. 165–176, nov. 2014.
- 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.
- HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behavioural Brain Research*, v. 166, n. 1, p. 93–100, jan. 2006.
- HO, H. The Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Reduces Sex Steroid-Related Aggression in Female Rats An Animal Model of Premenstrual Irritability? *Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 502–510, maio 2001.
- HUNT, P. S.; HESS, M. F.; CAMPBELL, B. A. Inhibition of the expression of conditioned cardiac responses in the developing rat. *Developmental Psychobiology*, v. 33, n. 3, p. 221–233, nov. 1998.
- IWATA, J.; CHIDA, K.; LEDOUX, J. E. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Research*, v. 418, n. 1, p. 183–188, ago. 1987.
- IWATA J, LEDOUX JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behavior. Neuroscience*. v.102, p. 66–76. 1988.
- JELLEN, P.; SOLTYSIK, S.; ZAGRODZKA, J. 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behavioural Brain Research*, v. 141, n. 1, p. 63–72, abr. 2003.
- JOËLS, M.; KARST, H.; SARABDJITSINGH, R. A. The stressed brain of humans and rodents. *Acta Physiologica*, v. 223, n. 2, p. e13066, 16 abr. 2018.
- KALIN, N.; SHELTON, S. Defensive behaviors in infant rhesus monkeys: environmental cues and neurochemical regulation. *Science*, v. 243, n. 4899, p. 1718–1721, 31 mar. 1989.
- KALSBECK, A. et al. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 349, n. 1, p. 20–29, fev. 2012.
- KARACA, Z.; GROSSMAN, A.; KELESTIMUR, F. Investigation of the Hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis: a contemporary synthesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 22, n. 2, p. 179–204, 26 mar. 2021.
- KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 7-8, p. 669–678, dez. 2001.
- KEISER, A. A. et al. Sex Differences in Context Fear Generalization and Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 2, p. 397–407, 1 jan. 2017.
- KELLER-WOOD, M. ACTH responses to hypotension and feedback inhibition of ACTH increased by chronic progesterone treatment. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 274, n. 1, p. R81–R87, 1 jan. 1998.
- KELLER-WOOD, M. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis—Feedback Control. *Comprehensive Physiology*, v. 5, n. 3, p. 1161–1182, 24 jun. 2015.
- KIM, W. B.; CHO, J.-H. Encoding of contextual fear memory in hippocampal–amygdala circuit. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1382, 13 mar. 2020.
- KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27, n. suppl 2, p. s43–s50, out. 2005.

- KISHI, T. et al. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: A combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 496, n. 3, p. 349–368, 2006.
- KLOK, M. D. et al. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, v. 45, n. 7, p. 871–878, jul. 2011.
- KOKRAS, N. et al. Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: An obstacle to antidepressant drug development? *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 21, p. 4090–
- KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 20, p. 4595–4619, 1 jul. 2014.
- KOKRAS, N. et al. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 436–445, 1 jan. 2012.
- KOKRAS, N.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 7, n. 2, p. 213–226, 1 fev. 2011.
- NIKOLAOS KOKRAS et al. Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase inhibition in rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 87, p. 93–107, 1 jan. 2018.
- 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, 1 jul. 2022.
- LANG, P. J.; DAVIS, M. Emotion, motivation, and the brain: Reflex foundations in animal and human research. *Understanding Emotions*, p. 3–29, 2006.
- LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 5 fev. 2014.
- LOJOWSKA, M. et al. Freezing promotes perception of coarse visual features. *Journal of Experimental Psychology: General*, v. 144, n. 6, p. 1080–1088, dez. 2015.
- LOVICK, T. A. Sex determinants of experimental panic attacks. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 46, p. 465–471, out. 2014.
- 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.
- MACHADO FIGUEIREDO, R. et al. Short-term, low-dose fluoxetine prevents oestrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *Journal of Psychopharmacology*, v. 33, n. 5, p. 548–557, 23 abr. 2019.
- MAENG, L. Y. et al. Protocol for Studying Extinction of Conditioned Fear in Naturally Cycling Female Rats. *Journal of Visualized Experiments*, n. 96, 23 fev. 2015.
- MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and Behavior*, v. 76, p. 106–117, nov. 2015.
- MAHMOUD, R. et al. Ovarian hormones, but not fluoxetine, impart resilience within a chronic unpredictable stress model in middle-aged female rats. *Neuropharmacology*, v. 107, p. 278–293, ago. 2016.
- MAREN, S. Neurotoxic Basolateral Amygdala Lesions Impair Learning and Memory But Not the Performance of Conditional Fear in Rats. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 19, p. 8696–8703, 1 out. 1999.

- 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, out. 1994.
- MARIN, M.-F. et al. Metyrapone Administration Reduces the Strength of an Emotional Memory Trace in a Long-Lasting Manner. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 96, n. 8, p. E1221–E1227, ago. 2011.
- MARKS, W. N. et al. The effect of chronic corticosterone on fear learning and memory depends on dose and the testing protocol. *Neuroscience*, v. 289, p. 324–333, 19 mar. 2015.
- MARROCCO, J.; MCEWEN, B. Sex in the brain: hormones and sex differences. *Sex Differences*, v. 18, n. 4, p. 373–383, dez. 2016.
- MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Developmental Psychobiology*, v. 13, n. 2, p. 107–110, mar. 1980.
- MCALLISTER-WILLIAMS, R. H. et al. Antidepressant augmentation with metyrapone for treatment-resistant depression (the ADD study): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Psychiatry*, v. 3, n. 2, p. 117–127, fev. 2016.
- MCEWEN, B. S. Glucocorticoid-biogenic amine interactions in relation to mood and behavior.
- MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annual Review of Medicine*, v. 62, n. 1, p. 431–445, 18 fev. 2011.
- MCEWEN, B. Estrogen Actions Throughout the Brain. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 57, n. 1, p. 357–384, 1 jan. 2002.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 3, p. 285–305, maio 2004.
- MIKICS, É. et al. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Hormones and Behavior*, v. 48, n. 2, p. 152–162, ago. 2005.
- MILAD, M. R. et al. Fear conditioning and extinction: Influence of sex and menstrual cycle in healthy humans. *Behavioral Neuroscience*, v. 120, n. 6, p. 1196–1203, 2006.
- MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annual Review of Psychology*, v. 63, n. 1, p. 129–151, 10 jan. 2012.
- MILAD, M. R. et al. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, v. 164, n. 3, p. 887–895, dez. 2009.
- MORIMOTO, M. et al. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. v. 26, n. 3, p. 235–269, 1 nov. 1996.
- MURPHY, D. D. et al. Estradiol Increases Dendritic Spine Density by Reducing GABA Neurotransmission in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 7, p. 2550–2559, 1 abr. 1998.
- NEUMANN et al. Brain Oxytocin Inhibits Basal and Stress-Induced Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Male and Female Rats: Partial Action Within the Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 12, n. 3, p. 235–243, 24 dez. 2001.
- ÖHMAN, A.; MINEKA, S. Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. *Psychological review*, v. 108, n. 3, p. 483, 2001.

- OYOLA, M. G.; HANDA, R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 20, n. 5, p. 476–494, 2017.
- PANAGIOTAKOPOULOS, L.; NEIGH, G. N. Development of the HPA axis: Where and when do sex differences manifest? *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 35, n. 3, p. 285–302, ago. 2014.
- PATCHEV, V. The Neurosteroid Tetrahydroprogesterone Attenuates the Endocrine Response to Stress and Exerts Glucocorticoid-like Effects on Vasopressin Gene Transcription in the Rat Hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 6, p. 533–540, dez. 1996.
- PAVLOV, I. P. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford University Press, 1927.
- PETTERSSON, R.; HAGSÄTER, S. M.; ERIKSSON, E. Serotonin depletion eliminates sex differences with respect to context-conditioned immobility in rat. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 8, p. 1513–1521, 1 abr. 2016.
- PEZZE, M.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*, v. 74, n. 5, p. 301–320, dez. 2004.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, v. 106, n. 2, p. 274–285, 1 abr. 1992.
- POOLEY, A. E. et al. Sex differences in the traumatic stress response: the role of adult gonadal hormones. v. 9, n. 1, 13 jul. 2018.
- 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, 1 dez. 1999.
- PRENDERGAST, B. J.; ONISHI, K. G.; ZUCKER, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 40, p. 1–5, 1 mar. 2014.
- PROTOPODESCU, X. et al. Orbitofrontal cortex activity related to emotional processing changes across the menstrual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 44, p. 16060–16065, 24 out. 2005.
- RAINVILLE, J. R. et al. Membrane-initiated nuclear trafficking of the glucocorticoid receptor in hypothalamic neurons. *Steroids*, v. 142, p. 55–64, fev. 2019.
- REIMER, A. E. et al. Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. *Neuropharmacology*, v. 131, p. 104–115, mar. 2018.
- REIS, F. M. C. V. et al. Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats. *Cerebral Cortex*, v. 26, n. 6, p. 2639–2649, 13 maio 2015.
- RIVIER, C. Gender, Sex Steroids, Corticotropin-Releasing Factor, Nitric Oxide, and the HPA Response to Stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 64, n. 4, p. 737–751, dez. 1999.
- ROCKS, D.; CHAM, H.; KUNDAKOVIC, M. Why the estrous cycle matters for neuroscience. *Biology of Sex Differences*, v. 13, n. 1, 28 out. 2022.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, v. 32, n. 1, p. 289–313, jun. 2009.

- ROELOFS, K. Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 372, n. 1718, p. 20160206, 19 abr. 2017.
- ROSEN, J. B. The Neurobiology of Conditioned and Unconditioned Fear: A Neurobehavioral System Analysis of the Amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, v. 3, n. 1, p. 23–41, mar. 2004.
- ROSEN, J. B. The Neurobiology of Conditioned and Unconditioned Fear: A Neurobehavioral System Analysis of the Amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, v. 3, n. 1, p. 23–41, mar. 2004.
- ROY, B. N.; REID, R. L.; VAN VUGT, D. A. The Effects of Estrogen and Progesterone on Corticotropin-Releasing Hormone and Arginine Vasopressin Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Paraventricular Nucleus and Supraoptic Nucleus of the Rhesus Monkey. *Endocrinology*, v. 140, n. 5, p. 2191–2198, 1 maio 1999.
- ROOZENDAALL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J. L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology*, v. 21, n. 8, p. 681–693, nov. 1996.
- RYOKE, R.; YAMADA, K.; ICHITANI, Y. Long-term effects of traumatic stress on subsequent contextual fear conditioning in rats. *Physiology & Behavior*, v. 129, p. 30–35, abr. 2014.
- SCHENBERG, L. C.; VASQUEZ, E. C.; DA COSTA, M. B. Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Research*, v. 621, n. 1, p. 50–58, 3 set. 1993.
- SEEMAN, M. V. The Pharmacodynamics of Antipsychotic Drugs in Women and Men. *Frontiers in Psychiatry*, v. 12, 9 abr. 2021.
- SEGAL, M.; MURPHY, D. Estradiol Induces Formation of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons: Functional Correlates. *Hormones and Behavior*, v. 40, n. 2, p. 156–159, set. 2001.
- SEOANE L.M.T.S, DIEGUEZ C. Hypothalamic-pituitary diseases endocrinology. Casanueva F. GE, editor: Springer, Cham; 2018.
- SHANSKY, R. M. Are hormones a “female problem” for animal research?. *Science*, v. 364, n. 6443, p. 825–826, 30 maio 2019.
- SHORS, T. J.; CHUA, C.; FALDUTO, J. Sex Differences and Opposite Effects of Stress on Dendritic Spine Density in the Male Versus Female Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 16, p. 6292–6297, 15 ago. 2001.
- SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy¹². v. 96, n. 1, p. 219–226, 1 jan. 1975.
- SMITH, S. S. et al. Withdrawal from 3 α -OH-5 α -Pregnan-20-One Using a Pseudopregnancy Model Alters the Kinetics of Hippocampal GABAA-Gated Current and Increases the GABAAR Receptor α 4 Subunit in Association with Increased Anxiety. v. 18, n. 14, p. 5275–5284, 15 jul. 1998.
- SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anatomical Record*, v. 254, n. 1, p. 116–126, 1 jan. 1999.
- STEEN, J. B.; GABRIELSEN, G. W.; KANWISHER, J. W. Physiological aspects of freezing behaviour in willow ptarmigan hens. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 134, n. 2, p. 299–304, out. 1988.

- TAKAHASHI, L. K., & RUBIN, W. W. Corticosteroid induction of threat-induced behavioral inhibition in preweanling rats. *Behavioral Neuroscience*, v.107, n. 5, p.860–866. 1993.
- TAYLOR, C. M.; PRITSCHET, L.; JACOBS, E. G. The scientific body of knowledge – Whose body does it serve? A spotlight on oral contraceptives and women’s health factors in neuroimaging. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 60, p. 100874, jan. 2021.
- TOVOTE, P. et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*, v. 534, n. 7606, p. 206–212, jun. 2016.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 6, p. 317–331, jun. 2015.
- VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 9, p. 2505–2512, maio 2005.
- VIAU, V. et al. Gender and Puberty Interact on the Stress-Induced Activation of Parvocellular Neurosecretory Neurons and Corticotropin-Releasing Hormone Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Rat. *Endocrinology*, v. 146, n. 1, p. 137–146, 1 jan. 2005.
- WAKU, I. et al. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *The European Journal of Neuroscience*, v. 53, n. 11, p. 3743–3767, 1 jun. 2021.
- WAKU, I.; REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R. Effects of Immediate Aversive Stimulation on Haloperidol-Induced Catalepsy in Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 11 abr. 2022.
- WALD, C.; WU, C. Of Mice and Women: The Bias in Animal Models. *Science*, v. 327, n. 5973, p. 1571–1572, 26 mar. 2010.
- WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience*, v. 116, n. 3, p. 897–912, fev. 2003.
- WILTGEN, B. J. et al. Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behavioral Neuroscience*, v. 115, n. 1, p. 26–32, 2001.
- WILTGEN, B. J. Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the α subunit of the GABAA receptor. *Learning & Memory*, v. 12, n. 3, p. 327–333, 16 maio 2005.
- WINDLE, R. J. Oxytocin Attenuates Stress-Induced c-fos mRNA Expression in Specific Forebrain Regions Associated with Modulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 12, p. 2974–2982, 24 mar. 2004.
- WINDLE, R. J. et al. Central Oxytocin Administration Reduces Stress-Induced Corticosterone Release and Anxiety Behavior in Rats. *Endocrinology*, v. 138, n. 7, p. 2829–2834, jul. 1997.
- WITTCHEN, H. U. et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, v. 21, n. 9, p. 655–679, set. 2011.
- WOOD, G. E.; BEYLIN, A. V.; SHORS, T. J. The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning males versus females. *Behavioral Neuroscience*, v. 115, n. 1, p. 175–187, 2001.
- WOOLLEY, C. S.; MCEWEN, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 336, n. 2, p. 293–306, 8 out. 1993.

- WU, T.-C. et al. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 6, p. 871–883, jun. 2013.
- XU, C. et al. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*, v. 167, n. 4, p. 961-972.e16, nov. 2016.
- YANG, Y.-L.; CHAO, P.-K.; LU, K.-T. Systemic and Intra-Amygdala Administration of Glucocorticoid Agonist and Antagonist Modulate Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 5, p. 912–924, 5 out. 2005.
- YOUNG, L. J. et al. Estrogen receptor α is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen. *NeuroReport*, v. 9, n. 5, p. 933–936, mar. 1998.
- 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, nov. 2011.
- ZHAO, Y. et al. No effect of sex and estrous cycle on the fear potentiated startle response in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 351, p. 24–33, out. 2018.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA SOBRE O CONGELAMENTO CONDICIONADO EM FÊMEAS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL", protocolada sob o CEUA nº 9367190422 (ID 001656), sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira** e equipe; *Joyce Nonato Chiossi* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 23/05/2022.

We certify that the proposal "EFFECTS OF BLOCKING CORTICOSTERONE SYNTHESIS ON CONDITIONED FREEZING IN FEMALES AT DIFFERENT PHASES OF THE ESTRAL CYCLE", utilizing 135 Heterogenics rats (45 males and 90 females), protocol number CEUA 9367190422 (ID 001656), under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira** and team; *Joyce Nonato Chiossi* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/23/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2022](#) a [06/2024](#)

Área: [Psicologia](#)

Origem:	Biotério Central da UFSCar			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 60 a 90 dias N: 45
Linhagem:	Wistar			Peso: 250 a 300 g
Origem:	Biotério Central da UFSCar			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 60 a 90 dias N: 90
Linhagem:	Wistar			Peso: 230 a 280 g

Local do experimento: [Laboratório de Psicologia da Aprendizagem \(LPA\) - DPsi](#)

São Carlos, 24 de maio de 2022