

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS - CECH**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA - DPsi**

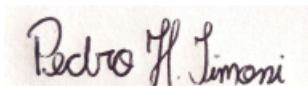
**EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA NOS TESTES DE  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E CAMPO ABERTO EM MACHOS E FÊMEAS  
EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL**

**Pedro Henrique Timossi Busnardo**

SÃO CARLOS  
JANEIRO - 2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS - CECH**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA - DPsi**

**EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA NOS TESTES DE  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E CAMPO ABERTO EM MACHOS E FÊMEAS  
EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL**

A handwritten signature in black ink on a light-colored rectangular background. The signature reads "Pedro H. Timossi" in a cursive script.

**Pedro Henrique Timossi Busnardo**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em  
Psicologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

SÃO CARLOS  
JANEIRO - 2025

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do fornecimento de Bolsa de Iniciação Científica (Processo no. 2023/04688-9). A pesquisa também contou com apoio financeiro da 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 FAPESP.

## Resumo

A corticosterona é um hormônio glicocorticoide relacionado à expressão de respostas de medo/ansiedade em situações de perigo. O bloqueio de sua síntese, com o uso do fármaco metirapona, é capaz de reduzir respostas defensivas incondicionadas em ratos machos. Estudos recentes indicam que, considerando o ciclo estral, as fêmeas por vezes apresentam respostas diferentes dos machos. Diante disso, o presente estudo visou ampliar o conhecimento sobre a participação da corticosterona na expressão do medo incondicionado em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Foram utilizados 111 ratos *Wistar* adultos, sendo 73 fêmeas e 38 machos. Quatorze dias antes do início dos testes, os animais foram habituados ao laboratório, e a fase do ciclo estral das fêmeas foi determinada diariamente. A fase do ciclo exibida no dia do teste foi utilizada para separar as fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro. No dia do teste, os animais do grupo controle receberam uma administração intraperitoneal de veículo, enquanto os animais dos grupos experimentais receberam metirapona nas doses de 30 ou 60 mg/kg. Vinte minutos após a administração, o animal foi colocado no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação comportamental por 5 minutos. Dez minutos depois, o animal foi exposto por 5 minutos ao campo aberto (CA). No LCE, a metirapona diminuiu os levantamentos ao mesmo tempo em que aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos em comparação ao grupo controle nos machos. Nas fêmeas, tanto em proestro/estro quanto em metaestro/diestro, a metirapona diminuiu as entradas nos braços fechados e os levantamentos em comparação ao grupo controle. No CA, a metirapona aumentou os cruzamentos e a permanência no centro nos machos em relação ao grupo controle. Nas fêmeas em proestro/estro, a metirapona aumentou o tempo no centro e os cruzamentos na periferia, enquanto diminuiu a imobilidade. Nas fêmeas em metaestro/diestro, a metirapona aumentou o tempo no centro, enquanto diminuiu os levantamentos e a imobilidade. Os resultados demonstraram uma diminuição das respostas defensivas dos animais tanto no LCE quanto no CA, estabelecendo um claro efeito anti-aversivo, contudo, a metirapona afetou também a exploração geral dos aparelhos.

**Palavras-chave:** Medo Incondicionado, Metirapona, Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.

## Índice de figuras e tabelas

<b>Tabela 1</b>	<b>14</b>
<b>Figura 1</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8</b>	<b>27</b>
<b>Figura 9</b>	<b>29</b>
<b>Figura 10</b>	<b>31</b>

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	7
<b>2. Objetivos</b>	12
<b>3. Material e Métodos</b>	13
3.1. Animais	13
3.2. Determinação das fases do ciclo estral	14
3.3. Drogas	15
3.4. Equipamento	16
3.5. Procedimentos	17
3.6. Delineamento experimental	18
3.7. Análise de dados	18
<b>4. Resultados</b>	20
<b>5. Discussão</b>	32
<b>6. Considerações finais</b>	36
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	37
<b>8. Anexos</b>	40

## 1. Introdução

Medo e ansiedade são estados emocionais associados a comportamentos incondicionados de fuga e/ou esquivas, frente a estímulos aversivos potencialmente letais. Esses comportamentos são chamados de incondicionados pois eles não necessitam de exposição prévia a uma situação de perigo para que sejam aprendidos e/ou expressados, logo, são inatos (BRANDÃO, 2004). Para a teoria evolutiva de Darwin, emoções que protegem a integridade física do animal são responsáveis diretas pela sua sobrevivência e possível sucesso reprodutivo, dando a elas um caráter permanente no arcabouço emocional e comportamental destes animais. De uma forma geral, medo/ansiedade se referem a uma gama de alterações autonômicas, endócrinas e comportamentais que, diante de um estímulo ameaçador, ajudam o animal a sobreviver (FENDT & FANSELOW, 1999; MCNAUGHTON & CORR, 2004).

O medo incondicionado pode ser estudado em laboratório com o auxílio de diversos modelos animais. Ainda que boa parte dos modelos utilizados tenham por princípio avaliar comportamentos de fuga ou esquivas, cada tipo de teste analisa esses comportamentos de maneira distinta, já que eles podem ser mecanicamente semelhantes, como ficar imóvel, mas podem possuir funções diferentes, bem como serem afetados distintamente por fármacos de diferentes classes (PINTO et al., 2012). Dentre os testes de maior utilização está o labirinto em cruz elevado (LCE), onde o animal é colocado em um aparato suspenso, dividido em quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados. No LCE, um menor número de entradas e tempo gasto nos braços abertos são o indicativo de comportamentos incondicionados de medo/ansiedade (LA-VU et al., 2020). O teste do LCE simula um conflito entre aproximação-esquiva, gerado pela segurança que os braços fechados intrinsecamente oferecem aos ratos, permitindo a expressão de comportamento chamado de tigmotaxia,

competindo com o também inato comportamento de exploração desses animais, que os compele a se aproximar, quando menos ansiosos, dos braços abertos (PINTO et al., 2012). Outro teste de medo incondicionado amplamente usado é o teste do campo aberto (CA), onde o animal é colocado no centro de um compartimento circular, sem teto e envolto por paredes, no qual o tempo que o animal fica no centro e na periferia do aparelho é avaliado. Um menor número de cruzamentos e tempo de permanência no centro é avaliado como indicativo de medo incondicionado (VALLE, 1970; LAMPREA et al., 2008).

Diante da exposição a estímulos aversivos, como os testes do LCE e CA, ocorre aumento da concentração plasmática de corticosterona em roedores (RODGERS et al., 1999). A corticosterona é um hormônio esteroide encontrado em roedores, análoga ao cortisol em humanos, que é produzido de maneira cíclica e constante pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (DE KLOET, 2013). Hormônios corticosteroides são liberados com uma frequência constante, seguindo o ritmo circadiano do animal. Contudo, situações estressantes geram aumento da liberação desses hormônios, sobrepujando, mas não cessando, a periodicidade desse ciclo. A atuação dos corticosteroides depende da presença e boa distribuição de corticoreceptores, sendo eles, os glicoreceptores (GRs) e os mineraloreceptores (MRs), que agem no núcleo da célula, regulando a transcrição gênica e alterando a síntese de RNAm e de proteínas de genes específicos (DE KLOET, 2013; REIS et al., 2016). Ambos se diferenciam quanto a sua afinidade e distribuição, sendo que os MRs possuem cerca de dez vezes mais afinidade pelos corticosteroides do que os GRs (JOELS & BARAM, 2009). Os corticoreceptores podem ter funções mais específicas dependendo da região encefálica em que estão localizados, então por exemplo, os MRs no hipocampo são os responsáveis por manterem o fluxo de informação, enquanto os GRs geram uma supressão da excitabilidade neural e da plasticidade sináptica, regulando o feedback negativo pós-estressor (JOELS & BARAM, 2009).

Pelo fato de um estressor representar uma ameaça imediata ou em potencial (JOELS & BARAM, 2009), é necessário que o corpo responda em uma velocidade adequada, sendo esse um dos papéis da corticosterona que está relacionada ao disparo rápido de transmissões sinápticas em diferentes partes do encéfalo, como o hipocampo e a amígdala basolateral. Uma maior velocidade nos disparos é especialmente importante no córtex pré-frontal medial (mPFC), uma região com alta afinidade pela corticosterona e responsável pelas respostas em situações de risco e/ou medo (REIS et al., 2016). Corroborando esse achado, estudos anteriores mostraram que quando a síntese de corticosterona é bloqueada por meio do uso da metirapona, um inibidor da produção endógena de corticosteroides adrenais, houve uma menor resposta de medo incondicionado em ratos machos (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; MIKICS et al., 2005).

Mais recentemente, estudos começaram a observar que roedores fêmeas apresentam diferenças na aquisição e expressão de determinados comportamentos, como os relacionados ao medo/ansiedade, quando comparadas aos machos e especialmente quando analisadas as diferentes fases do ciclo estral (MAENG & MILAD, 2015; GARCIA et al., 2017). Ciclo estral é o nome dado para a rotatividade cíclica do aumento e baixa de hormônios reprodutivos, principalmente estrógeno e progesterona, que roedores fêmeas passam ao longo de sua vida. O ciclo estral dura em torno de 4-5 dias, e é marcado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, cada uma com variações nas concentrações de hormônios gonadais, que atingem seu ápice no proestro e seu mínimo no metaestro (MAENG & MILAD, 2015; BAUER, 2023). Estudos com fêmeas na fase proestro, ou que foram suplementadas com estrogênio, quando comparados com fêmeas em metaestro ou machos, demonstraram menor tempo de congelamento na fase de extinção em testes de medo condicionado, ou seja, o estrogênio tem um forte poder modulador sobre circuitos neurais responsáveis pela resposta de medo (MAENG & MILAD, 2015).

Ademais, comportamentos de medo/ansiedade estão intimamente associados à neurotransmissão dopaminérgica proveniente da área tegmental ventral (ATV). Fato é que a neurotransmissão dopaminérgica não só atua de maneira distinta no medo condicionado e incondicionado, como estudos recentes sugerem até uma atuação oposta, ou seja, maiores níveis de dopamina agindo sobre receptores D2 aumentariam as respostas de medo condicionado ao mesmo tempo que diminuiriam as de medo incondicionado (DE OLIVEIRA et al., 2014a; BRANDÃO et al., 2015). A neurotransmissão dopaminérgica no medo incondicionado é mais atuante no sistema encefálico de aversão, que é composto pela substância cinzenta periaquedutal dorsal, os colículos superiores e inferiores, e o hipotálamo. Boa parte dos achados apontam para uma maior participação dos colículos inferiores nesse papel dual da dopamina no que diz respeito a atuação dela no medo incondicionado, uma vez que nessa região, a inibição de receptores D2 reduziram a capacidade de filtrar estímulos aversivos, eliciando comportamentos de medo/ansiedade em situações de pouco ou nenhum estresse (DE OLIVEIRA et al., 2014a; BRANDÃO et al., 2015). Já projeções dopaminérgicas da ATV para estruturas mais rostrais, como a amígdala, núcleo accumbens e córtex pré-frontal, são ativadas por estímulos aversivos condicionados (BRANDÃO et al., 2015; DE VITA et al., 2021).

Pesquisas anteriores mostraram que o bloqueio da síntese de corticosterona, por meio da administração intraperitoneal da metirapona, reduziu a liberação de dopamina no complexo basolateral da amígdala de roedores machos, além de reduzir a resposta de congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, estudo anterior demonstrou que o bloqueio dos receptores mineralocorticoides, pelos quais a corticosterona possui maior afinidade, realizado de forma local na ATV, reduz a liberação de dopamina na amígdala basolateral e a expressão da resposta de congelamento condicionado (DE OLIVEIRA et al., 2014b). Em conjunto, esses trabalhos indicam uma relação entre a ativação do eixo HPA e a

neurotransmissão dopaminérgica. Ademais, estudo recente demonstrou diferenças na resposta de congelamento condicionado em fêmeas quando foram administrados antagonistas de receptores D2, levando em consideração as fases do ciclo estral (ALVES et al., 2022).

Desta forma, o presente trabalho estudou o envolvimento da corticosterona no medo incondicionado, considerando, além dos machos, as fêmeas e suas particularidades geradas pelo ciclo estral, para melhor examinar a interação entre hormônios sexuais e comportamentos. Esperávamos que o bloqueio da síntese de corticosterona, por meio da administração intraperitoneal de metirapona, reduzisse a expressão de respostas defensivas sem afetar a atividade exploratória geral.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a participação da corticosterona na expressão do medo incondicionado em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Avaliar os efeitos da metirapona, inibidor da síntese de corticosterona, na expressão de comportamentos defensivos incondicionados em ratos machos e fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro.
2. Verificar se a metirapona é capaz de alterar os comportamentos defensivos nos testes do Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto sem afetar o comportamento exploratório geral.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados 111 ratos *Wistar* adultos, 73 fêmeas e 38 machos, sendo que os machos tiveram um peso médio de 350 g e as fêmeas tiveram uma média de peso de 300 g. Todos os animais eram experimentalmente ingênuos. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) do Departamento de Psicologia (DPsi) da UFSCar. Esses animais foram transportados e mantidos em caixas de polipropileno, com dimensões de 41 × 33 × 24 cm, sendo que cada caixa foi forrada com maravalha e acomodou, no máximo, 4 ratos, mantidos com ração e água à livre acesso. O biotério do LPA possui um programa de iluminação artificial, que se manteve em torno de 30 lux, com ciclo claro-escuro 12 h x 12 h com início do período claro às 7:00 h, e temperatura controlada e mantida em cerca de 23°C. Os procedimentos foram realizados apenas na fase clara do ciclo. Os animais foram levados individualmente até a sala de experimentação em caixas também forradas com maravalha, de proporções 12 × 30,5 × 19,5 cm. Os grupos experimentais variaram entre 11 a 14 animais (Tabela 1). O estudo foi realizado visando minimizar o sofrimento dos roedores, a partir dos princípios éticos da experimentação animal. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA, protocolo de número 3078260423, ANEXO A) e seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

**Tabela 1.** Distribuição dos animais por teste e grupo.

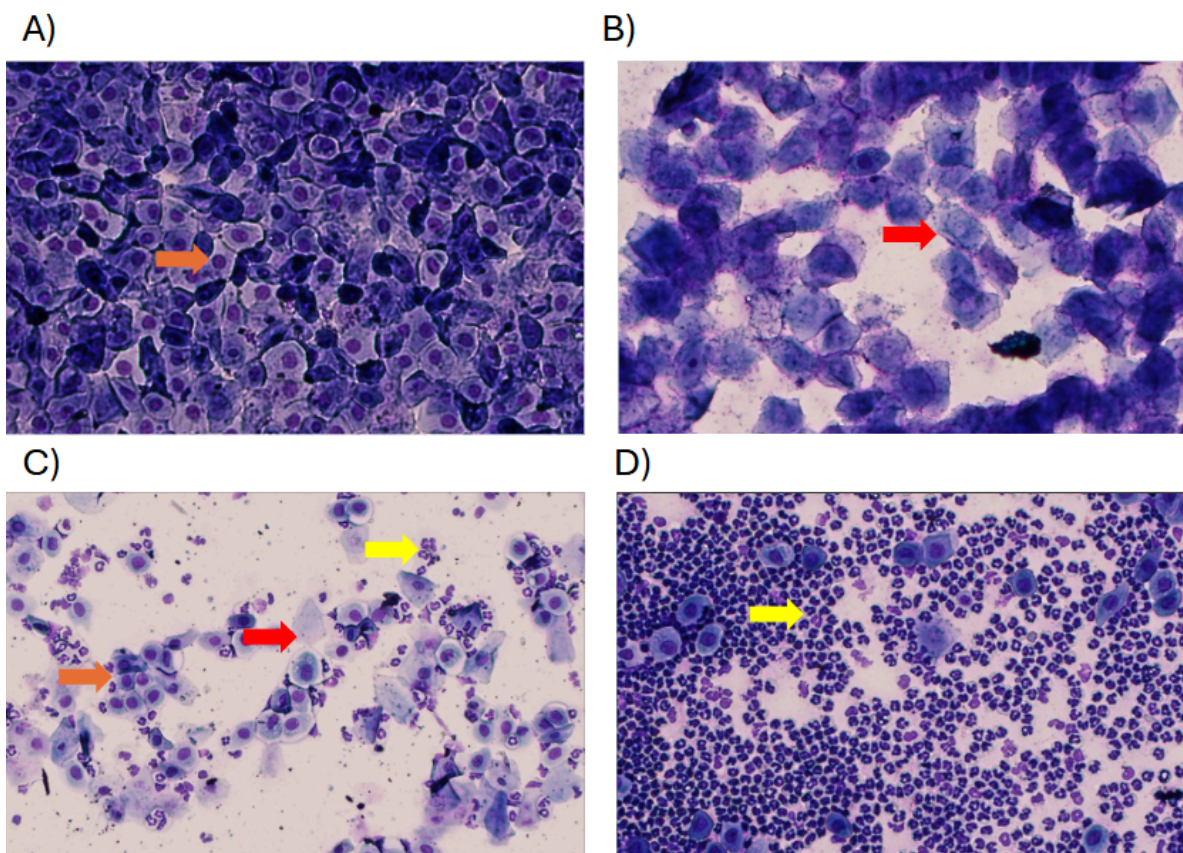
<b>Experimento</b>	<b>Sexo</b>	<b>Drogas</b>	<b>N</b>
<b>Labirinto em Cruz Elevado</b> <b>e</b> <b>Campo Aberto</b> <b>N=111</b>	Machos N=38	Controle	12
		MET 30	13
		MET 60	13
	Fêmeas (P/E) N=34	Controle	12
		MET 30	11
		MET 60	11
	Fêmeas (M/D) N=39	Controle	13
		MET 30	12
		MET 60	14

(P/E) Proestro/Estro, (M/D) Metaestro/Diestro  
(MET) Metirapona  
(N) Número de animais utilizados

### **3.2. Determinação da Fase do Ciclo Estral**

A fim de acompanhar e identificar as fases do ciclo estral das fêmeas, foi realizado, diariamente, o procedimento de esfregaço vaginal em horário fixo. O ciclo começou a ser avaliado 14 dias antes do começo dos experimentos. As amostras de tecido vaginal foram coletadas através de uma haste de aço esterilizada e umedecida em solução fisiológica, e disposta em lâminas de microscopia. As fases do ciclo estral foram estabelecidas a partir da proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos observados no esfregaço (MAENG & MILAD, 2015). O ciclo estral possui 4 fases que são classificadas como proestro, marcada pela presença de células epiteliais nucleadas, estro pela presença de células cornificadas não nucleadas, metaestro pela presença de células epiteliais, cornificadas e leucócitos, e diestro por uma predominância de leucócitos (Fig. 1). As fêmeas foram

agrupadas em proestro/estro e metaestro/diestro, conforme estudos anteriores do grupo de pesquisa (REIMER et al., 2018; ALVES et al., 2022).



**Figura 1.** Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas ciclando espontaneamente. Aumento de 500  $\mu\text{m}$ . (A) Proestro, (B) Estro, (C) Metaestro e (D) Diestro. As setas em laranja indicam células nucleadas, em vermelho indicam células cornificadas, em amarelo indicam leucócitos.

### 3.3. Drogas

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

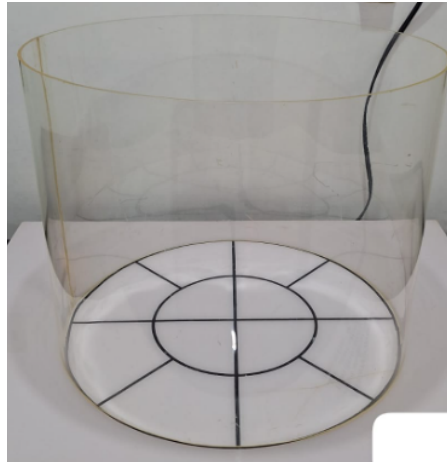
### 3.4. Equipamentos

Para testar o medo incondicionado do animal, foram utilizados dois equipamentos. Primeiro, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Fig. 2), que consiste em um equipamento elevado a 50 cm do solo, com dois braços abertos e, perpendicularmente a eles, dois braços fechados, todos com dimensões  $50 \times 10$  cm. Os braços fechados possuem paredes com 50 cm de altura e o centro do labirinto apresenta  $10 \times 10$  cm. Acima do LCE encontrava-se uma câmera de vídeo que registrou os comportamentos dos ratos para documentação e avaliação.



**Figura 2.** Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado que foi usado.

Em seguida, com o intuito de ampliar a exploração de potenciais efeitos motores, os animais foram também testados no Campo Aberto (CA) (Fig. 3), que consiste em uma arena circular de acrílico, cujas medidas são 50 cm de altura e 50 cm de diâmetro, com paredes transparentes e o assoalho dividido em 12 seções. Assim como no experimento com o LCE, acima do CA encontrava-se uma câmera de vídeo que registrou os comportamentos dos ratos para documentação e avaliação.



**Figura 3.** Fotografia da arena que foi usada para o teste de Campo Aberto.

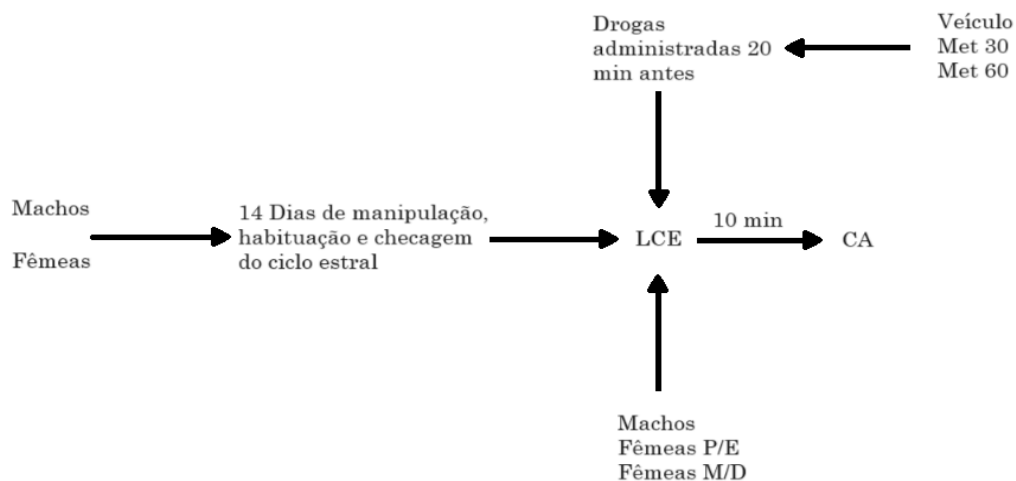
### **3.5. Procedimentos**

O protocolo experimental para o LCE foi baseado no experimento de De Oliveira e colaboradores (2014b). Cada animal foi colocado no labirinto individualmente, voltado para o braço fechado, e ficou nele, sozinho, por um período de 5 min. Após o final do tempo, o animal voltou para a caixa moradia e o aparato foi higienizado com álcool 20%. Os seguintes comportamentos foram avaliados: tempo de permanência nos braços abertos e fechados, número de entradas nos braços abertos e fechados, número de levantamentos, número de explorações das extremidades dos braços abertos, número de mergulhos de cabeça e tempo de autolimpeza.

Para o teste de CA, o animal foi colocado no centro do equipamento e teve seus comportamentos analisados durante 5 min, sendo que, ao final desse tempo, o animal foi removido, e o aparelho higienizado com álcool 20%. Foram observados comportamentos como o número de cruzamentos entre seções (centro e periferia), o tempo que o animal permanece no centro e na periferia, número de levantamentos, tempo de autolimpeza e tempo de imobilidade.

### 3.6. Delineamento Experimental

Logo em seguida à chegada dos animais do biotério central da UFSCar ao laboratório, os machos tiveram um tempo mínimo de 14 dias para a habituação e manipulação e, em seguida, foram iniciados os experimentos. No caso das fêmeas, após a chegada no biotério setorial, foi efetuado, diariamente, o esfregaço vaginal para acompanhamento do ciclo estral das ratas por cerca de 14 dias antes do começo dos experimentos. Os animais foram divididos em três subgrupos: CONTROLE, MET 30 e MET 60, considerando os grupos de machos, fêmeas proestro/estro e fêmeas metaestro/diestro. Vinte minutos após a administração de veículo ou metirapona, o animal foi colocado no LCE para 5 min de livre exploração. Após 10 min de sua retirada, o animal foi colocado no CA, onde permaneceu por mais 5 min em livre exploração (Fig. 4).



**Figura 4.** Delineamento experimental. (P/E) Proestro/Estro, (M/D) Metaestro/Diestro. (MET) Metirapona. (LCE) Labirinto em Cruz Elevado. (CA) Campo Aberto.

### 3.7. Análise dos dados coletados

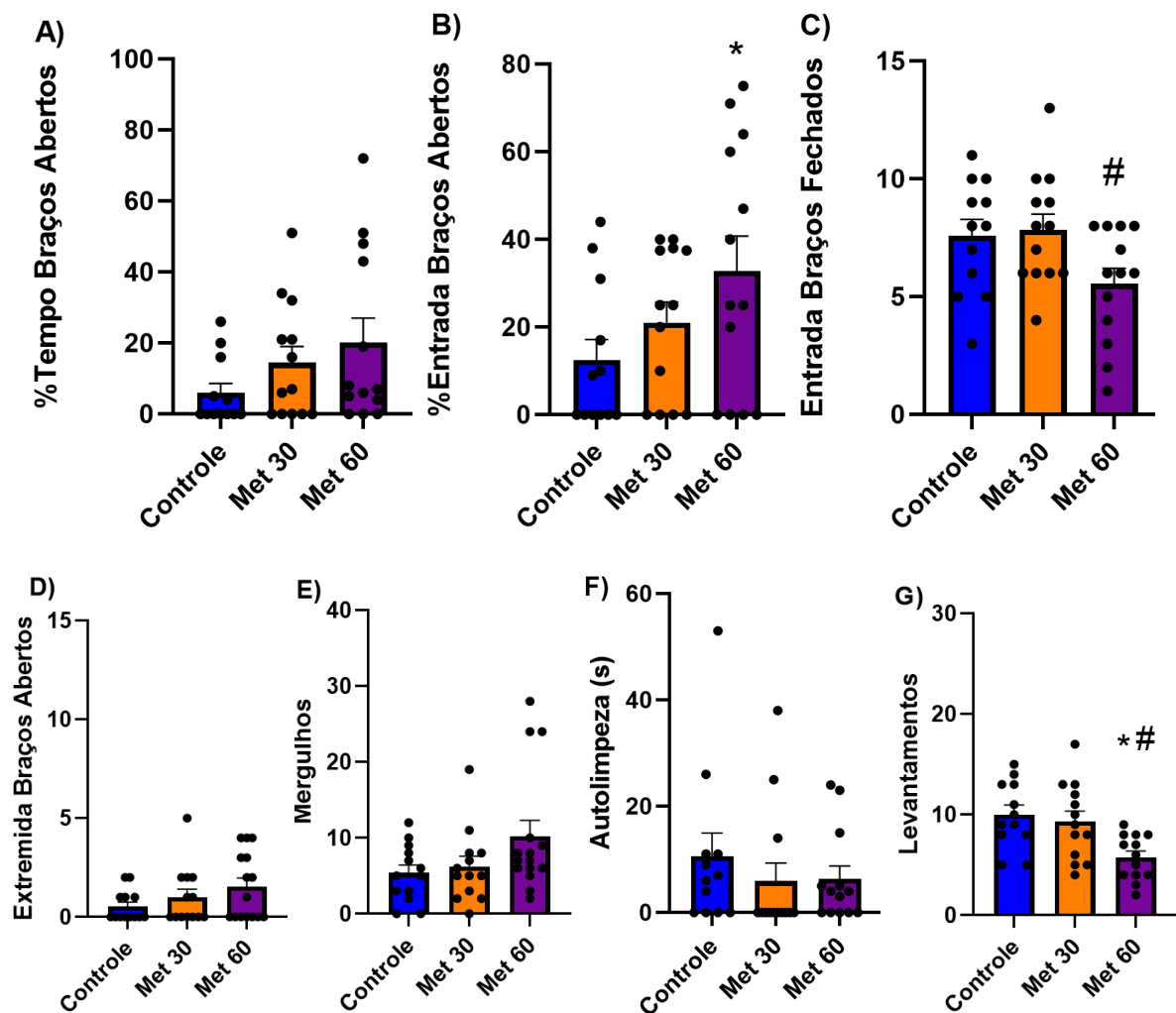
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Para avaliação dos dados coletados, foram usadas análises de variância (ANOVAs) de uma via. Em caso de significância

estatística, foi usado o post-hoc de Tukey. Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

## 4. Resultados

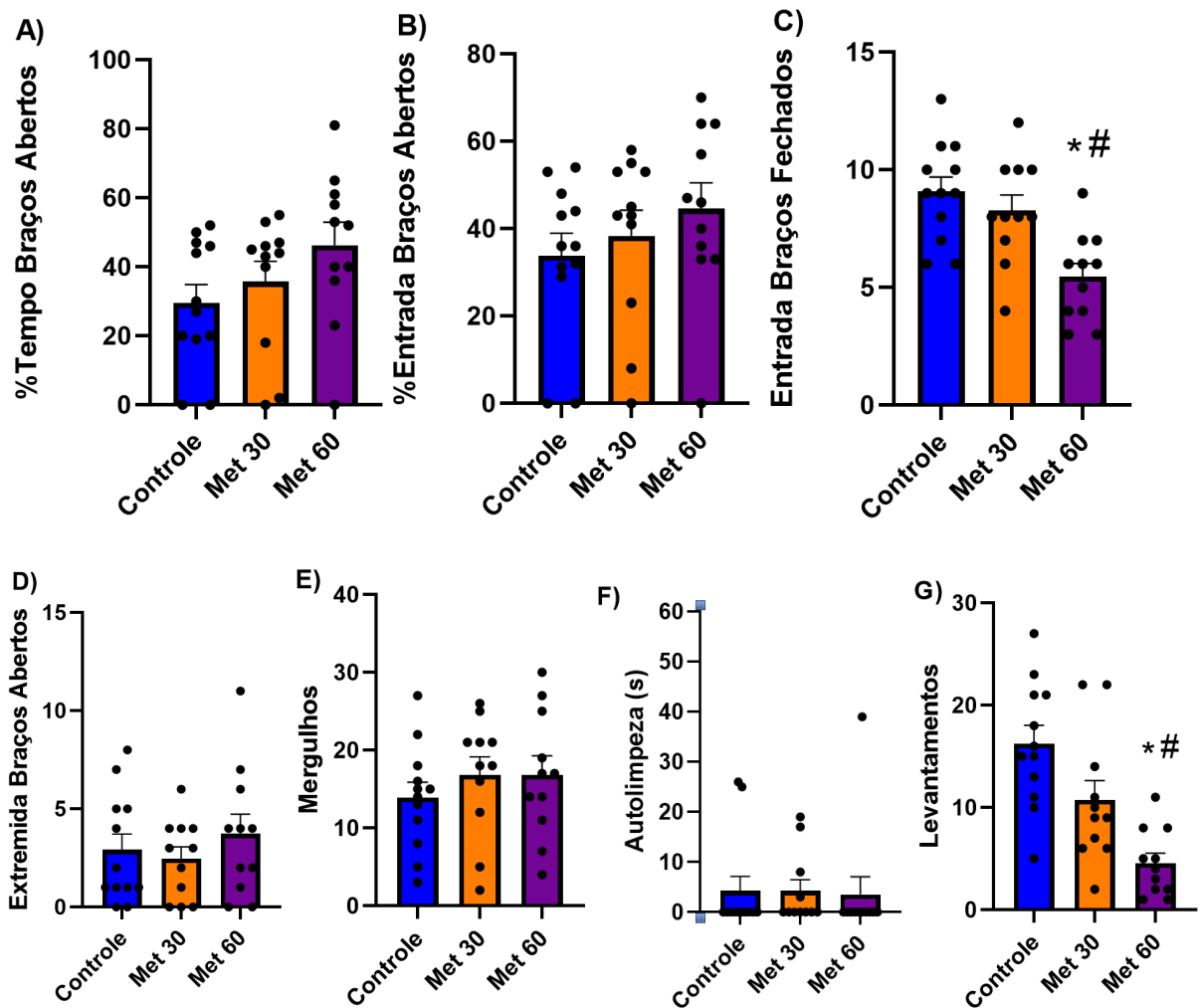
### 4.1. Labirinto em Cruz Elevado

A Figura 5 apresenta os resultados referentes aos machos. Os comportamentos avaliados foram: entradas nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, número de idas à extremidade dos braços abertos, número de mergulhos, número de levantamentos e tempo de autolimpeza. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 12), Met 30 mg/kg (n = 13) e Met 60 mg/kg (n = 13). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento nas entradas nos braços fechados ( $F_{2,35} = 3,57$ ;  $p < 0,05$ ). Sendo que a análise post hoc de *Tukey* revelou menor número de entradas do grupo Met 60 quando comparado ao grupo Met 30 ( $p \leq 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento na porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{2,35} = 3,92$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado uma maior porcentagem de entrada nos braços abertos do grupo Met 60 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Por fim, houve efeito significativo para o tratamento no número de levantamentos ( $F_{2,35} = 6,43$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi mostrado um menor número de levantamentos do grupo Met 60 quando comparado com o grupo controle e com o grupo Met 30 ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os outros comportamentos avaliados, sendo eles: idas à extremidade dos braços abertos ( $F_{2,35} = 1,44$ ;  $p > 0,05$ ), mergulhos de cabeça ( $F_{2,35} = 2,91$ ;  $p > 0,05$ ), tempo de autolimpeza ( $F_{2,35} = 0,54$ ;  $p > 0,05$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,35} = 2,57$ ;  $p > 0,05$ ).



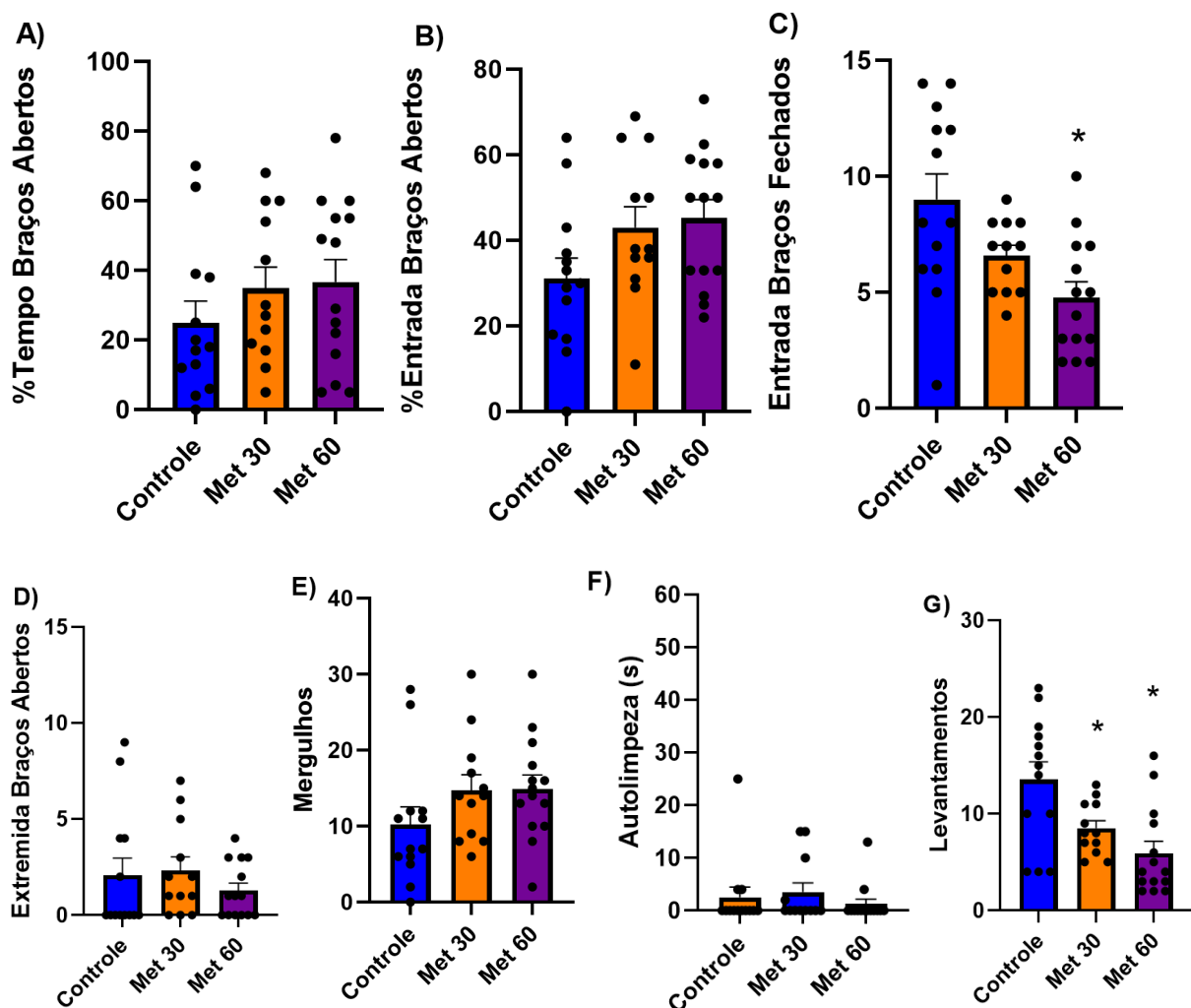
**Figura 5.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em machos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. (A) Porcentagem de tempo nos Braços Abertos, (B) Porcentagem de entrada nos Braços Abertos, (C) Número de entradas nos Braços Fechados, (D) Número de idas à Extremidade dos Braços Abertos, (E) Número de Mergulhos, (F) Tempo de Autolimpeza, (G) Número de Levantamentos. Média  $\pm$  EPM,  $n = 12-13$ . ANOVA de uma via seguida por Tukey. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo Met 30.

A Figura 6 apresenta os resultados referentes às fêmeas em proestro/estro. Os comportamentos avaliados foram: entradas nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, número de idas à extremidade dos braços abertos, número de mergulhos, número de levantamentos e tempo de autolimpeza. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 12), Met 30 mg/kg (n = 11) e Met 60 mg/kg (n = 11). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento nas entradas nos braços fechados ( $F_{2,31} = 9,63$ ;  $p < 0,05$ ). Sendo que a análise post hoc de *Tukey* revelou menor número de entradas do grupo Met 60 quando comparado ao grupo controle e ao Met 30 ( $p < 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no número de levantamentos ( $F_{2,31} = 13,12$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi mostrado um menor número de levantamentos do grupo Met 60 quando comparado com o grupo controle e com o grupo Met 30 ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os comportamentos: idas à extremidade dos braços abertos ( $F_{2,31} = 0,60$ ;  $p > 0,05$ ), mergulhos ( $F_{2,31} = 0,58$ ;  $p > 0,05$ ), autolimpeza ( $F_{2,31} = 0,02$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,31} = 2,01$ ;  $p > 0,05$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{2,31} = 0,95$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 6.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em fêmeas proestro/estro e submetidas ao labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. (A) Porcentagem de tempo nos Braços Abertos, (B) Porcentagem de entrada nos Braços Abertos, (C) Número de entradas nos Braços Fechados, (D) Número de idas à Extremidade dos Braços Abertos, (E) Número de Mergulhos, (F) Tempo de Autolimpeza, (G) Número de Levantamentos. Média  $\pm$  EPM, n = 11-12. ANOVA de uma via seguida por Tukey. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

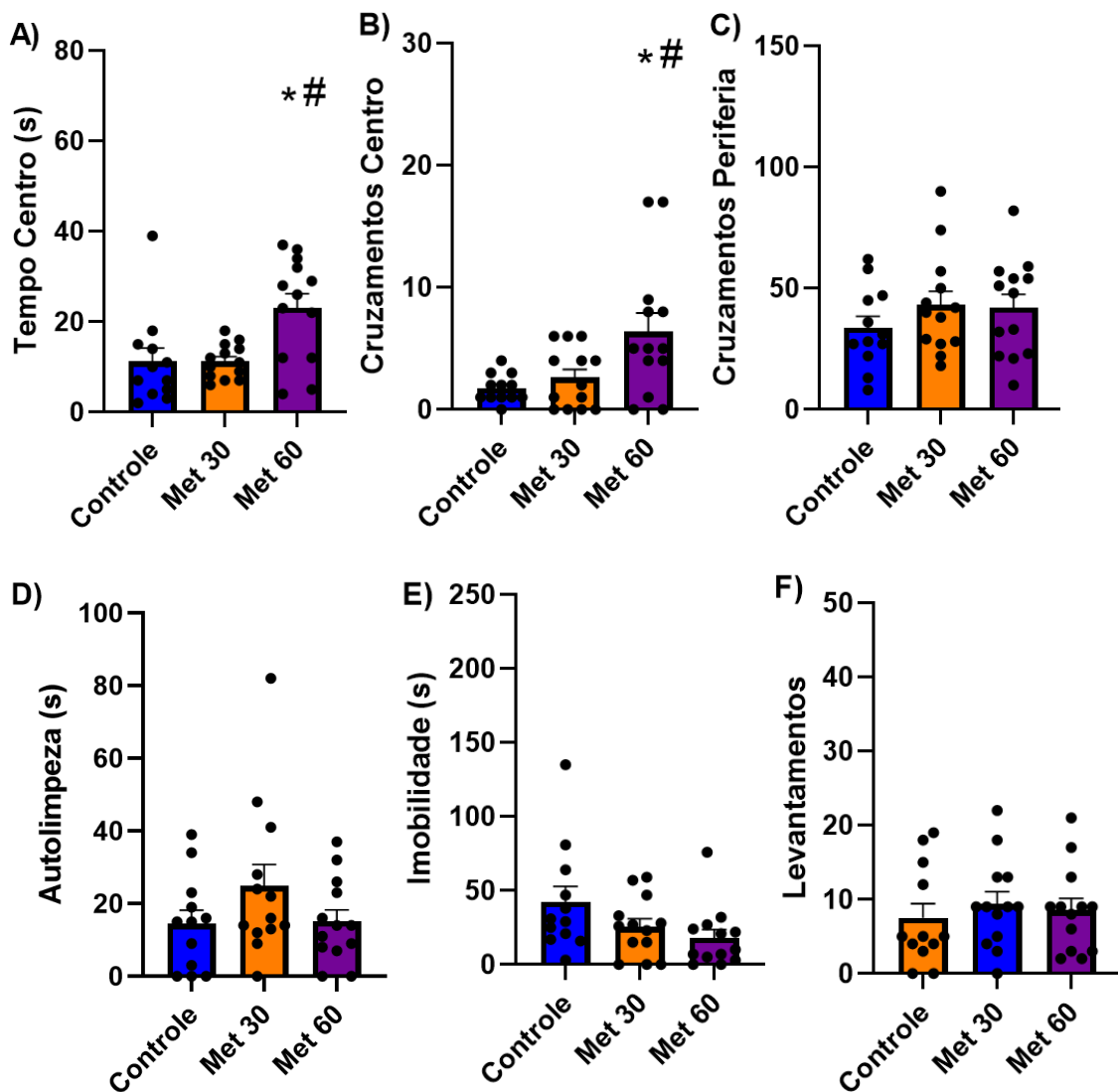
A Figura 7 apresenta os resultados referentes às fêmeas em metaestro/diestro. Os comportamentos avaliados foram: entrada nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, número de idas à extremidade dos braços abertos, número de mergulhos, número de levantamentos e tempo de autolimpeza. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 13), Met 30 mg/kg (n = 12) e Met 60 mg/kg (n = 14). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento nas entradas nos braços fechados ( $F_{2,36} = 7,18$ ;  $p < 0,05$ ). Sendo que a análise post hoc de *Tukey* revelou menor número de entradas do grupo Met 60 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no número de levantamentos ( $F_{2,36} = 8,16$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi mostrado um menor número de levantamentos dos grupos Met 60 e Met 30 quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os seguintes comportamentos: idas à extremidade dos braços abertos ( $F_{2,36} = 0,66$ ;  $p > 0,05$ ), mergulhos ( $F_{2,36} = 1,70$ ;  $p > 0,05$ ), tempo de autolimpeza ( $F_{2,36} = 0,54$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,36} = 1,02$ ;  $p > 0,05$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{2,36} = 2,80$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 7.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em fêmeas metaastro/diestro e submetidas ao labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. (A) Porcentagem de tempo nos Braços Abertos, (B) Porcentagem de entrada nos Braços Abertos, (C) Número de entradas nos Braços Fechados, (D) Número de idas à Extremidade dos Braços Abertos, (E) Número de Mergulhos, (F) Tempo de Autolimpeza, (G) Número de Levantamentos. Média  $\pm$  EPM, n = 12-14. ANOVA de uma via seguida por Tukey. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

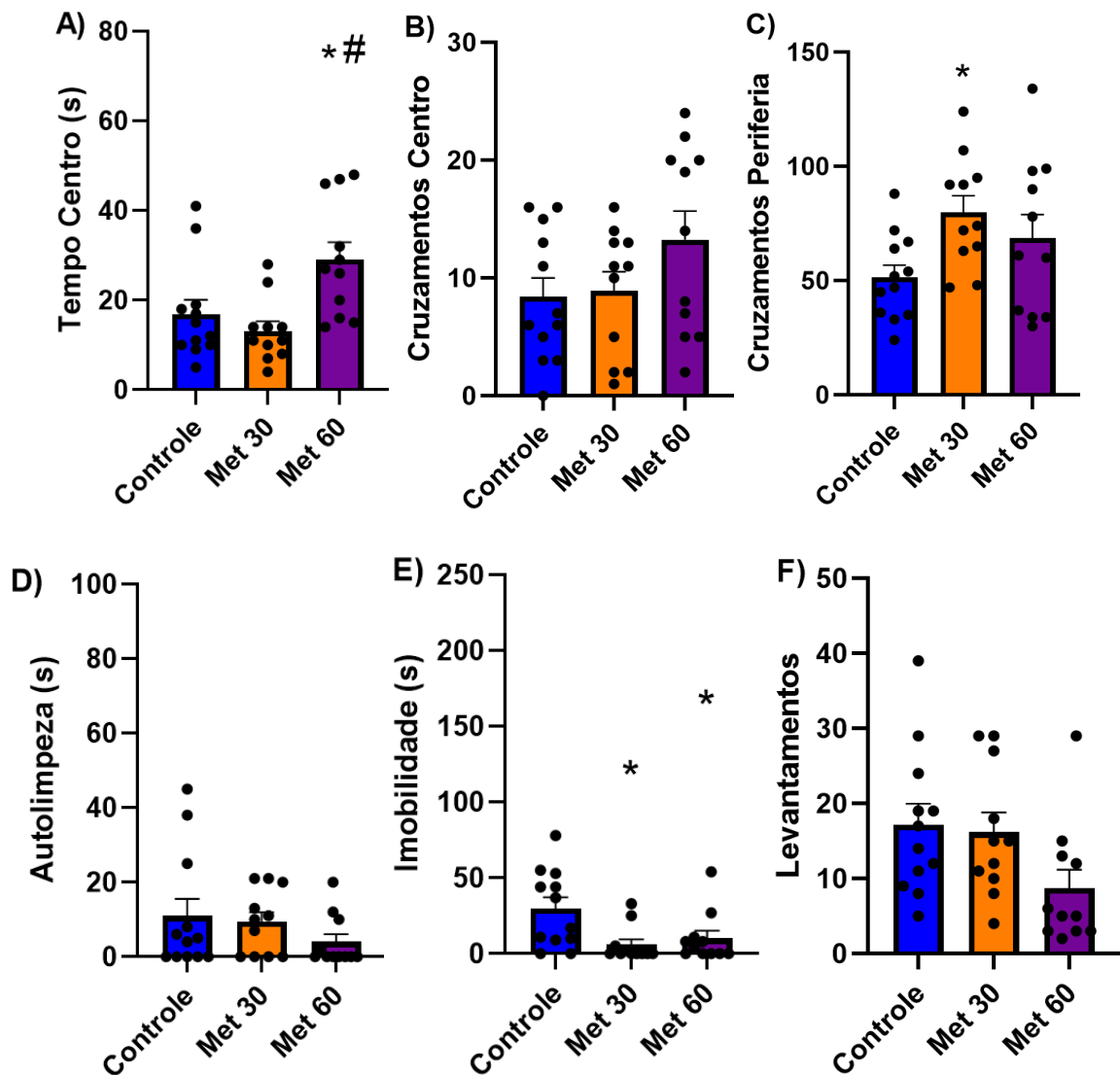
## 4.2. Campo Aberto

A Figura 8 apresenta os resultados referentes aos machos. Os comportamentos avaliados foram: cruzamentos na periferia, cruzamentos no centro, tempo no centro, tempo de autolimpeza, tempo total de imobilidade e número de levantamentos. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 12), Met 30 mg/kg (n = 13) e Met 60 mg/kg (n = 13). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento em cruzamentos no centro ( $F_{2,35} = 5,97$ ;  $p < 0,05$ ), sendo que a análise post hoc de *Tukey* revelou mais cruzamentos no grupo Met 60 quando comparado aos grupos controle e Met 30 ( $p < 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no tempo de permanência no centro ( $F_{2,35} = 7,33$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado um maior tempo de permanência do grupo Met 60 quando comparado aos grupos controle e Met 30 ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os seguintes comportamentos: cruzamentos na periferia ( $F_{2,35} = 0,86$ ;  $p > 0,05$ ), tempo de autolimpeza ( $F_{2,35} = 1,67$ ;  $p > 0,05$ ), tempo de imobilidade ( $F_{2,35} = 2,74$ ;  $p > 0,05$ ) e número de levantamentos ( $F_{2,35} = 0,30$ ;  $p > 0,05$ ).



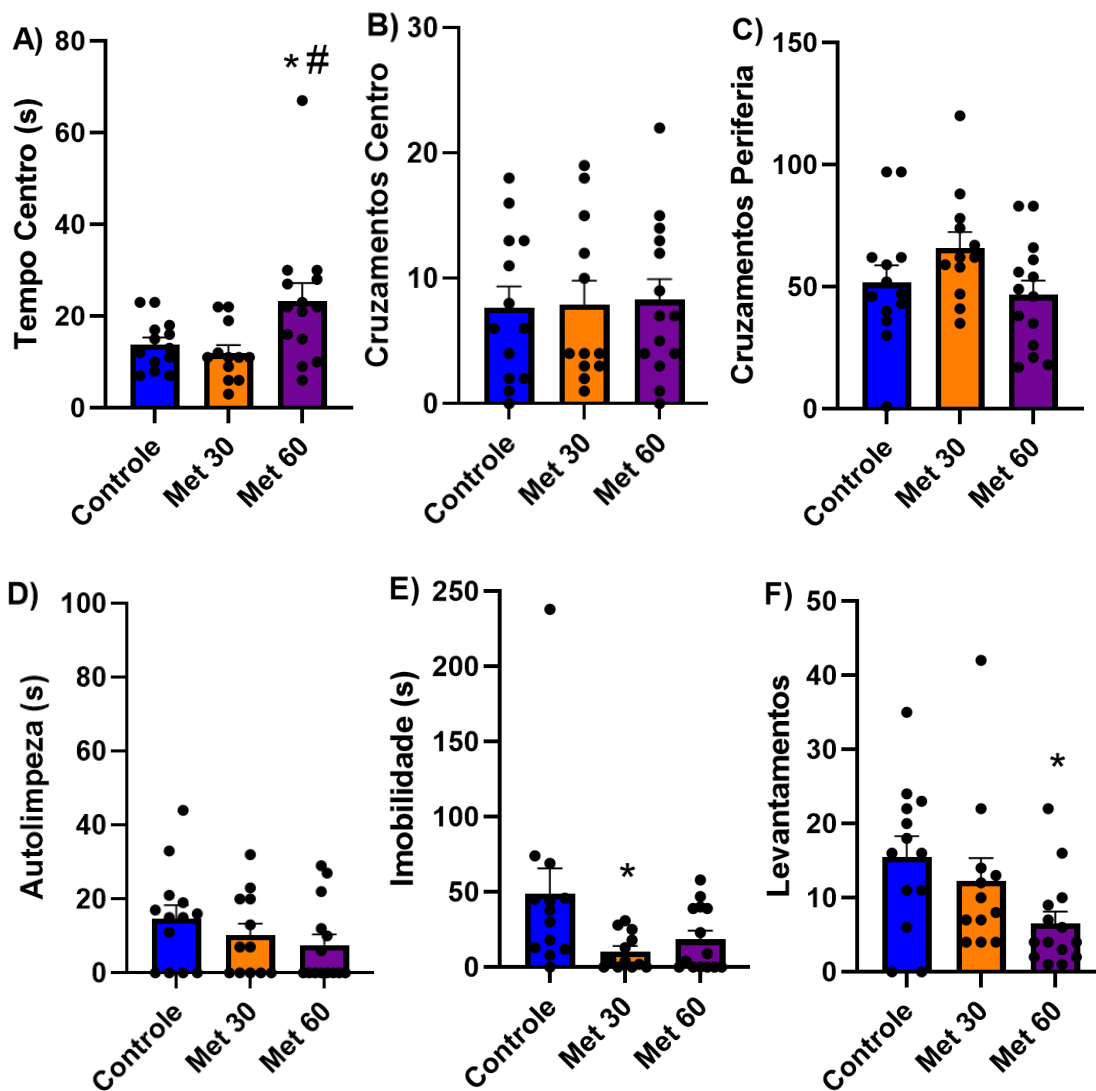
**Figura 8.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em machos submetidos ao Campo Aberto (CA) por 5 min. (A) Tempo no Centro, (B) Cruzamentos no Centro, (C) Cruzamentos na Periferia, (D) Tempo de Autolimpeza, (E) Tempo de Imobilidade, (F) Número de Levantamentos. Média  $\pm$  EPM, n = 12-13. ANOVA de uma via seguida por Tukey. \* p < 0,05 comparado ao grupo controle; # p < 0,05 comparado ao grupo Met 30.

A Figura 9 apresenta os resultados referentes às fêmeas em proestro/estro. Os comportamentos avaliados foram: cruzamentos na periferia, cruzamentos no centro, tempo no centro, tempo de autolimpeza, tempo total de imobilidade e número de levantamentos. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 12), Met 30 mg/kg (n = 11) e Met 60 mg/kg (n = 11). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento em cruzamentos na periferia ( $F_{2,31} = 3,45$ ;  $p < 0,05$ ), sendo que a análise post hoc de *Tukey* revelou mais cruzamentos feitos pelo grupo Met 30 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no tempo de permanência no centro ( $F_{2,31} = 6,80$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado maior tempo de permanência do grupo Met 60 quando comparado aos grupos controle e Met 30 ( $p < 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no tempo de imobilidade ( $F_{2,31} = 5,24$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado menor tempo de imobilidade dos grupos Met 30 e Met 60 quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os comportamentos: cruzamentos no centro ( $F_{2,31} = 1,94$ ;  $p > 0,05$ ), tempo de autolimpeza ( $F_{2,31} = 1,14$ ;  $p > 0,05$ ) e número de levantamentos ( $F_{2,31} = 3,02$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 9.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em fêmeas proestro/estro submetidas ao Campo Aberto (CA) por 5 min. (A) Tempo no Centro, (B) Cruzamentos no Centro, (C) Cruzamentos na Periferia, (D) Tempo de Autolimpeza, (E) Tempo de Imobilidade, (F) Número de Levantamentos. Média ± EPM, n = 11-12. ANOVA de uma via seguida por Tukey. \* p < 0,05 comparado ao grupo controle; # p < 0,05 comparado ao grupo Met 30.

A Figura 10 apresenta os resultados referentes às fêmeas em metaestro/diestro. Os comportamentos avaliados foram: cruzamentos na periferia, cruzamentos no centro, tempo no centro, tempo de autolimpeza, tempo total de imobilidade e número de levantamentos. Todos os comportamentos foram avaliados durante 5 minutos de exploração livre para os grupos controle (n = 13), Met 30 mg/kg (n = 12) e Met 60 mg/kg (n = 14). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tratamento no tempo de permanência no centro ( $F_{2,36} = 4,91$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado um maior tempo de permanência do grupo Met 60 quando comparado aos grupos controle e Met 30 ( $p \leq 0,05$ ). Houve também efeito significativo para o tratamento no tempo de imobilidade ( $F_{2,36} = 3,58$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi revelado um menor tempo de imobilidade do grupo Met 30 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A ANOVA de uma via também mostrou significância para o tratamento sobre o número de levantamentos ( $F_{2,36} = 3,47$ ;  $p < 0,05$ ). Na análise post hoc de *Tukey* foi mostrado um menor número de levantamentos do grupo Met 60 quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não foram encontrados resultados significativos para os comportamentos de cruzamentos na periferia ( $F_{2,36} = 2,28$ ;  $p > 0,05$ ), cruzamentos no centro ( $F_{2,36} = 0,03$ ;  $p > 0,05$ ) e tempo de autolimpeza ( $F_{2,36} = 1,24$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 10.** Efeitos da injeção intraperitoneal de veículo ou metirapona (Met) nas doses de 30 ou 60 mg/kg em fêmeas metaastro/diestro submetidas ao Campo Aberto (CA) por 5 min. (A) Tempo no Centro, (B) Cruzamentos no Centro, (C) Cruzamentos na Periferia, (D) Tempo de Autolimpeza, (E) Tempo de Imobilidade, (F) Número de Levantamentos. Média ± EPM, n = 12-14. ANOVA de uma via seguida por Tukey. \* p < 0,05 comparado ao grupo controle; # p < 0,05 comparado ao grupo Met 30.

## 5. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar o envolvimento da corticosterona na expressão do medo incondicionado, empregando o bloqueio de sua síntese por meio da administração intraperitoneal de metirapona em ratos Wistar machos e fêmeas, que foram subsequentemente submetidos aos testes do LCE e CA. Os resultados apontam para um efeito anti-aversivo do fármaco, manifestado pelo aumento da exploração dos braços abertos no LCE e da porção central no CA. Entretanto, observamos resultados contraditórios em relação à exploração geral, com a metirapona reduzindo a exploração no LCE (entradas nos braços fechados e levantamentos) e aumentando a exploração no CA (cruzamentos na periferia e imobilidade). Esses efeitos foram influenciados pela dose do fármaco administrada, pelo sexo dos animais e pela fase do ciclo estral. Sendo assim, os resultados não confirmaram completamente nossa hipótese, visto que, embora tenha havido uma diminuição das respostas defensivas, como esperado, houve também alteração da atividade exploratória geral, resultado dissonante com nossa hipótese inicial.

Os resultados obtidos a partir da exploração no LCE evidenciam como o bloqueio da síntese de corticosterona diminui os comportamentos defensivos, isto é, aumenta a porcentagem de entradas nos braços abertos nos machos e nas fêmeas quando analisadas em conjunto (mas não nas fêmeas subdivididas em proestro/estro e metaestro/diestro). Tal aumento ocorre, entretanto, paralelamente à diminuição das entradas nos braços fechados (em fêmeas) e dos levantamentos (em machos e fêmeas). O aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos está muito relacionado aos efeitos anti-aversivos dos fármacos, à medida que menor número de entradas nos braços fechados e levantamentos está mais relacionado com menor locomoção e atividade vertical, respectivamente (RODGERS et al., 1997). De maneira ampla, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram

aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona após exposição ao LCE (RODGERS et al., 1999), e com aqueles que avaliaram os efeitos da administração de metirapona no LCE em machos e também demonstraram efeitos anti-aversivos (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; MIKICS et al., 2005). Nesses estudos anteriores avaliando os efeitos da metirapona, entretanto, houve apenas diminuição da avaliação de risco, sem efeito direto na exploração dos braços abertos, enquanto que no nosso, a porcentagem total de entrada nos braços abertos aumentou. Além disso, a aplicação de metirapona não afetou a atividade motora geral no aparelho nos estudos anteriores (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; MIKICS et al., 2005), enquanto no nosso, houve uma diminuição das entradas nos braços fechados e levantamentos.

Com relação ao CA, a administração de metirapona teve efeito em diminuir a ansiedade, evidenciado, principalmente, pela maior exploração e tempo despendido no centro da arena. Tanto machos quanto fêmeas tratadas com metirapona na dose de 60 mg/kg, ficaram mais no centro do que os animais controle ou que receberam metirapona na dose de 30 mg/kg, indicando um maior efeito anti-aversivo em maiores doses. Contudo, ratas tratadas com metirapona também apresentaram efeitos na exploração geral do aparato, diferenças comportamentais algumas vezes atreladas ao seu ciclo estral. Enquanto tanto fêmeas em proestro/estro quanto em metaestro/diestro que receberam metirapona tiveram o tempo de imobilidade diminuído, apenas as em proestro/estro cruzaram mais na periferia e apenas as em metaestro/diestro levantaram menos. A diminuição dos levantamentos observada tanto no CA quanto no LCE está de acordo com achados anteriores em machos (CANINI et al., 2009). Já nossos resultados referentes ao aumento da exploração horizontal no CA não estão de acordo com a diminuição significativa da exploração geral do aparelho mostrada anteriormente (CANINI et al., 2009) ou com a ausência de efeitos significativos do bloqueio da síntese de corticosterona (ZIMPRICH et al., 2014).

A metirapona diminuiu o número de levantamentos no CA nas fêmeas metaestro/diestro e em todos os grupos no LCE. Uma vez que levantamentos estão relacionados com exploração vertical (CHOLERIS, 2001), uma diminuição deste comportamento pode indicar uma menor atividade exploratória. Contudo, como visto, nossos outros dados indicam uma maior exploração geral no CA, com aumento de cruzamentos e diminuição da imobilidade. Uma possibilidade seria a de que o tratamento com metirapona poderia induzir os animais a um estado de desequilíbrio, ou até, talvez, um atordoamento das capacidades de localização espacial desses animais, o que poderia explicar a relutância em engajar em exploração vertical, que se tornaria assim, um comportamento aversivo. Corroborando com essa ideia, está o fato de que, dos 121 animais inicialmente usados nessa pesquisa, 10 animais não foram incluídos nas análises pois caíram durante a exposição ao LCE, e desse total, 7 pertenciam a grupos tratados com a maior dose de metirapona. Em um estudo anterior (DROUET et al., 2010), a administração de metirapona gerou alterações que resultaram na maneira com que os ratos avaliam o ambiente, podendo ser um indicativo de que as quedas foram causadas por uma má conscientização do espaço físico. Resultados parecidos foram encontrados em outro estudo (LORIVEL et al., 2010), que atrelou a ambiguidade de comportamentos a uma maior inibição comportamental, alterando a avaliação de risco. Estudos significativamente diferentes (ZHANG et al., 2015; LIU et al., 2015; MORGAN et al., 2021), que não usaram metirapona, mas usaram algum outro tipo de bloqueador de síntese ou antagonista de corticosterona e expuseram os animais ao LCE ou CA, e usaram dos testes de catalepsia e rotarod para avaliar possíveis prejuízos motores, não apresentaram nenhum resultado indicando prejuízo motor, bem como não destacaram o número de queda dos animais, o que nos leva a crer que a observação desse fenômeno, nesta pesquisa, está relacionada com o uso especificamente da metirapona.

Em conclusão, se por um lado o bloqueio da síntese de corticosterona com metirapona diminuiu a expressão de comportamentos defensivos, ao mesmo tempo em que aumentou os comportamentos exploratórios, por outro, ela diminuiu o número de levantamentos gerais, e provocou um expressivo número de quedas dos animais, sugerindo o papel da corticosterona no medo incondicionado e no funcionamento motor do animal.

## **6. Considerações Finais**

Em suma, esta pesquisa objetivou avaliar a expressão da corticosterona na expressão do medo incondicionado em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Nossa hipótese, parcialmente confirmada, era a de que o bloqueio da síntese de corticosterona, por meio da administração intraperitoneal de metirapona, iria reduzir a expressão de respostas defensivas, sem afetar a atividade exploratória geral. Nossos achados indicaram que o bloqueio da corticosterona reduziu as respostas defensivas, ao mesmo tempo em que aumentou a atividade exploratória geral.

A fim de transpor as limitações dessa pesquisa, são feitas algumas considerações, como utilizar de outros testes, como rotarod, para melhor avaliar os efeitos motores da metirapona, e avaliar outros tipos de comportamentos nos aparelhos já usados, como avaliar a velocidade de movimento dos ratos no CA e a avaliação de risco no LCE, para expandir o conhecimento acerca dos efeitos anti-aversivos e motores da metirapona. Além disso, seria interessante utilizar métodos e equipamentos específicos para avaliar a concentração plasmática de corticosterona nos animais, com o intuito de traçar melhores paralelos entre as concentrações de corticosterona e os efeitos observados.

## 7. Referências Bibliográficas

ALBRECHET-SOUZA, L.; DE CARVALHO, M. C.; FRANCI, C. R.; BRANDÃO, M. L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Hormones and Behavior*, v. 52, n. 2, p. 267–273, 2007.

ALVES, C. O.; REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, 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, 1033649, 2022.

BAUER, E. P. Sex differences in fear responses: Neural circuits. *Neuropharmacology*, v. 222, 109298, 2023.

BRANDÃO, M. L.; DE OLIVEIRA, A. R.; MUTHURAJU, S.; COLOMBO, A. C.; SAITO, V. M.; TALBOT, T. Dual role of dopamine D2 -like receptors in the mediation of conditioned and unconditioned fear. *FEBS Letters*, v. 589, n. 22, p. 3433–3437, 2015.

BRANDÃO, M. L. *As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência*. In: \_\_\_\_\_. *Comportamento Emocional* São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 2004. p. 121-144.

CANINI, F.; BRAHIMI, S.; DROUET, J.-B.; MICHEL, V.; ALONSO, A.; BUGUET, A.; CESPUGLIO, R. Metyrapone decreases locomotion acutely. *Neuroscience Letters*, 457(1), 41–44, 2009.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 25, p. 235–260, 2001.

DE KLOET, E. R. Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *European Journal of Pharmacology*, v. 719, n. 1-3, p. 53–62, 2013.

DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; REIS, F. M. C. V.; BRANDÃO, M. L. 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, 2013.

DE OLIVEIRA, A. R.; COLOMBO, A. C.; MUTHURAJU, S.; ALMADA, R. C.; BRANDÃO, M. L. Dopamine D2-Like Receptors Modulate Unconditioned Fear: Role of the Inferior Colliculus. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, e104228, 2014a.

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, 2014b.

DE VITA, V. M.; ZAPPAROLI, H. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L.; de OLIVEIRA, A. R. 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, 2021.

DROUET, J. B.; MICHEL, V.; PEINNEQUIN, A.; ALONSO, A.; FIDIER, N.; MAURY, R.; BUGUET, A.; CESPUGLIO, R.; CANINI, F. Metyrapone blunts stress-induced hyperthermia and increased locomotor activity independently of glucocorticoids and neurosteroids. *Psychoneuroendocrinology*, v. 35, p. 1299–1310, 2010.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 23, n. 5, p. 743-760, 1999.

GARCIA, N.; ROSEMARY, R.; ZOELLNER, L. Estrogen, progesterone, and the menstrual cycle: A systematic review of fear learning, intrusive memories, and PTSD. *Clinical Psychology Review*, v. 66, p. 80– 96, 2017.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009.

LAMPREA, M. R.; CARDENA, F. P.; SETEM, J.; MORATO, S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n. 2, p. 135–140, 2008.

LA-VU, M.; TOBIAS, B. C.; SCHUETTE, P. J.; ADHIKARI, A. To Approach or Avoid: An Introductory Overview of the Study of Anxiety Using Rodent Assays. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. v. 14, 145, 2020.

LIU, A. D.; CAI, G. H.; WEI, Y. Y.; YU, J. P.; CHEN, J. YANG, J.; WANG, X.; CHE, Y. W.; CHEN, J. Z.; WU, S. X. Anxiolytic effect of essential oils of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, p. 12756–12764, 2015.

LORIVEL, T.; GRAS, M.; HILBER, P. Effects of corticosterone synthesis inhibitor metyrapone on anxiety-related behaviors in Lurcher mutant mice. *Physiology & Behavior*, v. 101, n. 2, p. 309-314, 2010.

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, 2015.

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, 2004.

MIKICS, E.; BARSY, B.; BARSVÁRI, B.; HALLER, J. 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, 2005.

MORGAN, L. V.; PETRY, F.; SCATOLIN, M.; DE OLIVEIRA, P. V.; ALVES, B. O.; ZILLI, G. A. L.; VOLFE, C. R. B.; OLTRAMARI, A. R.; DE OLIVEIRA, D.; SCAPINELLO, J.; MULLER, L. G. Investigation of the anti-inflammatory effects of stigmaterol in mice: insight into its mechanism of action. *Behavioural Pharmacology*, v. 32, p. 640–651, 2021.

PINTO, W. B. V. R.; KO, G. M.; VALERO-LAPCHIK, V. B.; ARIZA, C. B.; PORCIONATTO, V. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 1, n. 1, p. 102-120, 2012.

REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; DINIZ, J. B.; HOEXTER, M. Q.; MIGUEL, E. C.; MILAD, M. R.; BRANDÃO, M. L. Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. *Neuropharmacology*, v. 131, p. 104–115, 2018.

REIS, F. M. C. V.; ALMADA, R. C.; FOGAÇA, M. V.; BRANDÃO, M. L. Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats. *Cerebral Cortex*, v. 26, n. 6, p. 2639–2649, 2016.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 3, p. 289–304, 1997.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, v. 68, n. 1-2, p. 47–53, 1999.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *The American Journal of Psychology*, v. 83, n. 1, p. 103– 111, 1970.

ZHANG, C.; GAO, X.; SUN, Y.; SUN, X.; WU, W.; LIU, Y.; YU, H.; CUI, G. Anxiolytic Effects of Royal Sun Medicinal Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes) on Ischemia-Induced Anxiety in Rats. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 17, p. 1–10, 2015.

ZIMPRICH, A.; GARRETT, L.; DEUSSING, J. M.; WOTJAK, C. T.; FUCHS, H.; GAILUS-DURNER, V.; HRABÉ, M.; WURST, W.; HOLTER, S. M. A robust and reliable non-invasive test for stress responsivity in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 8, 125, 2014.

## ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar



Universidade Federal de São Carlos  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE CORTICOSTERONA NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM FÊMEAS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL", protocolada sob o CEUA nº 3078260423 (ID 001851), sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira e equipe; Pedro Henrique Timossi Busnardo** - 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 28/06/2023.

We certify that the proposal "EFFECTS OF BLOCKING CORTICOSTERONE SYNTHESIS IN THE ELEVATED PLUS MAZE TEST IN FEMALES IN DIFFERENT STAGES OF THE ESTRAL CYCLE", utilizing 108 Heterogenics rats (36 males and 72 females), protocol number CEUA 3078260423 (ID 001851), under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira and team; Pedro Henrique Timossi Busnardo** - 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 06/28/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2023** a **06/2025** Área: **Psicologia**

Origem: <b>Biotério Central da UFSCar</b>	sexo: <b>Machos</b>	idade: <b>60 a 90 dias</b>	Quantidade: <b>36</b>
Espécie: <b>Ratos heterogênicos</b>		Peso: <b>250 a 300 g</b>	
Linhagem: <b>Wistar</b>			
Origem: <b>Biotério Central da UFSCar</b>	sexo: <b>Fêmeas</b>	idade: <b>60 a 90 dias</b>	Quantidade: <b>72</b>
Espécie: <b>Ratos heterogênicos</b>		Peso: <b>230 a 280 g</b>	
Linhagem: <b>Wistar</b>			

São Carlos, 28 de junho de 2023

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

