

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

THAÍS MUNIZ DE QUEIROZ

**PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO CENTRAL DA  
AMÍGDALA NA AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS DE MEDO  
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS C57BL/6**

BELO HORIZONTE

2018

THAÍS MUNIZ DE QUEIROZ

**PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA NA  
AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS DE MEDO EM CAMUNDONGOS  
FÊMEAS C57BL/6**

Dissertação de Mestrado entregue ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, da  
Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Grace Schenatto  
Pereira Moraes

BELO HORIZONTE

2018

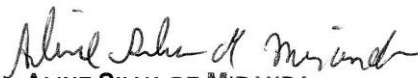
**"PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA NA  
AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS DE MEDO EM CAMUNDONGOS  
FÊMEA C57BL/6"**

**THAÍS MUNIZ DE QUEIROZ**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 19 de outubro de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. THEO ROLLA PAULA MOTA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR. ALINE SILVA DE MIRANDA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 19 de outubro de 2018.**

- 043 Queiroz, Thaís Muniz de.  
Participação do núcleo central da amígdala na aquisição de memórias de medo em camundongos fêmeas C57BL/6 [manuscrito] / Thaís Muniz de Queiroz. – 2018.
- 100 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Fisiologia. 2. Medo. 3. Núcleo Central da Amígdala. 4. Estrógenos. 5. Estradiol. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

“Eis também umas árvores, e eu conheço suas rugosidades, a água, e experimento seu sabor. Esses aromas de ervas e de estrelas, a noite, certas noites em que o coração se distende, como poderia negar este mundo cuja potência e cujas forças experimento? Mas toda a ciência desta Terra não me dirá nada que me assegure que este mundo me pertence. Vocês o descrevem e me ensinam a classificá-lo. Vocês enumeram leis e, na minha sede de saber, aceito que elas são verdadeiras. Vocês desmontam seu mecanismo e minha esperança aumenta. Por fim, vocês me ensinam que este universo prestigioso e multicolor se reduz ao átomo e que o próprio átomo se reduz ao elétron. Tudo isto é bom e espero que vocês continuem. Mas me falam de um sistema planetário invisível no qual os elétrons gravitam ao redor de um núcleo. Explicam-me este mundo com uma imagem. Então percebo que vocês chegaram à poesia: nunca poderei conhecer. ”

## AGRADECIMENTOS

*Foram muitas as vezes em que eu repassei mentalmente meus agradecimentos. Nos momentos difíceis, pensando na sorte de ter conhecido pessoas humildes e competentes para compartilhar comigo seu conhecimento. Nos demais momentos, consciente de ter a companhia de pessoas por quem desenvolvi grande admiração.*

*Agradeço à Grace por ter me atraído para o campo das Neurociências durante as aulas de Fisiologia Humana. Por ter me aceitado prontamente a sua equipe e confiado a mim um projeto de mestrado em um momento tão conturbado quanto a sua saída para o ano sabático. Obrigada por proporcionar a execução deste trabalho!*

*Agradeço ao grupo de pesquisa da Prof. Grace por ter se tornado um grupo de amigos. À Luciana Melo, devo muito do meu conhecimento prático e teórico. Admiro, mais que sua capacidade intelectual que é excepcional, sua disposição em compartilhar o que sabe. Isso é ser cientista, na minha concepção. Obrigada por ter me ensinado e ajudado a executar praticamente todos os experimentos e por ter sido, surpreendentemente, minha fonte de estabilidade emocional. Aos alunos de iniciação científica, Léo e Gabriel, obrigada pela disponibilidade e por terem auxiliado este projeto em várias ocasiões. À Laura e Lara, essa dupla imbatível, obrigada pela amizade cotidiana, pelas discussões científicas e pela ajuda, em especial nas santas “imunoz”. Ao Matheus e Lorena Terene, por ser a diversão dos meus dias. À Luciana Cosenza, Caio e Ana Flávia, por terem se disponibilizado sempre que necessário. Ao Julian, por ter somado ao grupo seu interesse e inteligência. Ao “Grupo da Memória”, por ter resistido mais do que qualquer um de nós imaginaria.*

*Ao NNC, agradeço pelo aprendizado, pelos recursos e pela oportunidade de conhecer pessoas tão diversas. Começo agradecendo ao Bruno, por quem tenho enorme admiração, por ter estado sempre de portas abertas. Pela ajuda com os ensaios de imunofluorescência. Pelo convívio leve e alegre, e claro, pela palha-italiana na copinha (agradeço à sua mãe também!). Ao Cleiton, além de tornar o laboratório um lugar leve e divertido, agradeço por ter se empenhado em solucionar os problemas da caixa de condicionamento. Igualmente, agradeço ao Francisco, que não desistiu até conseguir. Sem vocês esse projeto não teria os desdobramentos que teve. Obrigada! Ao André, pela calma e prontidão em ajudar. Ao Márcio e Juliana, pelas contribuições ao longo das reuniões do grupo. E, também, aos alunos que durante esses dois anos se tornaram pessoas muito queridas: Ana Luiza, Lari, Leonardo, Lorena Fernandes, e tantos outros.*

*Agradeço às oportunidades que surgiram dentro da PG FISFAR. Em especial, aos colegas de mestrado Thamyris e Caio, por terem se tornado grandes amigos, por olharem o mundo de forma crítica e se destacarem por serem exatamente quem são. Agradeço aos professores, coordenação e funcionários da PG FISFAR pela formação de qualidade. Destaco o Prof. Raphael Szawka, a quem agradeço por ter sido tão solícito quando busquei auxílio em um dos experimentos.*

*Porém, nada disso seria o mesmo se, ao chegar em casa, eu não pudesse compartilhar cada detalhe com minha mãe, Ilze, e minha irmã, Marina. Vocês viveram intensamente esse mestrado junto a mim. Cada novo desafio, cada cirurgia, experimentos, angústias, decepções e conquistas. Quantas vezes os camundongos foram o assunto da mesa do café da manhã? Muito obrigada, mesmo. Vocês são minhas melhores amigas! Obrigada ao meu pai, Cristiano, por compreender a importância dessa etapa em minha vida. Obrigada à Tamires, que também vivenciou cada fase ao longo desses dois anos. Agradeço ao sítio, meu lugar preferido, por reunir a tranquilidade e o amor dessas relações.*

*Agradeço ao Luiz, que admiro de tantas formas. Sua maneira de ver o mundo, ao mesmo tempo tão de longe e tão de dentro, com tamanho racionalidade e clareza, me proporcionaram grandes transformações. A leveza desse ano se deve a você. Obrigada! Agradeço também ao “inenarrável”, pelas temporadas de descanso e fôlego.*

*Ao Prof. Eduardo Tarazona e ao LDGH, pelos ensinamentos durante a iniciação científica que me foram tão úteis no mestrado. Por configurar, para mim, um grande exemplo na produção científica de qualidade e trabalho em equipe. Pelo suporte às minhas escolhas e mudanças de trajetória.*

*Agradeço também às amigas da Biologia: Fernanda, Humberto, Lucas, Brenda, Felipe Viégas, Arthur, Winona, Mateus e Fernando. Ao Marcus, sou grata ao companheirismo nas fases iniciais do projeto, que foram as mais desafiadoras.*

*À Mariana e Walkiria, agradeço pelo apoio que me foram essenciais. Em particular, agradeço à Walkiria por ter encorajado novas formas de posicionamento.*

*Às aulas de samba de gafieira às segundas-feiras, fundamentais para dissipar as ansiedades da semana prestes a começar.*

*Em suma, fazer ciência é uma atividade bela, complexa e humana, com todas as suas contradições. Não fossem as pessoas presentes no caminho, esse trabalho não teria a metade do sentido que teve em minha formação.*

## RESUMO

A memória de medo condicionado ao som, cujo principal substrato neural é a amígdala, é prejudicada pela privação crônica de hormônios ovarianos em camundongos. O objetivo deste estudo foi verificar o papel do núcleo central da amígdala (CeA) e a influência dos estrógenos durante a formação de memórias de medo condicionado ao som em fêmeas C57BL/6. O paradigma de condicionamento clássico consistiu de um pareamento entre som (CS) e choque nas patas (US) durante o treino. O comportamento de congelamento (*freezing*) foi avaliado como medida da memória de medo condicionado ao som no teste de evocação, 24h após, mediante a apresentação do CS. Verificamos que a inibição da CeA (muscimol 30ng/lado) durante o treino do condicionamento em fêmeas normociclantes prejudicou a aquisição da memória de medo condicionado ao som. Em fêmeas ovariectomizadas (OVX) por 12 semanas, em que ocorre prejuízo no condicionamento, a desinibição desta estrutura previamente ao treino (bicuculina 100ng/lado) restabeleceu a memória de medo, sugerindo um aumento da inibição tônica na CeA de fêmeas OVX. Esta hipótese foi sustentada pela identificação de uma maior imunorreatividade às enzimas da maquinaria GABAérgica (GAD65/67) em fêmeas ovariectomizadas. Para avaliar o efeito dos estrógenos na CeA em um cenário fisiológico, utilizamos antagonistas de receptores de estrógenos (ER) injetados intra-CeA antes do treino em fêmeas normociclantes. Identificamos que o antagonismo de ER $\alpha$  (TPBM 50ng/lado) prejudicou a aquisição de respostas condicionadas. Não houve efeito do bloqueio de ER $\beta$  (PHTPP 0,2 ng/lado) e GPER (G15 7,4ng/lado) na CeA. Portanto, demonstramos que a CeA é essencial para a aquisição de memórias de medo condicionado ao som em fêmeas normociclantes e parece estar inibida em fêmeas OVX (12 semanas). Dentre os hormônios afetados pela ovariectomia, os estrógenos mostraram-se necessários para a aquisição desta memória por meio da ativação de ER $\alpha$  na CeA em situação fisiológica. Sua carência pode estar relacionada aos prejuízos observados nas fêmeas OVX. Deste modo, o presente estudo explorou as particularidades do circuito de medo feminino, auxiliando a esclarecer como os hormônios sexuais interagem com a emergência de comportamentos defensivos aprendidos.

Palavras-chave: Medo, amígdala central, estrógeno, estradiol, condicionamento.



## ABSTRACT

Cued fear memory, whose main neural substrate is the amygdala, is hampered by the chronic deprivation of ovarian hormones in mice. Here, we verified the role of the central nucleus of the amygdala (CeA) and the influence of estrogens during the acquisition of cued fear memories in female mice C57BL/6. Classical conditioning paradigm consisted of pairing a tone (CS) to a footshock (US). Freezing behavior was evaluated 24 hours later in test session, during the CS presentation, as a measure of cued fear memory. Our results demonstrated that CeA inhibition (muscimol 30ng/side) during training session is detrimental to the acquisition of fear memory in normocycling females. In ovariectomized females (OVX 12 weeks), in which conditioning is impaired, the disinhibition of this structure pre-training (bicuculline 100ng/side) restored fear memory, suggesting an increase in CeA tonic inhibition of OVX mice. This hypothesis was supported by a greater immunoreactivity to GAD65/67 enzymes, which are part of GABA synthesis machinery, in response to OVX (12 weeks). Estrogen effects on the CeA was also evaluated in a physiological scenario by employing estrogen receptors (ER) antagonists injected intra-CeA prior to training session in normocycling females. We identified that the ER $\alpha$  antagonism (TPBM 50ng/side) impaired the acquisition of conditioned responses. There was no effect when ER $\beta$  (PHTPP 0.2ng/side) and GPER (G15 7.4ng/side) were blocked in CeA. Therefore, we demonstrated that CeA is essential for acquiring cued fear memories in normocycling female mice and appears to be inhibited in OVX females (12 weeks). Among the hormones affected by ovariectomy, estrogens were necessary for the acquisition of fear memory through the activation of ER $\alpha$  in CeA. Estrogen deficiency may be related to the impairments observed in OVX females. Thus, the present study explored the particularities of the female's fear circuit, helping to clarify how sex hormones interact with the emergence of acquired defensive behaviors.

Key words: Fear, central amygdala, estrogens, estradiol, conditioning.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>1.1. Medo condicionado</b> .....	9
<b>1.2. Memória de medo condicionado: um tipo de memória associativa</b> .....	11
<b>1.3. Bases neurofisiológicas da memória de medo condicionado ao som</b> .....	13
<b>1.4. O circuito do medo pode apresentar diferenças sexuais</b> .....	20
<b>1.5. Flutuações hormonais e menopausa em mulheres e roedores</b> .....	21
<b>1.6. Estrógenos: síntese e receptores</b> .....	24
<b>1.7. Efeitos do estradiol (E2) sobre plasticidade e memória</b> .....	27
<b>1.8. Interação entre estradiol e o neurotransmissor GABA</b> .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	35
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	35
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1. Animais</b> .....	36
<b>4.2. Avaliação do ciclo estral por citologia vaginal</b> .....	36
<b>4.3. Procedimentos Cirúrgicos</b> .....	38
<b>4.4. Histologia para confirmação do posicionamento das cânulas</b> .....	40
<b>4.5. Tratamentos Farmacológicos</b> .....	41
<b>4.6. Testes Comportamentais</b> .....	43
<b>4.7. Imunofluorescência</b> .....	47
<b>4.8. Análise das imagens de imunofluorescência</b> .....	48
<b>4.9. Desenhos experimentais</b> .....	50
<b>4.10. Estatística</b> .....	53
<b>5. RESULTADOS</b> .....	54
<b>5.1. Em fêmeas normociclantes, a inibição do núcleo central da amígdala (CeA) durante a sessão de treino impede a aquisição da memória de medo condicionada ao som.</b> .....	54
<b>5.2. A desinibição da CeA durante a aquisição recupera a memória de medo condicionado ao som em fêmeas ovariectomizadas (OVX) por 12 semanas.</b> .....	57
<b>5.3. A desinibição da CeA diminui o fenótipo tipo-ansioso em fêmeas OVX (12 semanas), mas não altera a atividade locomotora.</b> .....	61
<b>5.4. A quantidade das enzimas GAD65 e GAD67 aumenta após privação de hormônios ovarianos por 12 semanas.</b> .....	63

5.5.	A sinalização aguda por estradiol na CeA durante a aquisição não recupera o déficit de memória de fêmeas OVX (12 semanas). .....	67
5.6.	Em fêmeas normociclantes, o antagonismo de receptores de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) na CeA durante o treino prejudica a aquisição da memória de medo condicionado.....	69
5.7.	Em fêmeas normociclantes, o antagonismo de receptores de estrógeno $\alpha$ na CeA não altera o comportamento locomotor nem o comportamento tipo-ansioso nas fases de aquisição e evocação da memória de medo.....	72
5.8.	Efeito do bloqueio de receptores GABA-A na CeA sobre o prejuízo de memória causado pelo antagonista de ER $\alpha$ (TPBM). .....	74
6.	DISCUSSÃO .....	77
7.	CONCLUSÃO .....	89
8.	REFERÊNCIAS .....	90

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Medo condicionado

O medo é uma das emoções básicas humanas dentre as sete definidas por Ekman & Cordaro (2011). Emoções básicas consistem em respostas fisiológicas discretas - que possam ser diferenciadas de outras emoções básicas - a situações fundamentais de nossas vidas, que foram úteis aos nossos ancestrais e selecionadas ao longo da evolução. Sendo assim, são conjuntos de alterações rápidas (vocais, faciais, autonômicas, etc.) que se desenvolveram e perpetuaram por um processo adaptativo e evolutivo, não dependente da cultura, e que são compartilhadas por todos os seres humanos, caracterizando-se como universais (Ekman & Cordaro, 2011). A universalidade das emoções foi proposta inicialmente por Charles Darwin em 1872, que conjecturou que as emoções são universais para nossa espécie ao passo que também compartilhada com outros seres vivos, dada sua origem evolutiva.

O medo como o sentimento é também uma experiência subjetiva e consciente que se soma às respostas autonômicas e aos ajustes fisiológicos frente ao perigo (LeDoux & Pine, 2016). Entretanto, é difícil extrapolar este estado mental para outros seres vivos, pois os estados subjetivos dos animais são difíceis de ser acessados, se não impossíveis (LeDoux, 2000). O que podemos reconhecer facilmente em outras espécies, como fez Charles Darwin, são alterações fisiológicas. Desta forma, conceitua-se o medo, objetivamente, como um mecanismo de defesa em resposta a estímulos sensoriais que denotam perigo iminente e que promovem no organismo respostas comportamentais e fisiológicas de defesa, com enorme valor para a sobrevivência (LeDoux & Pine, 2016).

Tanto as respostas de medo quanto os estímulos capazes de eliciá-las variam conforme a espécie, visto que são dependentes de uma história evolutiva que abrange o nicho ocupado pela espécie e as ameaças nele presentes, principalmente levando-se em conta relações de predação. Assim, o sistema nervoso foi diferencialmente moldado pela experiência e por eventos genéticos de modo a identificar e responder a tais estímulos. Respostas de medo podem ser do tipo ativas, "*fight or flight*" (do inglês, "luta ou fuga") ou passivas (*freezing*, do inglês "congelamento"). Ao enfrentar uma situação aversiva o cérebro modifica-se, favorecendo a posterior identificação de ameaças semelhantes (Pellman & Kim, 2016). A essas alterações plásticas atribuímos o conceito de memórias de medo, ou memórias aversivas.

O medo pode ser dividido em medo inato e medo condicionado. Modalidades variadas de estímulos são capazes de gerar medo inato. Como exemplos, pode-se citar: co-específicos agressivos; predadores; aspectos do ambiente, como distância do solo; ou estímulos sensoriais internos, como dor. Ainda que esses estímulos possam ser complexos e polissensoriais, alguns de seus componentes discretos também são capazes de evocar medo inato, tais como uma sombra vinda de cima (pista visual) ou o odor de um predador (pista olfatória), que representam a ameaça (Silva et al., 2016).

Já o medo condicionado provém da experiência, que dá origem a uma memória associativa entre estímulo aversivo/nocivo e um estímulo ambiental neutro (um contexto ou uma pista). O condicionamento de animais foi operacionalizado em laboratório por Ivan Pavlov (1927). Ele observou que, em cães, um estímulo inicialmente neutro (ex. um som; estímulo condicionado - CS) pode adquirir uma relevância emocional quando pareado temporalmente a um estímulo de relevância biológica (ex. comida; estímulo incondicionado - US), deste modo, fazendo emergir respostas condicionadas (ex. salivação) mediante a ocorrência do CS somente (Duvarci & Pare, 2014; Janak & Tye, 2015; LeDoux, 2000). Para esta formulação, deu-se o nome de condicionamento clássico Pavloviano.

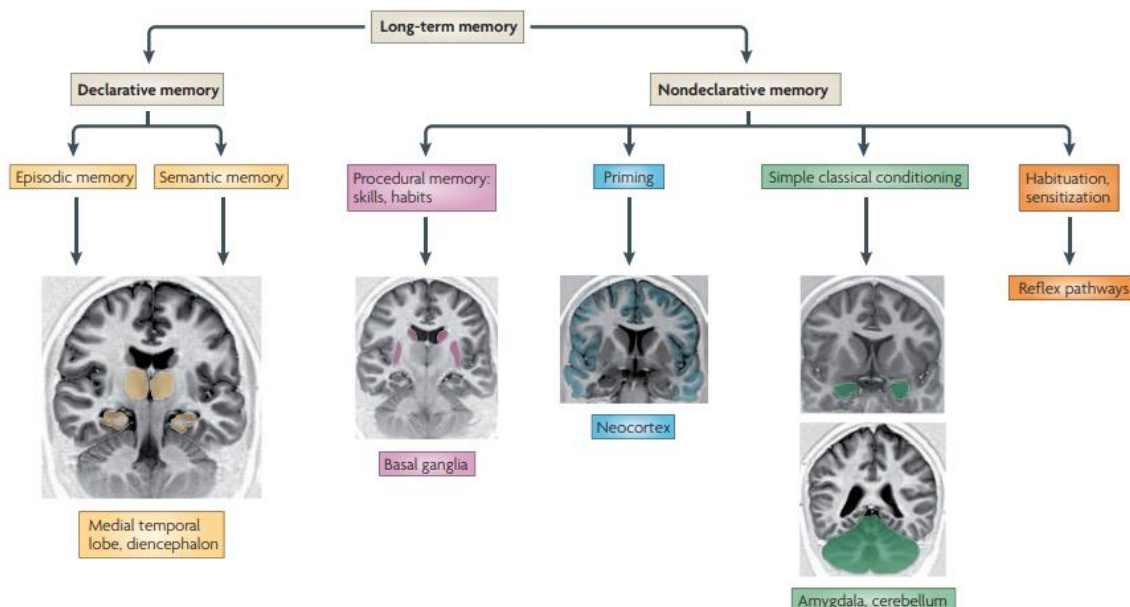
O condicionamento clássico é aplicado no estudo do medo condicionado em modelos animais de laboratório como roedores, em que usualmente utiliza-se o choque nas patas do animal como US, e a este é pareado um som neutro (CS). Quando a associação é aprendida, o que ocorre após poucos (ou apenas um) pareamentos, o som passa a eliciar respostas comportamentais e fisiológicas de medo, tais como o *freezing* (episódios de cessação de todos os movimentos, exceto os respiratórios), aumento da pressão arterial, analgesia, liberação de hormônios de estresse, facilitação de reflexos e alterações respiratórias (Ehrlich et al., 2009; Janak & Tye, 2015; LeDoux, 2000). No entanto, somente a variável “pareamento” CS+US não é suficiente para gerar este tipo de memória. É preciso que se estabeleça uma relação de condicionalidade entre ambos, ou seja, o CS deve ser um preditor confiável do US (Fanselow & Wassum, 2016). O aprendizado associativo de medo é altamente conservado evolutivamente já que pode ser observado em uma gama grande de animais, de vermes, moscas e caramujos a peixes, aves e humanos (LeDoux, 2000).

De forma interessante, a apresentação repetida do CS, na ausência do US, promove um fenômeno denominado extinção do medo (*fear extinction*). Este se caracteriza pela diminuição das respostas condicionadas após o protocolo de

condicionamento ao medo descrito anteriormente, deste modo, diminuindo o valor preditivo do CS (Rescorla, 1996). Trata-se de um processo ativo que gera um novo aprendizado que suprime o traço de memória de medo original, sem apagá-lo (Kong et al., 2014; Myers & Davis, 2007). O modelo de extinção do medo condicionado tem sido bastante utilizado em laboratório, bem como a investigação do circuito da extinção, devido a sua importância na etiologia de distúrbios psicológicos, tais como a ansiedade e a síndrome do estresse pós-traumático (PTSD) (Cover et al., 2014). Pacientes com PTSD possuem prejuízos na capacidade de inibir ou extinguir medos adquiridos em situações traumáticas e há disfunção no circuito de extinção nessa população (Graham & Milad, 2011).

## 1.2. Memória de medo condicionado: um tipo de memória associativa

Memórias podem ser classificadas pela sua duração e conteúdo. Quanto à duração, as memórias podem ser de curta duração, longa duração ou classificadas como memórias de trabalho. As memórias de trabalho duram de segundos a minutos; as de curta duração são instáveis, durando de minutos a horas; já a memória de longa duração é mais persistente, inclui alterações na síntese de proteínas e pode perdurar por anos (Kandel et al., 2014).

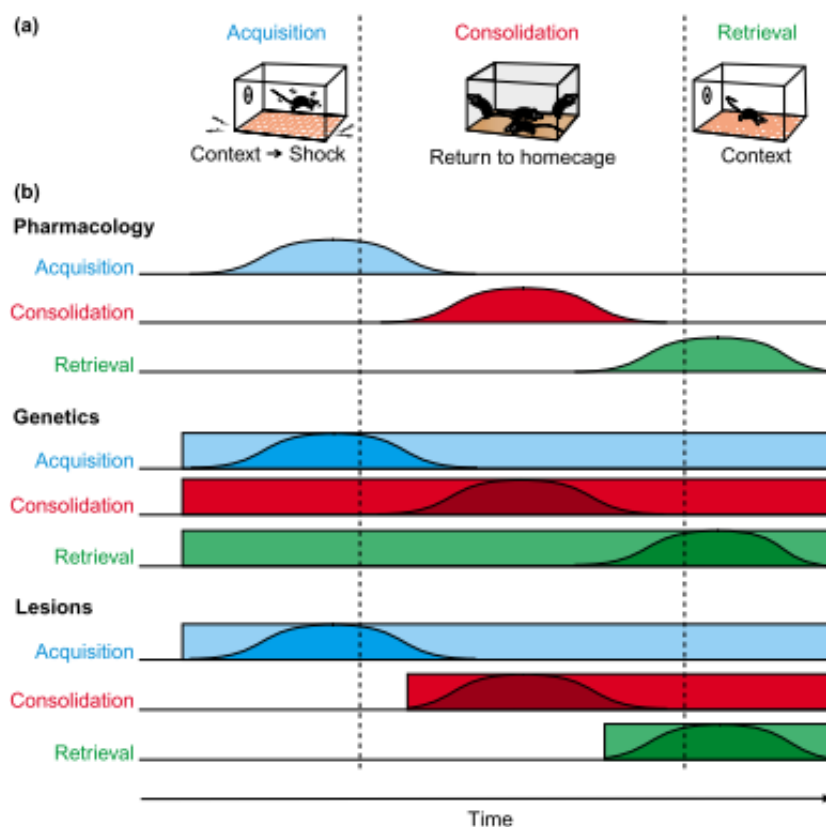


**Figura 1. Classificação de memórias quanto ao conteúdo, salientando as regiões cerebrais preferencialmente envolvidas.** O condicionamento clássico é uma memória não-declarativa de longa duração, mediada principalmente pela amígdala (Fonte: Henke et al. 2010).

Quanto ao conteúdo, as memórias de longa duração podem ser classificadas como memórias declarativas (explícitas) ou não-declarativas (implícitas) (Figura 1). Dentre as declarativas, existem as memórias episódicas, que consistem em memórias autobiográficas e pessoais; e memórias semânticas, compostas por fatos e conhecimento geral, de maneira impessoal. Já as não-declarativas consistem no aprendizado sensoriomotor, habituação e sensibilização. Exemplos de memórias implícitas podem ser também a aquisição de hábitos, *priming* (aumento da probabilidade de identificar um objeto/palavra ao qual foi exposto previamente) e memórias associativas formadas pelo condicionamento clássico e o operante (Henke, 2010; Tulving & Schacter, 1990).

O estabelecimento de uma memória passa pelos estágios de aquisição e consolidação, para posteriormente ser evocada durante a evocação (Figura 2). A aquisição se refere ao processo em que o aprendizado inicial ocorre, mediante a percepção dos estímulos sensoriais durante a sessão de condicionamento (treino de aquisição), formando a representação da associação CS+US (Abel & Lattal, 2001). A consolidação é um estágio posterior e mais longo, que converte a memória de um estado lábil para um estado mais estável, para que seja armazenada. As novas informações provenientes da aquisição são fixadas em nível celular e sistêmico. Ao manipular a consolidação, memórias podem tornar-se mais acentuadas ou mais fracas (Abel & Lattal, 2001; Dudai et al., 2015). Na fase da evocação, um estímulo é capaz de reativar o traço de memória (fase de teste), fazendo emergir comportamentos ou representações mentais. Nesse estágio, a memória já consolidada está sujeita a modificações por interferências e novas experiências, caracterizando a reconsolidação (McKenzie & Eichenbaum, 2011).

Estudos em memória utilizam de ferramentas e períodos determinados para manipular cada uma dessas fases. Por exemplo, o uso de fármacos pode ser aplicado após a aquisição, ou seja, após pareamento CS+US, de modo a interferir somente na consolidação, como mostrado na Figura 2. Atualmente, novas metodologias, como a optogenética, permitem uma delimitação temporal precisa na manipulação neuronal, o que consiste numa de suas grandes vantagens. No presente estudo, utilizamos ferramentas farmacológicas aplicadas antes do treino, por exemplo, de modo a interferir na aquisição e fases iniciais da consolidação da memória.



**Figura 2. Estágios da memória e tipos de manipulações experimentais.** A. Aquisição, consolidação e evocação de uma memória de medo contextual. Na aquisição, o animal é colocado em uma caixa, onde associa o contexto, o som e o choque. Durante a consolidação, o animal retorna à sua habitação (homecage). Na evocação, o animal é colocado no contexto condicionado e a memória é acessada pela quantificação do comportamento de congelamento (*freezing*). B. Diferentes manipulações sobre os estágios da memória. As áreas coloridas denotam o curso temporal da manipulação sobre as fases da memória. Manipulações farmacológicas apresentam, dentre as mostradas na figura, aquela de maior especificidade temporal. Manipulações genéticas clássicas resultam no gene de interesse estando presente ou ausente em todas as etapas da memória. Lesões estão presentes durante o estágio de interesse e os estágios subsequentes (Fonte: Abel and Lattal 2001).

### 1.3. Bases neurofisiológicas da memória de medo condicionado ao som

As memórias de medo condicionado podem ser classificadas em duas categorias, a depender do conteúdo do estímulo condicionado (CS). Quando este é composto pelo contexto (polimodal), que reúne os variados aspectos de um ambiente, como componentes visuais, olfatórios, auditivos, dentre outros, a memória é denominada de memória de medo contextual. Esta é predominantemente dependente do hipocampo, região onde se estabelece inicialmente a representação do contexto (Smith & Bulkin, 2014). Quando é formado por uma pista discreta (unimodal), como um som, denomina-se memória de medo condicionado “à pista” (*cued fear memory*). Esta última é relativamente independente do hipocampo, visto que estudos clássicos usando lesões



hipocampais mostraram prejuízo seletivo somente às respostas ao contexto, e não ao som (Kim & Fanselow, 1992). Neste estudo, utilizamos o medo condicionado ao som (CS), que é uma pista discreta.

### *Substratos neurais do medo condicionado ao som*

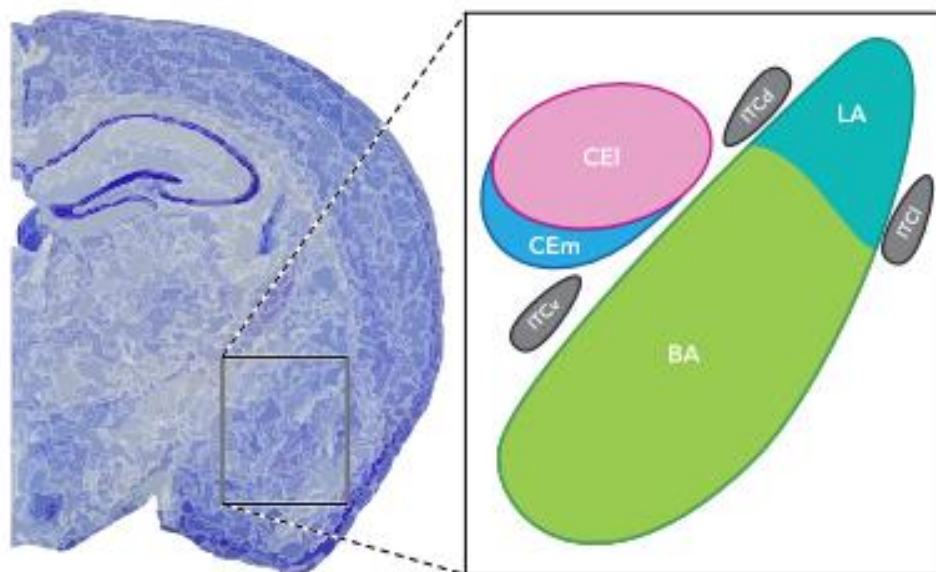
Considerado o principal substrato neural da memória de medo condicionado ao som, a **amígdala** (ou complexo amigdalóide) é uma estrutura localizada no lobo temporal, cuja interação funcional com áreas do sistema límbico lhe conferem uma relação estreita com respostas emocionais. A amígdala participa tanto da aquisição quanto do armazenamento das memórias de medo condicionado (Medina et al., 2002). Lesões nesta região, em roedores (LeDoux et al., 1990) e humanos (Adolphs et al., 1994), demonstram sua importância no reconhecimento de estímulos ameaçadores, bem como na aprendizagem de aspectos relacionados à emoção.

A amígdala é uma região cerebral heterogênea composta por núcleos com anatomia, fisiologia e composição neuronal diferenciadas. São eles: o núcleo basolateral (BLA), núcleo central (CeA), núcleo medial (MeA) e as células intercalares (ITCs) (Figura 3). Os núcleos BLA, CeA e ITCs estão intimamente relacionados ao medo condicionado, enquanto que o núcleo MeA assume um papel no medo inato induzido por pistas olfatórias do predador ou de co-específicos (Keifer et al., 2015; Silva et al., 2016).

A amígdala basolateral (BLA) é considerada uma estrutura semelhante ao córtex, apresentando em sua maioria neurônios glutamatérgicos, enquanto as comunicações neuronais na CeA (semelhante ao estriado) são predominantemente inibitórias, por meio do neurotransmissor GABA (Ehrlich et al., 2009). A BLA é subdividida em amígdala lateral (LA) e basal (BA). Conexões recíprocas com o hipocampo ventral estão implicadas no medo contextual e ansiedade (Felix-Ortiz et al., 2014). Além disso, BLA projeta-se para estriado, tálamo, córtex cerebral, hipotálamo e BNST. A porção pré-límbica do mPFC projeta-se para a BLA, sustentando as respostas defensivas após o condicionamento ao medo (Burgos-Robles et al., 2009).

A porção central (CeA) é funcionalmente dividida em núcleo central lateral (CeL) e medial (CeM). A CeL é composta primariamente por circuitos inibitórios locais. Ela recebe informações sensoriais do tálamo, córtex e núcleo parabraquial (PBN) e regula as projeções de longo alcance da CeM. Além disso, recebe regulação indireta do córtex pré-límbico (mPFC-PL), importante para a inibição adaptativa da expressão do medo. Já a

CeM constitui a principal saída da amígdala. Recebe projeções da CeL, do BNST e córtex infralímbico (IL) (Keifer et al., 2015). Como um todo, a amígdala central conecta-se a regiões efetoras que farão emergir comportamentos de medo e adaptações fisiológicas, tais como o hipotálamo lateral (LH), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), hipotálamo dorsomedial (DMH), área pré-óptica medial (mPOA) e substância cinzenta periaquedutal (PAG), além de núcleo de trato solitário (NTS) e área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) (Keifer et al., 2015).



**Figura 3. Divisões da amígdala.** A principal divisão anatômica e funcional se dá em núcleo basolateral (BLA) e central (CeA). A BLA é composta pelo núcleo lateral (LA) e basal (BA) e a CeA é composta pelo núcleo central lateral (CeL) e medial (CeM). Massas de células intercalares formam três clusters dispostos ao redor da BLA (ITCl, ITCd e ITCv). Fonte: (Keifer et al., 2015)

Circundando a BLA e na fronteira desta com a CeA, existem as massas de células intercalares (*intercalated cells*, ITCs), que são *clusters* densos de células GABAérgicas que participam do microcircuito da amígdala e recebem projeções de áreas sensoriais e regulatórias (Lee et al., 2013). Consistem em três *clusters*, sendo dois menores próximos à LA, ITC dorsal (ITCd) e lateral (ITCl), e um próximo à BA, sendo ele o maior e considerado principal, denominado ITCv (ventral) ou *main* ITC (Busti et al., 2011). Os ITCs são alvos de regulação pelo córtex pré-frontal infralímbico, que está envolvido na extinção do medo por meio da inibição dos *outputs* amigdalares da CeM pela ação dos neurônios inibitórios do ITCv (Duvarci & Pare, 2014).

## *O circuito neural do medo condicionado*

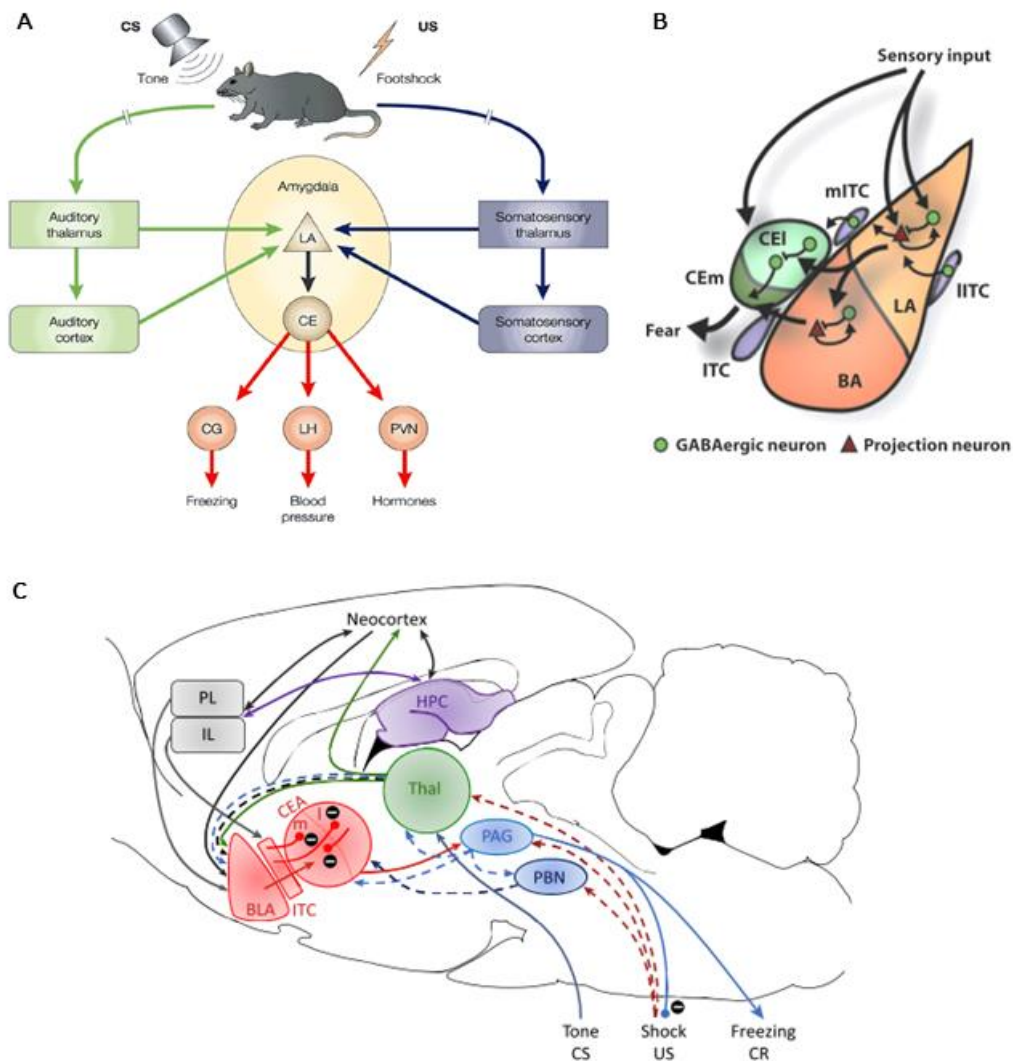
No modelo simplificado do circuito de medo, que consiste numa representação seriada, as informações do CS e US convergem e se integram na amígdala lateral (LA) (J. LeDoux et al., 1990; Romanski et al., 1993). A apresentação posterior do estímulo condicionado recruta neurônios cujas sinapses foram facilitadas pelo condicionamento, fazendo com o que CS consiga, por si só, eliciar comportamentos de medo, pela ativação da via de saída da amígdala (LeDoux, 2000; Medina et al., 2002) (Figura 4A).

As vias aferentes que transportam as informações a respeito do estímulo auditivo são bem elucidadas. O tálamo e o córtex contatam células piramidais da LA e fornecem o *input* do CS (Kim & Cho, 2017; Kwon et al., 2014), porém o tálamo, na ausência do córtex, é suficiente para mediar o condicionamento ao medo auditivo (Romanski & LeDoux, 1992) (Figura 4A). As informações do CS também alcançam neurônios inibitórios locais e do ITCl, que modulam processos de plasticidade na LA em resposta aos estímulos sonoro (Ehrlich et al., 2009).

Quanto à informação sensorial do choque, há evidências consistentes para afirmar que a convergência CS-US ocorre na LA, visto que esta responde a estímulos nocivos, e que algumas dessas mesmas células também respondem ao estímulo auditivo (Romanski et al., 1993). Entretanto, a única via de nocicepção que foi demonstrada em detalhes envolve as projeções do núcleo parabraquial (PBN) para a CeA, cujas aferências são oriundas da via espino-parabraquial (Palmiter, 2018). O PBN e a CeA são essenciais para o processamento central da dor (Han et al., 2015) (Figura 4C). Sugere-se também que as informações sensoriais relacionadas à dor sejam enviadas à LA pelo tálamo e córtex (LeDoux, 2000).

Quando os estímulos convergem na LA, fenômenos de plasticidade, como potenciação de longa duração (LTP), se estabelecem seletivamente nas vias que receberam estímulos auditivos, de maneira CS-específica (Kim & Cho, 2017; Rogan et al., 1997). Tais modificações são duradouras e dependentes da relação de causalidade entre CS e US, e fazem paralelo com as mudanças no comportamento derivadas da associação aprendida. Como mencionado, esses fenômenos plásticos estão sob controle de interneurônios locais e células dos ITCs. Quando o CS é reapresentado, tendo estabelecido a associação CS-US, ele passa a ser capaz de ativar neurônios na LA, que se conectam a CeA diretamente, ou via amígdala basal (BA) ou indiretamente pelos neurônios GABAérgicos do ITC, ativando as vias de saída do circuito do medo. As

projeções para áreas efetoras partem da CeA (Figura 4). LeDoux et al. identificaram as áreas cerebrais contatadas pela CeA responsáveis por esta expressão: inativando regiões efetoras, os autores demonstraram que o tronco cerebral (PAG) e hipotálamo são responsáveis pela supressão de comportamentos motores (*freezing*) e pela alteração da pressão arterial, respectivamente (LeDoux et al., 1988). A inativação da CeA como um todo, ou somente da CeM, impede a expressão do medo, porém o mesmo não ocorre quando somente a CeL é inativada (Ciocchi et al., 2010). Desta forma, o principal *output* do complexo amigdalóide é a CeM.



**Figura 4. Macro- e microcircuito do medo condicionado ao som.** A. Modelo simplificado do macrocircuito do medo, em que as informações sensoriais provenientes do tálamo e córtex alcançam a LA. A ativação da CeA pela LA provoca alterações comportamentais e endócrinas defensivas (Medina et al. 2002). B. Microcircuito da amígdala. Informações sensoriais chegam à LA e CeA. Redes inibitórias regulam o *output* comportamental (Ehrlich et al.2009). C. Áreas envolvidas na percepção da dor (PBN, PAG e tálamo) e na percepção do som (tálamo) enviam projeções diretas e indiretas para a amígdala. O *freezing* é controlado pela rede local inibitórias da amígdala, pelo córtex pré-frontal medial e neocórtex. O hipocampo provê informações sobre o contexto, regulando o mPFC na extinção da memória de medo condicionado (Pellman et al. 2016).

## *Realocando a CeA dentro do circuito do medo condicionado*

Estudos que relacionam a inibição da CeA com déficit na aprendizagem do medo condicionado desafiaram a visão tradicional que se tinha sobre o circuito do medo (Ciocchi et al., 2010; Wilensky et al., 2006). Hoje, a CeA é reconhecida: 1) pela heterogeneidade de tipos celulares, funcionalmente e geneticamente definidos, 2) pelo importante papel na plasticidade subjacente à memória de medo, 3) pela capacidade de regulação de subnúcleos do próprio complexo amigdalóide, e 4) por receber regulação de áreas extra-amígdala, como mPFC, e intra-amígdalares, como ITC, por meio de conexões diretas ou indiretas ou por neuromoduladores, que dão forma a esta memória (Keifer et al., 2015).

Ciocchi e colaboradores (2010), utilizando inativação das sub-regiões da amígdala central, demonstraram que o papel da CeL e CeM são dissociáveis, estando a CeL mais relacionada aos processos de aquisição da memória, e a CeM engajada na expressão do medo, regulada pela CeL (Ciocchi et al., 2010). Por isso, a CeL tem recebido enorme atenção e sua fisiologia vem sendo dissecada em detalhes, buscando encontrar marcadores celulares que definam subpopulações neuronais cujas contribuições para o circuito diferem entre si.

Encontrou-se que, após o condicionamento ao medo, as populações GABAérgicas da CeA podem ser divididas em neurônios que respondem ao CS (CeL-ON), neurônios que são inibidos pela apresentação do CS (CeL-OFF) e aqueles cuja atividade neuronal não se altera (Duvarci et al., 2011). Observou-se que uma subpopulação distinta e bem conhecida, composta pelos neurônios que expressam somatostatina (SOM+), são responsivas ao CS e sua ativação é necessária para a expressão do medo, configurando-a como as células CeL-ON (Li et al., 2013). Constatou-se também que a maioria das CeL-OFF compõem um segundo grupo neuronal, que expressa a proteína kinase C (PKC- $\delta$ +), composto pelos neurônios que desinibem a CeM (Haubensak et al., 2010). O modelo atual assume que as CeL-ON (SOM+) inibem as CeL-OFF (PKC- $\delta$ +), resultando em desinibição dos neurônios de projeção da CeM, de maneira CS-específica. Outra subpopulação descrita é composta por neurônios que expressam CRF (fator liberador de corticotrofina). Fadok e colaboradores (2017) discriminaram as subpopulações engajadas na resposta ativa e na resposta passiva, sendo elas os neurônios CRF+ e SOM+, respectivamente, que se inibem de forma recíproca (Fadok et al., 2017). Portanto, a CeL

é um subnúcleo cuja diversidade reflete uma complexidade funcional ainda maior quando levamos em conta a identidade molecular dos seus neurônios (Figura 4B).

A atividade neuronal diferenciada em resposta ao CS não é somente uma consequência dos processos plásticos que ocorrem *upstream* à CeA. Evidências apontam a ocorrência de plasticidade sináptica em resposta ao condicionamento ao medo na própria CeA, havendo mudanças persistentes na atividade neural pós-pareamento. Duvarci e colaboradores (2011) demonstraram que, 24h após a sessão de treino, as CeL-OFF triplicaram em número, sem alteração na quantidade de CeL-ON. Tais dados sugerem um processo plástico na CeL *overnight* capaz de fortalecer a inibição mediada pelas células CeL-ON e possivelmente pelo ITCd, inibindo, no dia seguinte, um maior número de células (transformando-as em CeL-OFF) e facilitando a desinibição da CeM (Duvarci et al., 2011). Adicionalmente, viu-se que a inibição da potenciação sináptica nas células SOM+ da CeL impede a aquisição da memória de medo condicionado, demonstrando ocorrência de plasticidade local (Li et al., 2013). Por fim, o bloqueio da síntese proteica na CeA no momento da consolidação prejudica a formação da memória de medo (Wilensky et al., 2006). Esses achados colocam a CeA como sítio de alterações plásticas envolvidas na aquisição e consolidação da memória de medo.

Além de sofrer modificações em nível de microcircuito, a CeA também interage com outros subnúcleos da amígdala, como a BLA. Ao contrário do que se esperava numa visão em série do circuito, as projeções BLA-CeA são bidirecionais. Recentemente, Yu *et al.* mostraram que a LA recebe aferências da CeA contendo informações sobre o US (via PBN), contribuindo assim para a plasticidade na LA durante o condicionamento (Yu et al., 2017). De maneira interessante, os novos dados demonstrados nesse estudo contrariam o modelo tradicional unidirecional, no qual a informação fluía sempre da BLA para CeA.

Por fim, a CeA é modulada por várias outras regiões cerebrais bem como por neuropeptídeos diversos. O córtex pré-frontal medial pré-límbico (mPFC-PL) está envolvido na expressão do medo e a porção infra-límbica (IL), na extinção do medo. Suas projeções atingem a CeA de modo a regular a expressão dos comportamentos defensivos. Neuropeptídeos como ocitocina, vasopressina, fator de liberação de corticotrofina (CRF), dentre outros, também agem na CeA, modulando as respostas de medo (Keifer et al., 2015).

Antes vista como apenas uma estação de retransmissão, modelos mais recentes têm atribuído à CeA funções ativas em comportamentos adaptativos. Novas evidências

apontam até mesmo para um papel ainda mais complexo: funcionar como unidade integradora, que exerce todas as funções descritas acima combinando os *inputs* sensoriais com informações sobre o estado interno do indivíduo, gerando respostas adaptativas escalonáveis (Fadok et al., 2018). Deste modo, a visão contemporânea do circuito do medo condicionado realoca a CeA, posicionando-a como um componente importante para aquisição e regulação do medo condicionado, para coordenação de emoções e para seleção de respostas adequadas e adaptativas.

#### **1.4. O circuito do medo pode apresentar diferenças sexuais**

Do ponto de vista clínico, o estudo das diferenças sexuais no circuito do medo é de enorme relevância. Estudos epidemiológicos apontam uma maior susceptibilidade em mulheres de apresentar distúrbios psiquiátricos relacionados à ansiedade e estresse pós traumático (PTSD), comparado a homens (Cover et al., 2014; Kessler et al., 2005). Logo, as mulheres tendem a sofrer com os sintomas de ansiedade e de PTSD por mais tempo, impactando negativamente em suas vidas. Tanto nos transtornos de ansiedade quanto no PTSD ocorre a incapacidade de inibir o medo aprendido (Cover et al., 2014), o que torna a aplicação do protocolo de condicionamento ao medo em modelos animais uma boa ferramenta de estudo em laboratório.

Identificar os fatores biológicos atrelados à diferença sexual na incidência de doenças psiquiátricas é indispensável para o desenvolvimento de terapias e fármacos devidamente direcionados aos sexos e às suas particularidades. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que incluem fêmeas como sujeitos experimentais. Numa busca realizada por Beery e Zucker (2012), dentre os artigos publicados em 2009 utilizando modelos animais no campo das neurociências, fisiologia e farmacologia, 50-60% foram realizados apenas em machos. Ainda mais impressionante foi a porcentagem (10-25%) dos estudos que sequer retrataram o sexo do animal utilizado. Isto demonstra um viés expressivo na produção científica, que negligencia o organismo feminino (Beery & Zucker, 2012).

Dentre os estudos em memória aversiva em roedores, a busca por diferenças entre machos e fêmeas no aprendizado e expressão do medo produziu dados conflitantes. Em estudos que utilizaram condicionamento do tipo *cued*, alguns apontam para uma pior performance em ratos (Maren et al., 1994) e camundongos (Rivas-Arancibia & Vazquez-Pereyra, 1994) fêmeas. Em outro estudo, ratas fêmeas apresentaram mais *freezing* após

condicionamento e mais dificuldade em extingui-lo (Fenton et al., 2014). Ainda, Cossio e colaboradores não encontraram qualquer diferença entre os sexos (Cossio et al., 2016).

Portanto, se existe diferença na aquisição ou fases posteriores da memória de medo entre os sexos, esta não é consistente entre os estudos. Quando as diferenças sexuais aparecem, a diferença observada pode ser um efeito indireto de outros aspectos, como alocação dos animais e manipulação. No entanto, a ausência de diferenças sexuais pode não retratar a realidade caso as flutuações hormonais em fêmeas sejam desconsideradas. É possível que as diferenças em relação aos machos emerjam somente em comparação a um *status* hormonal específico em fêmeas. É possível, ainda, que diferenças robustas emerjam entre esses *status*. Desta forma, é de suma importância considerar as flutuações hormonais nos estudos comportamentais e nos delineamentos que pretendem avaliar o papel dos hormônios femininos nas tarefas de medo. Ainda, é importante avaliar o efeito da privação de tais hormônios, em decorrência da menopausa, característico das mulheres.

### **1.5. Flutuações hormonais e menopausa em mulheres e roedores**

#### *Flutuações hormonais em mulheres*

Em mulheres em fase reprodutiva, o ciclo menstrual é dividido em três fases que ocorrem em média a cada 28 dias. São elas a fase folicular, ovulatória e lútea (Figura 5). Juntamente ao início do sangramento menstrual, inicia-se a fase folicular. Durante a primeira metade desta fase, os níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) começam a subir. A estimulação pelo FSH estimula o folículo dominante no ovário a secretar estradiol (E2). Progesterona e andrógenos mantêm-se baixos. Durante a segunda metade, a razão LH/FSH começa a subir e esta alteração é acompanhada por níveis crescentes de E2, que atingem seu pico pouco antes da fase ovulatória. O hormônio luteinizante é o sinal fisiológico para a ovulação. Na fase ovulatória, que pode durar de 1 a 3 dias, os níveis de estradiol caem abruptamente, mas voltam a subir na fase lútea. A progesterona (P) começa a ser secretada pelo corpo lúteo, aumentando em dez vezes seus níveis plasmáticos. Esta é a principal característica da fase lútea, que se inicia após a ovulação e se encerra com a menstruação. Ao longo de toda a fase lútea, prevalece o *feedback* negativo pelos hormônios estradiol, progesterona e inibina A sobre o hipotálamo, suprimindo a secreção de FSH e LH. Na ausência de



fertilização, os níveis de estradiol e progesterona decaem e o FSH começa a ser novamente produzido pela hipófise. Como resultado, ocorre a menstruação, e outro ciclo de inicia (Berne & Levy, 2009).

Embora na linguagem popular muitos utilizem o termo “menopausa” para designar toda a fase de alterações no corpo da mulher decorrente da senescência ovariana, a menopausa conceitua-se como a cessação da menstruação, comprovada por amenorréia pelos 12 meses consecutivos (Freitas et al., 2004). A fase de transição entre o período reprodutivo para o não-reprodutivo é denominada climatério e inicia-se ainda antes desta última menstruação, podendo delongar-se por anos (Valença & Germano, 2010).

O climatério pode ser dividido em pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. A pré-menopausa caracteriza-se pela diminuição na fertilidade e geralmente inicia-se após os 40 anos de idade. A perimenopausa inicia-se dois anos antes da menopausa (ocorre entre 45-55 anos) e a ultrapassa em um ano. Nesta fase, os folículos tornam-se menos sensíveis às gonadotropinas, e em consequência os níveis de FSH e LH começam a aumentar de forma compensatória. A fase de pós-menopausa inicia-se um ano após a menopausa (Valença & Germano, 2010). Uma vez que os folículos não mais são recrutados, a secreção de estradiol pelos ovários é interrompida e o *feedback* negativo sobre as gonadotropinas cessa, aumentando ainda mais seus níveis. Baixas concentrações plasmáticas de estradiol são mantidas pela conversão periférica de precursores de andrógenos adrenais e ovarianos. Também ocorre a conversão de andrógenos à estrona (E1) pelo tecido adiposo, que se torna o estrógeno predominante em mulheres pré-menopausa (Suzuki et al., 1995)

### *Flutuações hormonais em roedores*

Roedores possuem um ciclo reprodutivo denominado ciclo estral que se repete, em média, a cada 4-5 dias. Este ciclo consiste em quatro fases, as quais refletem os níveis séricos dos hormônios ovarianos (estrógenos e progesterona): proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (*Figura 5*). O termo “estro” utilizado para nomear as fases do ciclo foi adaptado da palavra grega *oistros*, que significa “frenesi” ou “loucura”, para denotar a fase de receptividade sexual das fêmeas (Cora et al., 2015).

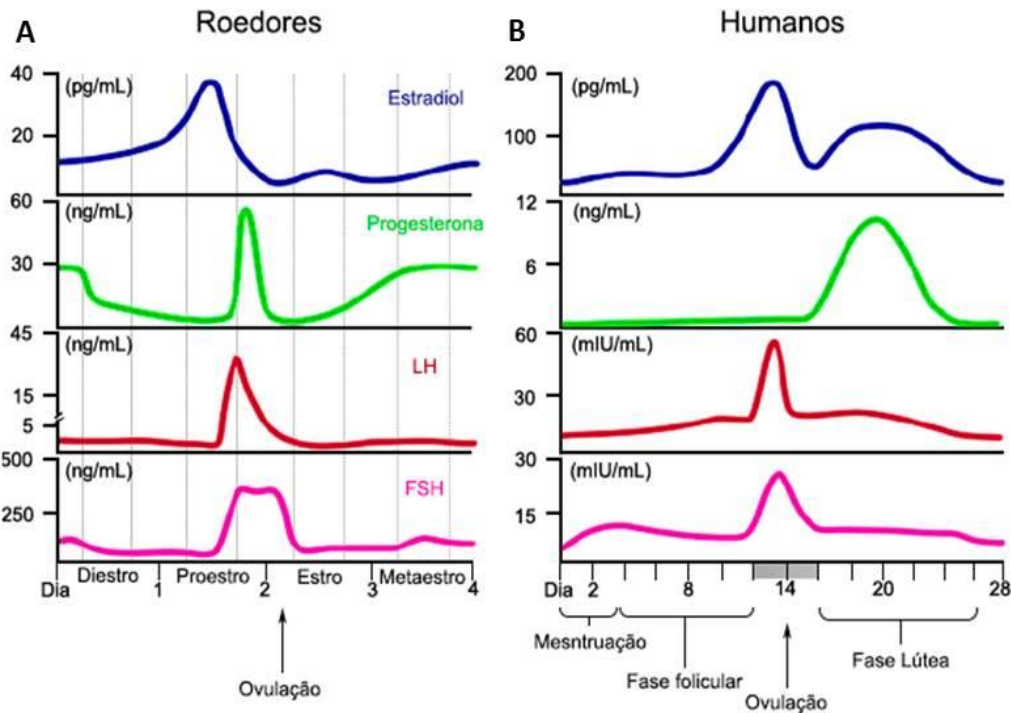
Alterações comportamentais e hormonais ocorrem em paralelo. O proestro é uma fase curta de aproximadamente 14h, na qual os níveis séricos de E2 se elevam e atingem o pico. Ao final do dia, ocorre o pico pré-ovulatório de LH e FSH. A ovulação ocorre na

noite do proestro e é acompanhada por alterações no comportamento sexual, promovendo receptividade. Na manhã do dia seguinte (estro), o nível de LH retorna a seus valores basais. O FSH possui dois picos, sendo um juntamente ao LH e outro no estro, e em seguida decai. Após a ovulação, o E2 cai gradativamente e retorna ao seu nível basal também na fase de estro. Um pico similar ao do LH ocorre na curva de progesterona, com um primeiro aumento na tarde do proestro. Um segundo aumento ocorre no metaestro (ou diestro I) em decorrência da secreção pelo corpo lúteo, e gradativamente atinge altas concentrações no diestro (diestro II), até que o corpo lúteo regride e a progesterona decai rapidamente. Os níveis de estradiol sanguíneo permanecem baixos no metaestro. O diestro é a fase mais extensa do ciclo, podendo durar de 48-72h em camundongos e ratos. Ao final do diestro, os níveis de estradiol voltam a subir e favorecem o pico de gonadotropinas. Os níveis de LH e FSH mostram-se quase inalterados durante o ciclo, exceto na fase ovulatória (Caligioni, 2010; Cora et al., 2015; M. S. Smith et al., 1975).

Roedores também apresentam senescência ovariana que leva ao aparecimento de sintomas semelhantes ao da perimenopausa em mulheres. Camundongos experimentam este declínio entre 13-14 meses de idade e exaustão folicular aos 24 meses (Nelson et al., 1995). Naturalmente, apresentam, assim como humanos, o declínio dos folículos, aparecimento de ciclos irregulares, secreção hormonal alterada e perda da fertilidade, tornando-se um bom modelo de estudo da pós-menopausa (Brinton, 2012). Fêmeas podem exibir dois fenótipos endócrinos na perimenopausa, o anestro ou estro constante. O primeiro é o modelo que mais mimetiza a pós-menopausa humana devido à queda acentuada e consistente tanto de estradiol quanto progesterona. No estro constante, os níveis de estradiol são sustentados por um período transitório. Aqueles que passam por estro constante eventualmente apresentarão anestro, mas a fase de estro causa alterações cerebrais durante a transição (Yin et al., 2016). Este modelo não permite dissociar os efeitos do envelhecimento aos efeitos da menopausa, o que pode ser positivo a depender do que se deseja investigar.

Com uma estratégia cirúrgica, é possível mimetizar a senescência ovariana pela retirada bilateral dos ovários, chamada de ovariectomia (OVX). Os níveis de estradiol no plasma decrescem dentro de 1-2 semanas. Essa intervenção geralmente é realizada em animais jovens, portanto as alterações causadas pelo envelhecimento, concomitantes às flutuações hormonais da peri-menopausa, não são consideradas neste modelo. É importante salientar que as alterações percebidas após poucas semanas de ovariectomia não refletem necessariamente as mesmas alterações a longo prazo, visto que os órgãos

tentam compensar a ausência crônica dos hormônios. Portanto, as conclusões retiradas de estudos com ovariectomia devem levar em conta o tempo pós-cirurgia em que as observações foram realizadas (Brinton, 2012).



**Figura 5. Variação plasmática dos hormônios estradiol, progesterona, LH e FSH ao longo da fase reprodutiva de roedores e humanos.** A. Ciclo estral de roedores dividido em diestro, proestro, estro e metaestro. B. Ciclo menstrual humano dividido em mesnstruação, fase folicular e fase lútea.

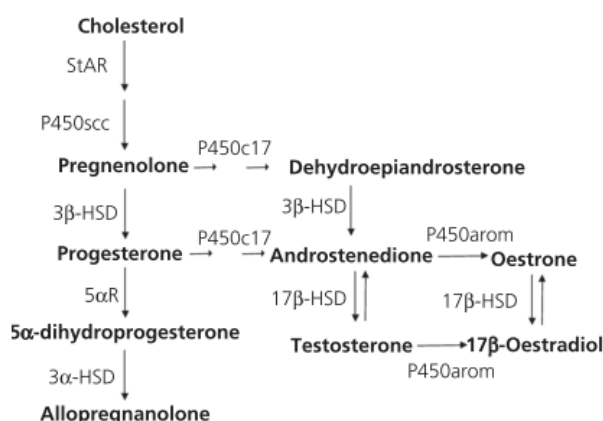
### 1.6. Estrógenos: síntese e receptores

Atuando como hormônios, estrógenos (E) são moléculas sinalizadoras com função endócrina clássica: realizam transmissão de sinais da célula de origem às células-alvo distantes pela circulação sanguínea. Estrógenos são produzidos principalmente nos ovários com acentuado efeito sobre proliferação celular e crescimento de tecidos ligados à reprodução (Berne & Levy, 2009). Porém, outros órgãos, como a glândula adrenal, tecido adiposo e até mesmo o cérebro são capazes de sintetizá-los. Desta forma, além dos efeitos sobre a reprodução feminina, os estrogênios também desempenham papel na regulação da homeostase esquelética, metabolismo lipídico e de carboidratos, equilíbrio eletrolítico, fisiologia da pele, sistema cardiovascular e sistema nervoso central. Assim,

estrógenos assumem um papel muito mais abrangente, com funções parácrinas e autócrinas (Vrtačnik et al., 2014).

Ao longo da vida reprodutiva da mulher e após a menopausa, os estrógenos presentes no organismo variam seus níveis plasmáticos relativos dentre suas três formas: estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3). O estradiol (17 $\beta$ -estradiol) é a forma mais potente do hormônio e caracteriza a fase reprodutiva da mulher. A estrona é o estrógeno prevalente após a menopausa. Já o estriol é sintetizado durante a gravidez.

Situados na classe dos hormônios esteroides, a síntese dos estrógenos inicia-se pela molécula precursora colesterol. O passo inicial é a síntese de pregnenolona, que pode ser convertida em progesterona, testosterona e finalmente, pela enzima aromatase (P450Arom), em estradiol (Rossetti et al., 2016) (*Figura 6*). Todas as enzimas esteroidogênicas envolvidas nessa conversão foram demonstradas no cérebro de mamíferos, particularmente em neurônios do hipocampo (Hojo et al., 2004; Hojo et al., 2008) e amígdala (Bender et al., 2017).



**Figura 6. Síntese de neuroesteróides.** Neurônios expressam P450sc, P450c17, 3b-HSD, 5a-reductase e P450arom e produzem Preg, DHEA, androstenediona, AlloP e E2. *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR); *cytochrome P450 side chain cleavage* (P450sc); *3b-hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4-isomerase* (3b-HSD); *cytochrome P450 17a-hydroxylase/c17,20-lyase* (P450c17); *steroid 5a-reductase* (5aR); *3a-hydroxysteroid dehydrogenase* (3a-HSD), *17b-hydroxysteroid dehydrogenase* (17b-HSD) e *cytochrome P450arom* (P450arom).

O estradiol exerce seus efeitos sobre a célula alvo através da ligação com receptores de estrógenos (ER). Atualmente, são descritos três tipos: ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPER (*G-coupled protein receptor*). Os efeitos do E2 podem ser genômicos, ocorrendo após a interação entre E2 - que atravessa livremente a membrana plasmática - e receptores

clássicos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), nucleares ou citoplasmáticos, que atuam como fatores de transcrição. Na forma de um complexo, o E2 ligado ao receptor é translocado até o núcleo celular e juntos exercem controle sobre a expressão de genes que contém o *elemento responsivo ao estrógeno* (ERE) (Woolley, 2007). O GPER foi descrito mais recentemente e é encontrado exclusivamente em sítios extranucleares (dendritos, axônios, terminais sinápticos e corpo celular) intimamente relacionado aos efeitos não genômicos do estradiol (Akama et al., 2013; Brailoiu et al., 2006). Os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  também exercem efeitos não genômicos por intermédio de alterações em cascatas de sinalização intracelular, quando localizados associados à face interna da membrana plasmática ou no citoplasma (Fernandez et al., 2008; Woolley, 2007).

Nos neurônios, os ERs podem ocupar sítios extranucleares, ao longo dos axônios, dendritos e sinapses. ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPER foram detectados em dendritos e axônios de neurônios hipocampais (Akama et al., 2013; Milner et al., 2005). Ainda, ERs foram identificados nos botões pré-sinápticos e nas espinhas dendríticas pós-sinápticas na região CA1 do hipocampo e associados à vesículas pré-sinápticas contendo glutamato ou GABA (Hart et al., 2007; Tabatadze et al., 2013). A distribuição esparsa dos ERs nos neurônios ajuda a explicar seus variados efeitos agudos, não-genômicos, e efeitos a longo prazo, genômicos.

Os receptores de estrógenos são amplamente expressos em diversas regiões do cérebro, tanto de humanos (Österlund et al., 2000; Osterlund et al., 2000) quanto de roedores (Merchenthaler et al., 2004). Os primeiros estudos que identificaram precisamente as regiões alvo desses hormônios empregaram a autorradiografia com 3H-estradiol. Então vieram os estudos com técnicas mais precisas e específicas para cada tipo de receptor, com uso de anticorpos e hibridização *in situ* de mRNA. Os locais mais explorados foram os núcleos hipotalâmicos previamente associadas ao comportamento sexual e síntese de gonadotrofinas (Merchenthaler et al., 2004; Mitra et al., 2003; Osterlund et al., 1998; Stumpf & Sar, 1971; Weiland et al., 1997). Encontrou-se também ligação do E2 e a presença de seus receptores em regiões associadas ao aprendizado e memória, incluindo o núcleo central da amígdala (CeA) (Stumpf & Sar, 1971). Weiland e colaboradores mostraram que o hipocampo e córtex de ratos, fêmeas e machos, também contêm ERs (Weiland et al., 1997). Estudos mais recentes passaram a discernir a localização específica dos tipos de receptores de estrógeno no cérebro, mostrando que a amígdala, por exemplo, concentra mais receptores do tipo ER $\alpha$ , e em menor número ER $\beta$  e GPER (Osterlund et al., 1998; Tian et al., 2013). Já no hipocampo, a maior densidade é

do receptor tipo  $\beta$  (Weiser et al., 2009), embora também apresente os outros dois (Brailoiu et al., 2006; Mitra et al., 2003).

O estradiol regula a expressão de seus receptores em diversas áreas cerebrais, podendo ter efeito positivo ou negativo a depender da região cerebral e da espécie. No hipotálamo, a OVX causa *upregulation* dos ERs (Shughrue & Dorsa, 1992) e o tratamento com E2, em concentração fisiológica, em animais OVX (2 semanas) resulta em *downregulation* dos níveis de ER mRNA (Lauber et al., 1991; Liu & Shi, 2015; Simerly & Young, 1991). Os níveis de ER também flutuam ao longo do ciclo estral, mas o sentido da regulação foi núcleo específico num estudo com o hipotálamo (Shughrue & Dorsa, 1992) e variou conforme o tipo de ER no hipocampo (Mendoza-Garcés et al., 2011). Utilizando imunohistoquímica para detecção do ER $\alpha$ , dados coletados pelo nosso grupo demonstram alteração quantitativa de ER $\alpha$  nos subnúcleos do complexo amigdalóide em resposta a privação crônica de hormônios ovarianos (OVX 12 semanas), com *upregulation* em todos os subnúcleos, exceto o CeM.

### **1.7. Efeitos do estradiol (E2) sobre plasticidade e memória**

Os estrógenos (E) produzem no cérebro alterações fisiológicas que se refletem na aprendizagem (Frick, 2015), expressão de comportamentos (Estrada et al., 2018), neuroproteção (Garcia-Segura et al., 2000), interação com a atividade epiléptica (Taubøll et al., 2015), dentre outros. No estudo dos efeitos e mecanismos dos estrógenos na memória e aprendizagem, o hipocampo é a região que recebe maior foco.

Ações do estradiol são mediadas por alterações na morfologia e atividade elétrica de neurônios. Woolley e McEwen conduziram, em 1992, um estudo que foi essencial para demonstrar a ação do estradiol sobre tecidos não ligados à reprodução. Neste estudo, células piramidais do hipocampo dobraram o número de espinhas dendríticas em resposta ao tratamento de ratas com E2 em uma escala de tempo de dias (Woolley & McEwen, 1992). O mesmo foi confirmado mais tarde *in vitro*, com células hipocampais dissociadas (Segal & Murphy, 2001). Esse achado impulsionou uma extensa linha de pesquisa sobre o papel dos estrógenos na cognição. Mais tarde, os mesmos achados foram reproduzidos na CeA (Ferri et al., 2014)

Estudos em eletrofisiologia também emergiram concomitantemente e demonstraram que o estradiol altera propriedades eletrofisiológicas da membrana em várias regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo, amígdala e hipocampo. De forma geral,

os estudos mostram que o estradiol aumenta a excitabilidade celular. Por exemplo, na região CA1 do hipocampo, o estradiol tem efeito facilitador na despolarização da membrana neuronal e nos disparos de potencial de ação (Teyler et al., 1980; Wong & Moss, 1991, 1992). Ainda, facilita a plasticidade sináptica, aumentando a amplitude do potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) e reduzindo o limiar de disparo do potencial de ação em questão de minutos, apontando para um mecanismo de ação rápida do hormônio, não genômico (Wong & Moss, 1992). A LTP (potenciação de longa duração), importante modelo de indução de plasticidade sináptica, é amplificada de forma proeminente quando fatias hipocámpais são banhadas com E2 (Foy et al., 1999).

Com o estradiol modulando a atividade neuronal em questão de minutos, questionou-se como a velocidade das flutuações sistêmicas e as baixas concentrações plasmáticas, comparadas às necessárias para esses efeitos, seriam capazes de produzi-los fisiologicamente. Ocorre que a síntese local dos estrógenos pelos próprios neurônios se dá de forma rápida e é capaz de gerar concentrações hormonais supra-plasmáticas (Hojo et al., 2008). Impossibilitando a síntese local no hipocampo pelo tratamento com o antagonista de aromatase (letrozole) por sete dias, Bender *et al.* verificaram redução da densidade de espinhas dendríticas e abolição da LTP em fêmeas (Bender et al., 2017).

Várias cascatas de sinalização celular e processos epigenéticos foram implicados nas ações do estradiol sobre a melhora cognitiva (Fernandez et al., 2008; Zhao et al., 2010). No hipocampo dorsal, o E2 aumenta fosforilação da ERK, que ativa sinalização pela mTOR (Fortress et al., 2015) e fosforila CREB (Boulware et al., 2005; Boulware et al., 2013). A melhora na memória também depende da acetilação e da metilação de genes dependentes de E2 (A. M. F. and K. M. Frick, 2015), aumentando a expressão gênica de fatores promnésicos e inibindo a expressão de genes que atuam na direção oposta.

#### *Os efeitos do estradiol em testes de memória*

Diversas são as maneiras de acessar a contribuição dos estrógenos para a aprendizagem e memórias em modelos animais e as consequências de sua diminuição. Para simular as flutuações fisiológicas ou a senescência ovariana, pode-se utilizar fêmeas normociclantes ou ovariectomizadas (OVX, jovens ou envelhecidas), respectivamente. É possível administrar o E2 em diferentes doses, períodos de administração (agudo ou crônico) e diferentes vias (sistêmica ou centralmente) para avaliar sua contribuição aos processos cognitivos. O uso de agonistas ou antagonistas seletivos dos tipos de ERs ou

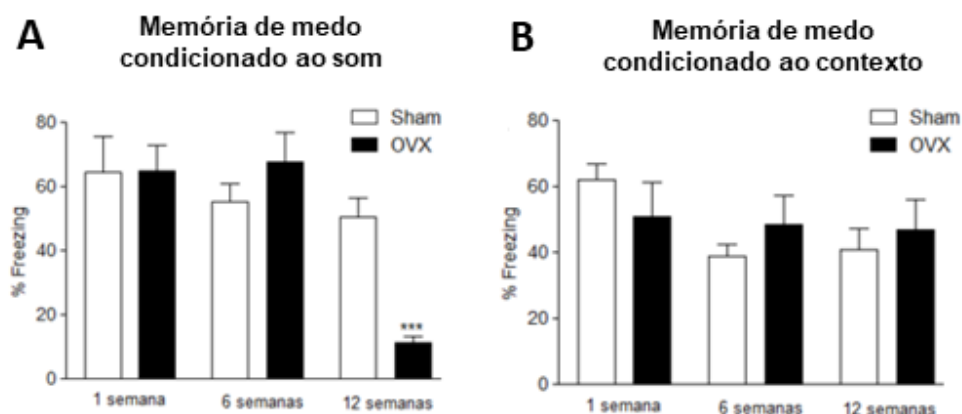
de *knock-out* para ERs permite identificar a contribuição de cada receptor aos efeitos encontrados. Ainda, é possível modular a atividade da aromatase combinada, ou não, à retirada dos ovários. Além disso, a determinação da fase do ciclo estral (em fêmeas normociclantes ou SHAM) ou as manipulações farmacológicas podem ser feitas sobre diferentes fases do teste de memória.

Em roedores, o hipocampo dorsal é fundamental para memórias episódicas e o efeito promnésico do E2 está bem demonstrado. Com apenas uma dose aguda de E2 pós-treino, animais mostram melhora na performance no teste de memória de reconhecimento do objeto (Fernandez et al., 2008; Pereira et al., 2014). Seu efeito promnésico ocorre em machos e fêmeas e limita-se à fase de aquisição ou às fases iniciais da consolidação, visto que não ocorre quando injetado 2h após o treino. Nosso grupo encontrou efeito da privação hormonal por OVX na mesma tarefa, com prejuízo da memória, recuperado pela terapia de reposição hormonal crônica com E2 (Fonseca et al., 2013). Também demonstrou a participação de ambos os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  na facilitação desta memória (Pereira et al., 2014).

Quanto ao efeito dos estrógenos sobre tarefas dependentes da amígdala, com foco para as tarefas utilizando pistas discretas como o condicionamento ao medo pelo som, o efeito do estradiol é bastante evidenciado sobre a extinção do medo condicionado, mas poucas são conclusões a respeito de seu efeito na aquisição das memórias de medo. Conduzindo experimentos de condicionamento ao medo com pistas visuais (CS) em humanos sadios, Milad et al. não constataram diferenças entre as fases do ciclo em mulheres, nem entre sexos na aquisição de medo (Milad et al., 2011). Entretanto, num estudo conduzido por (Wegerer et al., 2014), em que mulheres foram condicionadas a associar um som neutro (CS) à uma cena de filme com valência negativa (US), uma correlação negativa foi encontrada entre níveis de estradiol e respostas condicionadas (condutância da pele). Esse estudo aponta para uma facilitação do condicionamento em mulheres com níveis plasmáticos de estrógenos baixos. Em concordância com a potencial modulação dos substratos de medo pelo E2, na análise da atividade cerebral do circuito de medo durante a aquisição, mulheres em alta hormonal apresentaram maior ativação amigdalare e correlação positiva foi vista entre ativação da amígdala e estradiol (Hwang et al., 2015). Ainda, o reconhecimento de expressões faciais especificamente de medo foi facilitado em fases do ciclo em que os estrógenos estão em alta (fase pré-ovulatória) (Pearson & Lewis, 2005).



Em relação à fase do ciclo, roedores parecem não exibir diferenças, comportando-se de maneira similar durante teste da memória de medo condicionado (Chen et al., 2014; Cossio et al., 2016; Milad et al., 2009). Chen *et al.* não observaram alterações de plasticidade (LTP) comparando fêmeas normociclantes em diferentes estágios do ciclo. Entretanto, o mesmo estudo observou que a OVX por 3 semanas prejudicou a plasticidade sináptica na LA, revertida pelo tratamento com E2. Também em um modelo de pós-menopausa, nosso grupo demonstrou, pela primeira vez, que a OVX prolongada (12 semanas) produz prejuízos severos à memória de medo condicionada ao som (Tese de doutorado de Cristiane Bastos 2015), com animais OVX apresentando dificuldade de atribuir valência negativa ao som (*Figura 7*). Em uma privação mais curta (OVX 2 semanas), dois estudos relataram que o tratamento sistêmico de camundongos fêmeas com E2 por 10 dias aumentou significativamente o congelamento frente ao CS, demonstrando que o circuito de medo é sensível ao estradiol exógeno (Jasnow et al., 2006; Morgan & Pfaff, 2001).



**Figura 7. Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na memória de condicionamento ao medo.** **A.** Os grupos foram condicionados ao medo pelo som 1 (Sham n=5, OVX n=5), 6 (Sham n= 10, OVX n=7) e 12 (Sham n=6, OVX n=10) semanas após as cirurgias SHAM e OVX. **B.** Condicionamento ao medo pelo contexto 1 (Sham n=5, OVX n=5), 6 (Sham n=10, OVX n=7) e 12 (Sham n=6, OVX n=10) semanas após as cirurgias SHAM e OVX. \*\*\* (P<0.001) indica diferença entre os grupos no mesmo tempo analisado. Fonte: Tese de Doutorado de Cristiane Bastos (2015).

Curiosamente, em relação à extinção da memória de medo, observa-se que a magnitude do aprendizado de extinção varia conforme o ciclo estral de roedores, visto que animais em proestro apresentam melhores índices de extinção (M R Milad et al., 2009). Observa-se também o efeito promnésico do E2 na consolidação dessa memória em ratas em metaestro (Zeidan et al., 2011). Entretanto, Milad *et al.* encontraram que

níveis baixos de estradiol parecem facilitar a extinção em mulheres (Mohammed R Milad et al., 2011; Zeidan et al., 2011) enquanto que outro estudo constatou que mulheres utilizando contraceptivos (baixo E) comparadas à mulheres em fase lútea (E e P mais altos comparativamente) apresentaram pior aprendizado de extinção (Merz et al., 2012). Logo, são necessários mais estudos para concluir como os estrógenos atuam sobre a extinção do medo em mulheres.

Portanto, os dados indicam a participação dos estrógenos na formação, expressão e extinção da memória de medo, por uma ação direta e/ou indireta sobre a atividade amigdalár. Não se sabe, entretanto, de que maneira o estradiol atua especificamente na amígdala, se todos os subnúcleos são alvos de seus efeitos e quais mecanismos estão envolvidos.

### **1.8. Interação entre estradiol e o neurotransmissor GABA**

A CeA é um núcleo majoritariamente composto por neurônios inibitórios e a literatura relata a interação entre os estrógenos e o sistema GABAérgico em regiões cerebrais tais como o hipocampo e hipotálamo (Handa et al., 2012). Outras regiões, como a amígdala, podem ser um cenário de interação entre os dois sistemas.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Consiste em um aminoácido que exerce inibição pela ligação a receptores de GABA que podem ser ionotrópicos (GABA-A e GABA-C) ou metabotrópicos (GABA-B). Os receptores ionotrópicos são proteínas de membrana que formam um canal iônico permeável ao cloreto. Quando ligados ao neurotransmissor, correntes de saída são elevadas, gerando hiperpolarização. O principal receptor de ação rápida no SNC é o GABA-A, majoritariamente formado por duas subunidades  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma  $\gamma$ , mas inclui outras possibilidades de combinação com subunidades diferentes. A distribuição dessas combinações varia conforma o tecido e a população celular. Por exemplo, dendritos, axônios e corpos celulares neuronais são sítios extrassinápticos que podem conter este receptor, mas frequentemente apresentam  $\delta$  e  $\epsilon$  no lugar de  $\gamma$ . Em baixas concentrações, GABA é capaz de produzir correntes inibitórias basais em muitos neurônios por meio desses receptores GABA-A extra-sinápticos, difundindo-se no líquido cefalorraquidiano e nos espaços intersticiais e produzindo inibição tônica (Forman et al., 2009).

A síntese do GABA se dá pela descarboxilação do glutamato pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), que existe em duas formas GAD65 e GAD67. O transportador vGAT condiciona o GABA em vesículas pré-sinápticas, que são liberadas mediante despolarização do terminal pré-sináptico. Após liberação, o GABA é recaptado por transportadores de GABA (GAT) e reconvertido a glutamato após reações na mitocôndria (Forman et al., 2009).

As duas isoformas de GAD sintetizam GABA e coexistem na maioria dos neurônios GABAérgicos. Porém, diferem em nível celular quanto à localização e destino do produto e em nível tecidual quanto às proporções em que são expressas. A localização da GAD65 preferencialmente nos terminais nervosos sugere sua participação na síntese do neurotransmissor associado a vesículas, logo destinado à demanda sináptica (Tian et al., 1999). Já a forma GAD67, encontrada mais uniformemente tanto no corpo celular quanto nos terminais, fornece GABA para transmissão sináptica, aparentemente por liberação não-vesicular, e para suprir o metabolismo celular no ciclo de Krebs. GAD67 é responsável por suprir a maior parte da síntese de GABA no organismo, visto que animais GAD67<sup>-/-</sup> possuem 10% dos níveis normais de GABA, enquanto em animais GAD65<sup>-/-</sup> as alterações nos níveis de GABA são sutis (Asada et al., 1997; Asada et al., 1996). O circuito de medo é afetado pelos níveis de GAD (Bergado-Acosta et al., 2008; Heldt et al., 2012). Na BLA, animais *knockdown* para GAD67 apresentaram prejuízos à extinção da memória de medo (Heldt et al., 2012). Quanto ao GAD65, sua deleção em animais mutantes (GAD65<sup>-/-</sup>) resulta em generalização do medo aprendido (Bergado-Acosta et al., 2008).

Existe uma relação direta entre a expressão das enzimas GAD e a sinalização por estrógenos: os níveis de mRNA GAD respondem ao estradiol (Hudgens et al., 2009; McCarthy et al., 1995). O estradiol também pode interagir com o sistema GABAérgico de outras maneiras. Por exemplo, a neurotransmissão GABAérgica sobre os neurônios piramidais do hipocampo foi reduzida pelo tratamento com E2 por 2 dias consecutivos, auxiliando o incremento de espinhas dendríticas (Murphy et al., 1998). Dado que a maior parte das células ER $\alpha$  no hipocampo são GABAérgicas (Hart et al., 2001), é possível que o efeito do E2 sobre a excitabilidade hipocampal seja mediada por interneurônios responsivos aos estrógenos.

Na amígdala, pouco se sabe a respeito da atuação dos estrógenos sobre a aquisição das memórias de medo e se esses hormônios interagem com os neurônios GABAérgicos. Encontramos que fêmeas C57/BL6 ovariectomizadas por 12 semanas possuem prejuízo

no condicionamento ao medo pelo som, sem alteração no condicionamento ao medo contextual (Figura 7). Esse dado aponta para uma regulação pelos estrógenos da memória de medo dependente de amígdala, mas os mecanismos envolvidos ainda precisam ser desvendados.

Portanto, esta dissertação investigou a participação da CeA na aquisição da memória de medo em fêmeas, levando em consideração o papel dos estrógenos. Testamos o efeito dessa classe de hormônios sobre a amígdala em modelo de pós-menopausa (OVX 12 semanas) e em fêmeas normociclantes, além de utilizar manipulações farmacológicas para ativar e inibir a CeA nesses animais. Para verificar o efeito direto do hormônio sobre a amígdala, administramos intra-CeA estradiol sintético e antagonistas, a depender do modelo animal. Ainda, investigamos a interação da sinalização pelo estradiol com o sistema GABAérgico na CeA por meio da análise de imunorreatividade ao GAD65/67 em tecidos de fêmeas OVX e normociclantes.

## 2. JUSTIFICATIVA

O medo é uma das emoções primárias e universais e está intimamente ligado à sobrevivência. Entretanto, quando o medo se torna excessivo, esta emoção passa a caracterizar quadros patológicos, como desordens de ansiedade e a síndrome do estresse pós-traumático. Sabe-se ainda que os distúrbios psicológicos apresentam dimorfismo sexual, estando as mulheres mais susceptíveis às patologias de ansiedade, que podem refletir alterações no circuito de medo. Desta forma, faz-se necessário o estudo aprofundado dos circuitos de medo, bem como os efeitos exercidos pelos hormônios sexuais, a fim de compreender as bases desses distúrbios e suas diferentes prevalências e expressões entre homens e mulheres, objetivando alcançar maneiras mais eficazes de reduzir e tratar desordens associadas ao medo.

Ainda, o cérebro feminino é pouco estudado no campo das neurociências. Modelos animais machos são frequentemente empregados, e muitas vezes, ignoram-se as peculiaridades do sistema nervoso feminino e dos potenciais efeitos dos hormônios sexuais sobre ele. Para que tenhamos uma representação igualitária de ambos os sexos nas pesquisas científicas, é preciso expandir os conhecimentos adquiridos em machos e obter novos dados em fêmeas, de modo que não se negligencie uma parcela substancial da população.

Este estudo se propôs a reproduzir e ampliar, em fêmeas, achados obtidos em roedores machos em relação a um substrato neural que vem ganhando destaque nos estudos sobre a circuitaria do medo, aquisição e expressão dos comportamentos defensivos, o núcleo central da amígdala (CeA).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar a participação do núcleo central da amígdala (CeA) e a influência dos estrógenos na aquisição da memória de medo condicionado ao som em camundongos fêmeas C57BL/6 ovariectomizadas e normociclantes.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Investigar o efeito da inibição e desinibição farmacológica do núcleo central da amígdala (CeA), utilizando agonista e antagonista GABA-A, na formação de memórias de medo condicionado ao som em camundongos fêmeas normociclantes C57BL/6;
- Verificar se a desinibição da amígdala central em fêmeas ovariectomizadas (12 semanas) recupera o déficit de memória de medo condicionado ao som em fêmeas ovariectomizadas (OVX), descrito previamente por nosso grupo de pesquisa;
- Verificar a marcação das enzimas da maquinaria GABAérgica, GAD65/67, por imunofluorescência na CeA de fêmeas OVX (12 semanas) e fêmeas normociclantes SHAM (em proestro e metaestro);
- Verificar se a administração aguda intra-CeA de estradiol exerce efeito sobre a memória de medo condicionado ao som em fêmeas OVX 12 semanas;
- Investigar a participação da sinalização de estrógenos endógenos sobre os receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPER na CeA na formação de memórias de medo em camundongos fêmeas normociclantes.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 com idade entre 8 e 12 semanas obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais foram alocados em gaiolas (com, no máximo, cinco animais) e mantidos em uma estante ventilada em temperatura ambiente de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade entre 40-70%, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo CEUA sob o protocolo 121/2016 e 45/2017.

### **4.2. Avaliação do ciclo estral por citologia vaginal**

As fases do ciclo estral de roedores foram definidas por Stockard e Papanicolaou (1917) conforme as alterações no comportamento sexual, histologia e morfologia do trato reprodutivo de roedores. Esses autores cunharam a técnica da análise da citologia vaginal, que até hoje é um método não invasivo bastante confiável e usado extensivamente. Ele baseia-se na análise da ausência/presença de tipos celulares e a proporção desses tipos celulares encontrados no lavado vaginal (Cora et al., 2015).

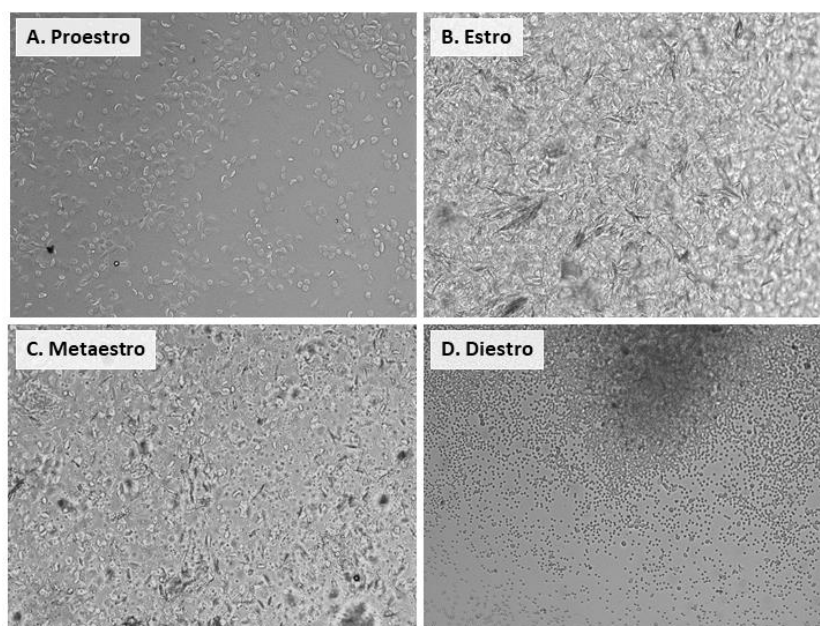
O proestro é caracterizado por predominância de células nucleadas (Figura 1A). A fase seguinte, o estro, é caracterizada por células epiteliais queratinizadas anucleadas, em formato de folha seca, que predominam no lavado (Figura 1B). No metaestro, observa-se a presença de todos os tipos celulares: células epiteliais nucleadas ocorrem em menor número, células queratinizadas e neutrófilos predominam (Figura 1C). Por fim, no diestro, neutrófilos são extensivamente presentes (Figura 1D) e é possível observar secreção vaginal com aspecto de muco. Ao final do diestro, quando os níveis de estradiol voltam a subir, observam-se algumas células epiteliais nucleadas, mas os neutrófilos ainda são predominantes (Caligioni, 2010; Cora et al., 2015).

O esfregaço vaginal foi realizado sempre no período da manhã, entre 8:00 e 11:00h. Os animais foram contidos manualmente e, sobre a grade de sua própria gaiola, a cauda do animal foi levantada e uma ponteira contendo 10  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril foi gentilmente introduzida na abertura do trato vaginal sem que ocorresse penetração. O lavado obtido, contendo as células epiteliais da mucosa vaginal, foi colocado sobre uma lâmina e analisado a fresco no microscópio óptico AXIO IMAGER M2® na objetiva de

10X. Após a coleta do lavado, os animais submetidos aos testes comportamentais também foram habituados ao procedimento de contenção para a administração de drogas. Os animais eram contidos gentilmente sobre a grade por 5 segundos.

Neste estudo, as fêmeas normociclantes foram submetidas a um período de adaptação à técnica de esfregaço vaginal por 10 dias antes do início dos experimentos comportamentais. O objetivo desta adaptação foi de minimizar o estresse causado pela coleta do lavado vaginal no dia do ensaio comportamental.

Nos experimentos envolvendo ovariectomia, o lavado vaginal dos animais OVX foi analisado por 3-5 dias para confirmação do estabelecimento do modelo de pós-menopausa (ausência de ciclagem). No grupo SHAM, utilizado para imunofluorescência, o ciclo dos animais foi acompanhado por 10 dias. Animais na fase proestro foram sacrificados no período da tarde para compor o grupo SHAM-PE e aqueles na fase metaestro foram sacrificados no período da manhã e compuseram o grupo SHAM-MET.



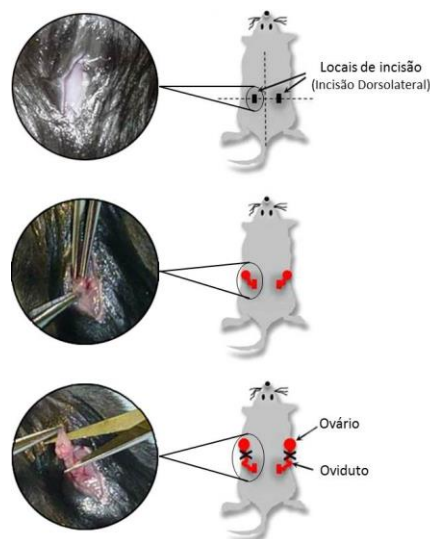
**Figura 8. Citologia vaginal representando os quatro estágios do ciclo estral de camundongos C57BL6 fêmeas de 8-10 semanas de idade.** O ciclo é composto pelas fases consecutivas de (A) proestro, (B) estro, (C) metaestro e (D) diestro. Fotografias obtidas em microscópio óptico com objetiva de 10X.



### 4.3. Procedimentos Cirúrgicos

#### A. Ovariectomia (OVX) e Controle (SHAM)

Para o estabelecimento de um modelo animal de pós-menopausa, utilizou-se a ovariectomia bilateral, que consiste na retirada cirúrgica de ambos os ovários. Os animais receberam uma injeção de tramadol (1mg/kg) 30 minutos antes do início da cirurgia de ovariectomia. Logo após, eles foram anestesiados com isoflurano (indução a 3%, manutenção entre 1.5-2%). A região lateral do abdômen foi tricotomizada e higienizada com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI) e, bilateralmente, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente na região abaixo da última vértebra lombar. Os ovários foram, então, expostos e removidos no grupo OVX (Figura 2). No grupo controle (SHAM) o procedimento foi similar, porém, após a identificação e exposição, os ovários não foram removidos. Posteriormente, a pele foi suturada e os animais foram mantidos no biotério por 12 semanas. Os animais utilizados nos ensaios comportamentais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de drogas intra-CeA na 11ª semana. Aqueles usados na imunofluorescência foram submetidos à perfusão cardíaca para obtenção dos cérebros na 12ª semana.



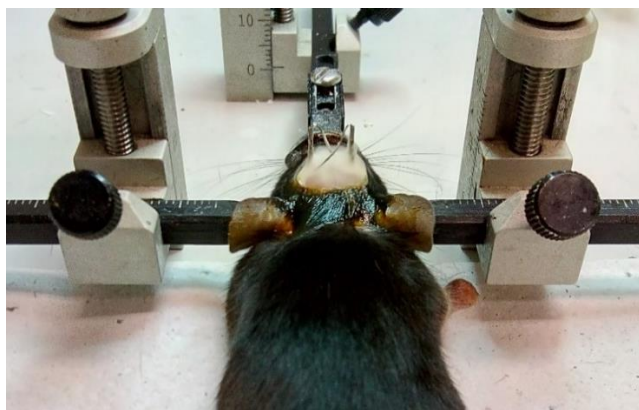
**Figura 9. Cirurgia de ovariectomia bilateral em camundongos** (Modificado de Sophocleous & Idris, 2014).

## *B. Cirurgia Estereotáxica*

A cirurgia estereotáxica foi utilizada para implantação de cânulas guia (24G, 10mm) tendo como alvo o núcleo central da amígdala (CeA). Esta técnica permite o posicionamento preciso de cânulas, seguindo coordenadas cartesianas tridimensionais.

Os animais receberam uma injeção de tramadol (1mg/kg) 30 minutos antes do início do procedimento cirúrgico e foram então anestesiados com isoflurano (indução a 3%, manutenção entre 1.5-2%) e posicionados ao aparelho estereotáxico. Os olhos dos animais foram hidratados com solução salina para evitar ressecamento, já que estes animais não os fecham quando anestesiados. Ao detectar a ausência de resposta reflexa ao pinçar das patas, a região da cabeça foi tricotomizada e higienizada com 3 repetições de iodopovidona (PVPI 10%), usando um cotonete. Em seguida, uma injeção subcutânea de lidocaína (2mg) foi administrada e após alguns minutos o crânio foi exposto através de uma incisão com bisturi. O periósteo foi removido, e o bregma e o lambda foram alinhados. O bregma foi utilizado como a referência e as coordenadas, adaptadas de Paxinos e Franklin (2001) e padronizadas no laboratório, foram utilizadas para a implantação das cânulas guia na amígdala central. As coordenadas utilizadas, em mm, foram: Antero-Posterior (AP): -1.0; Latero-Lateral (LL):  $\pm 2.7$ ; Dorso-Ventral (DV): -3.7. As cânulas foram posicionadas 1mm acima da região de interesse, de modo a evitar qualquer tipo de dano ao tecido alvo.

Em seguida, foi realizada a trepanação bilateral utilizando uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas AP e LL. As cânulas-guia foram colocadas num adaptador fixado à torre do estereotáxico e abaixadas lentamente através dos orifícios abertos anteriormente até atingirem a coordenada DV. As cânulas foram fixadas com cimento de zinco ou cimento C&B Metabond e em seguida o adaptador foi retirado. Uma cânula oclusora de menor espessura foi colocada no interior de cada cânula guia para evitar o entupimento. A região do crânio exposta foi coberta por acrílico dentário formando o capacete (Figura 10). Os animais repousaram por no mínimo 5 dias após o início dos ensaios comportamentais.

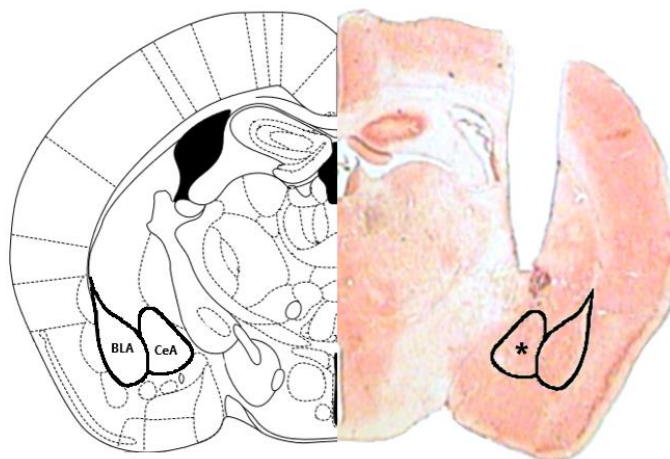


**Figura 10. Cirurgia estereotáxica.** Implantação de cânulas intra-CeA em camundongos C57BL6.

#### **4.4. Histologia para confirmação do posicionamento das cânulas**

Após o término dos ensaios comportamentais, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) i.p. e perfundidos com tampão fosfato salina (PBS) 0,01M e paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram removidos e colocados em PFA (paraformaldeído) 4% por 24h, seguidos de armazenamento em solução de sacarose 30%, para posterior secção em criostato (Leica CM 1860).

As fatias com espessura de 50 $\mu$ m foram coradas com vermelho neutro. As lâminas foram mergulhadas na solução de vermelho neutro por 10 minutos e lavadas em água destilada por imersão por 45s. Em seguida, foram mergulhadas sequencialmente por 45s em etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e, por fim, em xilol 100%. As lâminas foram montadas em Entelan e observadas em lupa. Apenas os animais com cânulas posicionadas no local desejado (1mm acima da CeA) foram incluídos nos grupos experimentais (Figura 11).



**Figura 11. Corte histológico para verificação do posicionamento das cânulas-guia, cujo alvo foi o núcleo central da amígdala (CeA).** \* indica ao alvo da injeção. BLA: amígdala basolateral.

#### 4.5. Tratamentos Farmacológicos

Todos os tratamentos farmacológicos foram realizados 15-20 minutos antes dos ensaios comportamentais ou da sessão de treino do condicionamento ao medo pelo som, exceto o tratamento com bicuculina, que também foi administrada imediatamente após a sessão de treino.

As drogas foram injetadas intra-CeA utilizando-se uma cânula injetora (30G, 11mm) acoplada a um tubo de polietileno e à uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ l. Foi administrado um volume de 200nl/lado, numa velocidade de 5 $\mu$ l/min. Para a administração das drogas, os animais foram contidos gentilmente pelo experimentador sem anestesia ou sedação para colocação da cânula injetora, seguidos da injeção, quando o animal permaneceu livre.

Cada animal foi submetido a dois protocolos comportamentais, sendo realizadas duas administrações de droga por animal, com intervalo de no mínimo 3 dias. Apenas os animais submetidos ao *Experimento 3* receberam três injeções intra-CeA, pois foram utilizados anteriormente no *Experimento 5*. No *Experimento 7*, os animais receberam duas injeções consecutivas, com intervalo de 3-5min, sendo a última injeção realizada 15-20 minutos antes da sessão de treino.

As respectivas doses, concentrações e volumes encontram-se na Tabela 1. Baseando-se em trabalhos encontrados na literatura ou realizados pelo nosso grupo, selecionamos doses que foram efetivas em alterar comportamentos ou tarefas de memória em camundongos quando injetadas centralmente.

Para modulação da atividade GABAérgica da CeA, foi utilizada a bicuculina (1(S),9(R)-(-)-bicuculline methiodide), um antagonista competitivo que interage com os sítios de ligação do GABA nos receptores GABA-A (Dong et al., 2017; Forman et al., 2009). Em contrapartida, o muscimol (5-(aminomethyl)-isoxazol-3-ol) é uma molécula capaz de ativar o receptor GABA-A, atuando como agonista através de sua ligação direta ao sítio de ligação do GABA (Forman et al., 2009; Sato et al., 2015). Para esses ensaios, utilizamos DMSO 20% ou salina como veículo.

Para verificar a sinalização pelos estrógenos na CeA de fêmeas OVX, foi utilizada a forma sintética hidrossolúvel do  $\beta$ -estradiol, encapsulada em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (H $\beta$ C), administrada numa dose de 5 $\mu$ g/lado (Jaekyoon Kim et al., 2016). A molécula H $\beta$ C diluída em salina foi utilizada como veículo.

Para o bloqueio da ação dos estrógenos endógenos, foram utilizados antagonistas seletivos para os ERs. O TPBM [theophylline, 8 [(benzylthio)methyl]-(7CI,8CI)] é uma molécula cujo principal mecanismo de ação é diminuir a interação entre o complexo E2-ER no citoplasma, impedindo sua ação sobre o elemento responsivo ao estrógeno (ERE) no DNA, logo, bloqueando sua ação genômica (Mao et al., 2008). A dose escolhida foi aquela capaz de antagonizar o efeito promnésico do E2 no hipocampo dorsal na fase de consolidação da memória de reconhecimento de objeto (ORM) (Pereira et al., 2014). O PHTPP (4-[2-Phenyl-5,7-bis (trifluoromethyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol) é um antagonista competitivo dos ER $\beta$ , altamente seletivo (36x) para este receptor em comparação ao ER $\alpha$  (Compton et al., 2004). A dose utilizada foi extraída dos trabalhos de Pereira *et al.* (2014) Kim & Frick (2017), cujos alvos eram o hipocampo. O G15 (4-(6-Bromo-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H- cyclopenta[c]quinoline) é um antagonista competitivo altamente seletivo aos receptores de estrógeno acoplados à proteína G (GPER/GPR30) (Dennis, 2004). A dose utilizada foi extraída de Kim *et al.* (2016). Como veículo, utilizamos DMSO 20%.

**Tabela 1. Drogas administradas intra-CeA e suas respectivas doses, concentração e volume.**

Droga	Fabricante e # Cat.	Propriedade farmacológica	Conc.	Dose	Volume
Bicuculina	Sigma-Aldrich; 14343	antagonista do receptor GABA-A	0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L	100ng/lado	200nL
Muscimol	Sigma-Aldrich; M1523	agonista do receptor GABA-A	0,15 $\mu$ g/ $\mu$ L	30ng/lado	200nL
Estradiol	Sigma-Aldrich; E4389	17- $\beta$ estradiol sintético hidrossolúvel (encapsulado em ciclodextrina - H $\beta$ C)	25 $\mu$ g/ $\mu$ L*	5 $\mu$ g/lado	200nL
TPBM	Sigma-Aldrich; T5202	antagonista seletivo do receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ )	250ng/ $\mu$ L	50ng/lado	200nL
PHTPP	Tocris; 2662	antagonista seletivo do receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ )	1ng/ $\mu$ L	0,2ng/lado	200nL
G15	Tocris; 2678	antagonista seletivo do receptor de estrógeno GPER	37ng/ $\mu$ L	7,4ng/lado	200nL

\* Corresponde a aproximadamente 1,33 $\mu$ g/ $\mu$ L de E2 livre.

#### 4.6. Testes Comportamentais

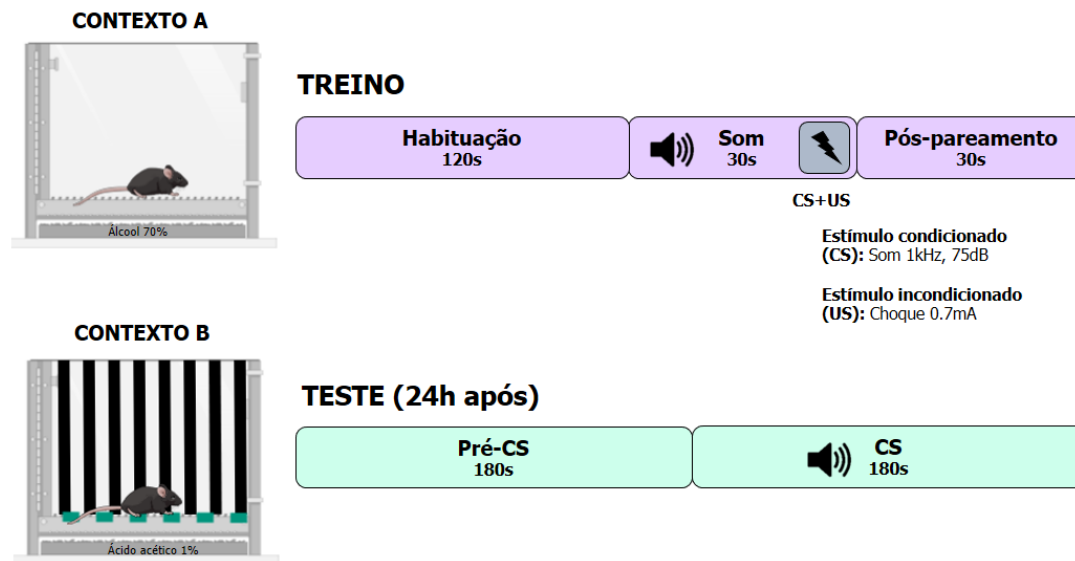
Os ensaios comportamentais foram realizados entre 9:00 e 14:00. Fêmeas normociclantes foram submetidas à análise do ciclo estral por esfregaço vaginal pelo menos 1 hora antes do início de cada sessão, no início da manhã. Todos os testes foram filmados para análise posterior por um observador cego ao grupo experimental.

##### A. *Condicionamento ao medo auditivo*

Para a aquisição e evocação da memória de medo condicionado pelo som, foi utilizada uma caixa de condicionamento (Insight; 390 x 470 x 320mm), que possui um assoalho acoplado a um estimulador elétrico e um emissor de som.

Na tarefa de condicionamento ao medo pelo som, o protocolo consistiu de uma sessão de treino e uma sessão de teste, realizadas em dois dias consecutivos (Figura 12). No primeiro dia, as paredes da caixa foram revestidas com listras na vertical e o álcool 70% foi utilizado como componente olfativo do contexto (contexto A). O assoalho foi mantido como o original da caixa de condicionamento, composto por barras cilíndricas dispostas paralelamente, por onde a corrente elétrica é conduzida. Neste dia, o protocolo seguiu as seguintes etapas: 120s de habituação inicial seguidos por 30s de exposição ao som de 1KHz (estímulo condicionado, CS) e nos últimos 2s de apresentação do som, este foi pareado a um choque de 0.7mA (estímulo incondicionado, US). Em seguida, o animal permaneceu na caixa por 30s (período pós-pareamento) e retornou para sua gaiola.

No segundo dia, 24h após o treino, para testar se o animal condicionou o som ao choque e excluir os elementos contextuais que poderiam evocar uma memória contextual, o animal foi colocado em um contexto diferente (contexto B). Neste novo contexto, as pistas visuais, táteis e olfativas da caixa foram alteradas: as paredes foram revestidas com papel liso, foi utilizado álcool acético 1% como componente olfativo e o assoalho foi modificado de modo a encobrir as barras cilíndricas com uma grade quadriculada de arame. O teste da memória de medo condicionado ao som consistiu em 180s de habituação na caixa (Pré-CS), seguidos de 180s da apresentação do mesmo som usado na sessão de treino (CS) (Figura 12).



**Figura 1211. Protocolo de condicionamento ao medo pelo som (cued fear conditioning).** O protocolo consiste na sessão de treino (dia 1) e na sessão de teste (dia 2) realizado após 24h em diferentes contextos.

O comportamento de congelamento (*freezing*) foi contabilizado durante o treino e o teste. Utilizamos uma frequência de amostragem de tempo de 5s em que foi assinalado, para cada janela, se houve ou não a ocorrência de *freezing* (Curz et al., 2009). O número de janelas de tempo assinaladas foi expresso em forma de porcentagem do total de janelas avaliadas. Na sessão de treino, o *freezing* foi quantificado durante a habituação, apresentação do som, e pós-pareamento. No teste, esse comportamento foi contabilizado durante as sessões pré-evocação (habituação na ausência do som, pré-CS) e pós-evocação da memória (apresentação do som, CS).

Durante a sessão de treino, também foi avaliada a reação dos animais ao choque. Vários fatores podem afetar como o animal percebe o choque, dentre eles condições emocionais e diferenças na sensibilidade periférica ou percepção central, e desta forma, podem afetar a formação da associação choque-som. Neste estudo, pretendeu-se verificar se a reação ao choque foi alterada pelo tratamento farmacológico, visto que este foi realizado antes do pareamento. A reação observada após a passagem da corrente, por um período de 2s, foi classificada de acordo com o *score* apresentado na Tabela 2 (Nielsen & Crnic, 2002).

**Tabela 2. Score de reação ao choque (US).**

Score	Comportamento	Descrição
0	Ausência de resposta	Atividade normal sem qualquer reação perceptível.
1	Recuo	Mudança abrupta na postura corporal com pelo menos três patas no assoalho, permanecendo no mesmo local.
2	Sobressalto	Pequeno movimento horizontal para frente ou para trás (menos da metade do comprimento da câmara) ou pequeno movimento vertical (menor que a altura do corpo) com pelo menos duas patas restantes no chão.
3	Corrida	Movimento horizontal para a frente (maior que a metade da câmara) com pelo menos duas patas na grade ou movimento coordenado exagerado de patas.
4	Salto horizontal	Movimento horizontal (maior que a metade da câmara) com todas as quatro patas fora da grade em um movimento de mola e altura do corpo ou superior.
5	Salto vertical	Movimento vertical (maior que a altura do corpo) com todas as quatro patas fora do assoalho. O salto vertical foi distinguido do ‘sobressalto’ (2) pela velocidade e elevação da resposta e do ‘salto horizontal’ pela elevação vertical.

### *B. Labirinto em cruz elevado*

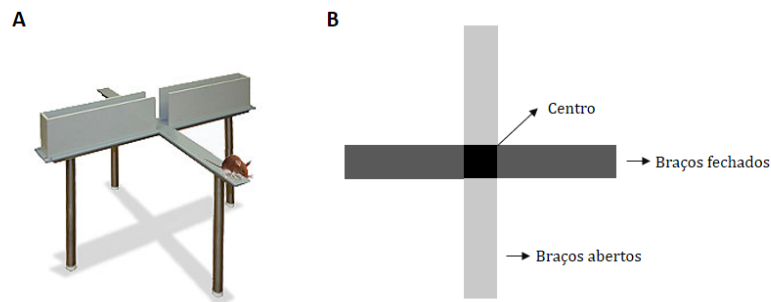
O labirinto em cruz elevado é um aparato validado para avaliar comportamentos do tipo-ansioso em roedores. O animal é colocado inicialmente no centro do aparato (Figura 13), que consiste em um labirinto de acrílico elevado a 45 cm do solo formado por quatro braços, sendo dois abertos opostos entre si (30 x 5 cm) e dois fechados também opostos entre si (30 X 5 x 15 cm). Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais. Este teste foi realizado sob luz vermelha, visto que a luz branca pode ser ansiogênica.

Este paradigma baseia-se na tendência natural dos roedores em preferir espaços escuros e fechados somado a seu medo inato à alturas e espaços abertos. O uso de drogas ansiogênicas reduzem o tempo gasto nos braços abertos, enquanto que as ansiolíticas o aumentam. Sendo assim, ao testar novos fármacos ou delinear os substratos neurais subjacentes à ansiedade, são quantificados parâmetros que acessam a permanência do animal nos braços abertos e fechados do aparato e comportamentos que são engajados durante a sessão (Walf & Frye, 2007).

Para a realização do teste, após a limpeza do aparato utilizando-se álcool 70%, os camundongos foram colocados individualmente no centro do aparato, com a cabeça



voltada para um dos braços abertos e seu comportamento foi avaliado durante os 5 minutos que permaneceram no aparato. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação ao tempo nos braços fechados, a porcentagem de entradas nos braços abertos, e a frequência em que os animais efetuaram comportamentos de exploração/avaliação de risco, como mergulhos de cabeça (*dipping*), e exploração vertical (*rearing*).



**Figura 123. Labirinto em cruz elevado.** A. Aparato consistindo de dois braços abertos e dois braços fechados elevados do solo. B. Delimitação das áreas em braços fechados, braços abertos e área central para análise.

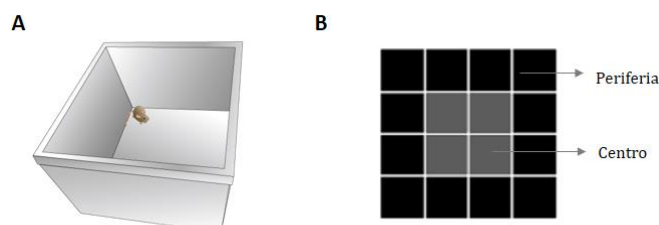
### C. Campo aberto

Este teste foi utilizado para verificar alterações na atividade locomotora dos animais após administração de drogas intra-CeA. A locomoção é um parâmetro importante, pois a alteração na integridade da atividade locomotora dos sujeitos experimentais pode confundir a interpretação do comportamento de *freezing*.

O aparato utilizado consiste em uma arena em acrílico de dimensões 50 x 50 x 50 cm (Figura 14A). Esta arena é dividida em 16 quadrantes, sendo eles divididos em área central e periférica (Figura 14B). O animal foi colocado inicialmente no centro da arena e permitiu-se a exploração livre por 5 minutos. Entre um animal e outro, a caixa foi higienizada com álcool 70%. Este teste também foi realizado sob a luz vermelha.

Como medida de mobilidade, foram avaliados os cruzamentos totais, ou seja, o número de vezes que o animal cruzou os quadrantes (Seibenhener & Wooten, 2015). O segundo parâmetro extraído foi a porcentagem de cruzamentos no centro da arena, utilizado como uma medida indireta do comportamento tipo-ansioso. A tigmotaxia - tendência a permanecer próximo às paredes do campo aberto para reconhecer o ambiente por meio de pistas táteis usando as vibrissas - é um parâmetro associado à ansiedade em

roedores. Constatou-se que os níveis de tigmotaxia crescem conforme a ansiedade aumenta, o que foi validado com drogas ansiogênicas *versus* ansiolíticas (Simon et al., 1994).



**Figura 14. Campo aberto.** A. Aparato consistindo de uma arena quadrada a qual o animal pode explorar livremente. B. Delimitação das áreas de periferia e centro para análise.

#### 4.7. Imunofluorescência

Para análise quantitativa do conteúdo da proteína GAD65/67 na amígdala de fêmeas OVX e SHAM, como medida do tônus inibitório desta estrutura, foi realizada a técnica de imunofluorescência pelo método *free floating*. As amostras foram obtidas de 16 animais, divididos nos grupos OVX, SHAM-PE (animais em proestro) e SHAM-MET (animais em metaestro). Todos os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca, conforme descrito no tópico anterior, e seus cérebros foram armazenados em solução de sacarose 30% após fixação em PFA 4% por 24h. Cortes coronais de todo o cérebro, com espessura de 40  $\mu\text{m}$ , foram obtidos por meio da secção do tecido em criostato. As fatias foram imersas em solução crioprotetora em placas contendo 96 poços, sendo colocadas 3 fatias em cada poço, e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para seleção das fatias que continham a amígdala (BLA e CeA), a morfologia do hipocampo foi utilizada como referência. Foram selecionadas 6 fatias de cada animal, iniciando-se quando o hipocampo dorsal ainda não estava presente até o aparecimento do hipocampo ventral. Dentro desta faixa, um a cada dois poços foi amostrado, de modo que uma fatia era escolhida dentre as três contidas em um poço, e o poço seguinte foi saltado.

Os tecidos foram lavados em PBS 3 vezes por 5 minutos e mantidos em PBS-T 0.1% *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, as fatias tiveram seus sítios imunorreativos inespecíficos bloqueados por soro normal de cabra (NGS) diluído a 5% em PBS-T 0.3% por 2h a temperatura ambiente. As secções cerebrais foram incubadas por 48h a  $4^{\circ}\text{C}$  com o anticorpo primário anti-GAD65/67 produzido em coelho (Chemicon AB1511; 1:600)

diluído em PBS-T + NGS 5%. Após incubação, as fatias foram lavadas 3x em PBS e, em seguida, os cortes foram incubados por 1h30 a temperatura ambiente com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabra e conjugado ao Alexa Fluor 488 (1:400) diluído em PBS-T + NGS 5%. Os cortes foram lavados 4x por 5 minutos em PBS, mergulhados em água destilada brevemente, para posterior etapa de redução da autofluorescência derivada de lipofuscina, que consistiu no tratamento das fatias com uma solução de CuSO<sub>4</sub> 1mM em acetato de amônio 50Mm (pH 5.0) por 1h (Spitzer et al., 2012). Finalmente, após mergulhadas em dH<sub>2</sub>O e lavadas 3x em PBS, os cortes foram incubados com o marcador DAPI (1:2500) diluído em PBS por 5 min para evidenciar o núcleo celular. Todas as fatias incluídas neste estudo foram simultaneamente submetidas aos passos citados, evitando possíveis perturbações ao método.

As lâminas foram montadas para a análise em microscópio de fluorescência utilizando-se o meio de montagem aquoso não-fluorescente Hydromount (National Diagnostics). Estas foram armazenadas fora do alcance da luz a 4°C.

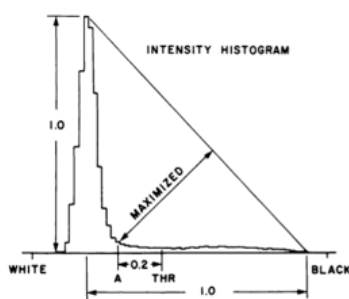
#### **4.8. Análise das imagens de imunofluorescência**

Para as análises da imunofluorescência para GAD65/67, as imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência AXIO IMAGER M2®. O marcador DAPI foi utilizado para auxiliar na delimitação das áreas analisadas, BLA e CeA, nas fotos obtidas na objetiva 5X.

Para obtenção das imagens, os parâmetros de aquisição (tempo de exposição, ganho digital, brilho e contraste) foram definidos e padronizados para obter uma faixa ampla da intensidade do sinal. Tais parâmetros foram estabelecidos utilizando amostras sobressalentes, não interferindo na aquisição do sinal nas amostras experimentais, e mantidos ao longo da aquisição de todas as imagens, realizada na objetiva de 20X. As imagens capturadas foram salvas em formato TIF 8-bit.

As imagens foram remontadas utilizando o Photoshop, pela função *Photomerge*, que combina as fotos pelas áreas que se sobrepõem entre elas. Esta função não edita ou modifica quaisquer parâmetros das imagens originais. Após, no *software* ImageJ, a escala das montagens foi ajustada igualmente para todas as fotos (1,952 µm/pixel). As regiões correspondentes à BLA ou CeA foram delimitadas, recortadas de cada foto e salvas separadamente (Figura 16).

Para análise da fluorescência em cada região, foi utilizada a função *Auto threshold* (limiar automático) do tipo *Triangle*, contida no ImageJ. A função *Triangle* define um limiar conforme o histograma de intensidade de pixels. Para cada imagem (da região previamente remontada), esta função desenha uma linha que liga o pico máximo de intensidade do histograma à extremidade mais distante, próxima ao preto ou ao branco. A função busca o ponto de maior distância entre a reta traçada e o gráfico. O valor de pixel correspondente a esse ponto é somado a uma constante, definindo o limiar (THR, Figura 15). Neste caso, portanto, um valor diferente de limiar é definido para cada imagem. Em poucos casos, a função definiu um limiar muito próximo ao preto que não separou o *background* da marcação (próximo ao branco). Nesses casos, as imagens não foram utilizadas nas análises.



**Figura 13. Determinação do limiar para cada imagem pela função de limiar automático Triangle.** O limiar é definido traçando uma linha entre o pico de intensidade do histograma e o valor extremo do histograma. A função busca o ponto de maior distância entre a reta traçada e o gráfico. O valor de pixel correspondente a esse ponto é somado a uma constante, definindo o limiar. Fonte: Zack, Rogers, and Latt 1977.

Ao verificar que o *background* entre as imagens do grupo OVX se diferia dos demais grupos, aplicamos a função *Subtract background* em todas as imagens e repetimos as análises conforme feito anteriormente (Figura 16).

A cada imagem analisada, foram extraídos os valores da área total, área marcada fluorescente e *raw integrated density* (soma das intensidades dos pixels marcados). Para cada animal, os valores de todas as imagens remontadas por região (BLA ou CeA) foram somados e normalizados pela área total. Os dados foram apresentados como porcentagem da área fluorescente e intensidade dos pixels por área total.

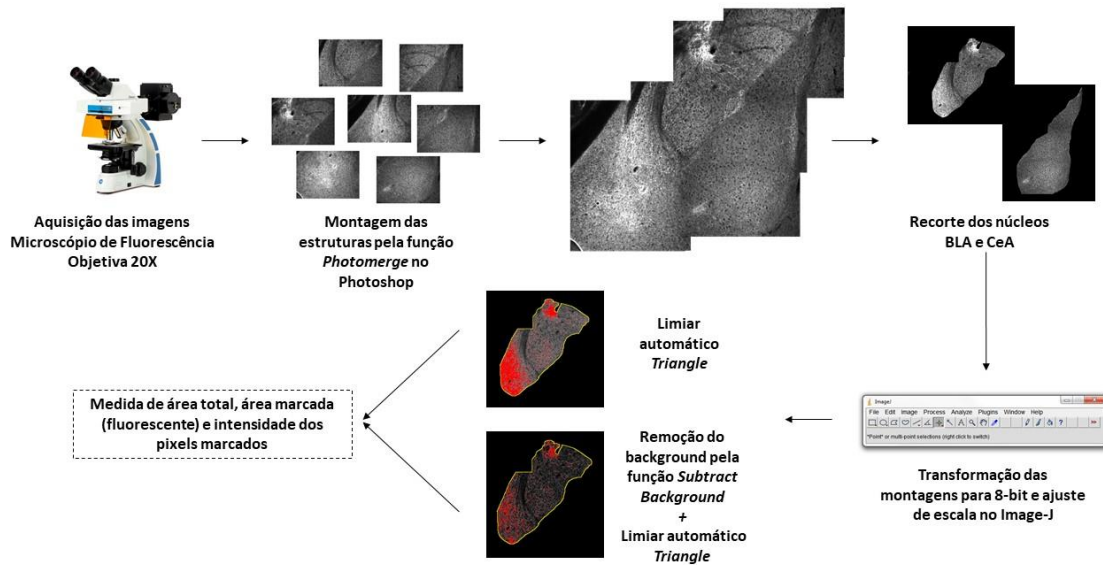
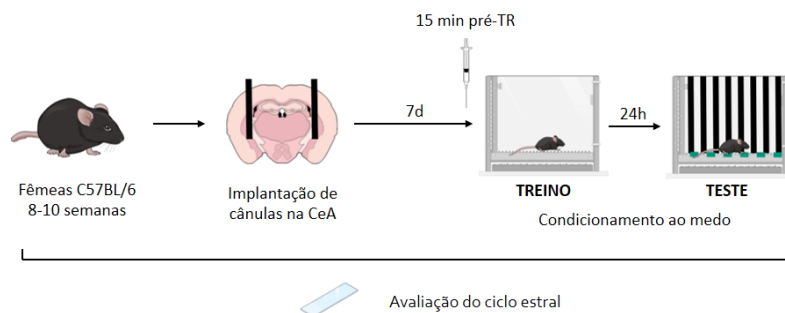


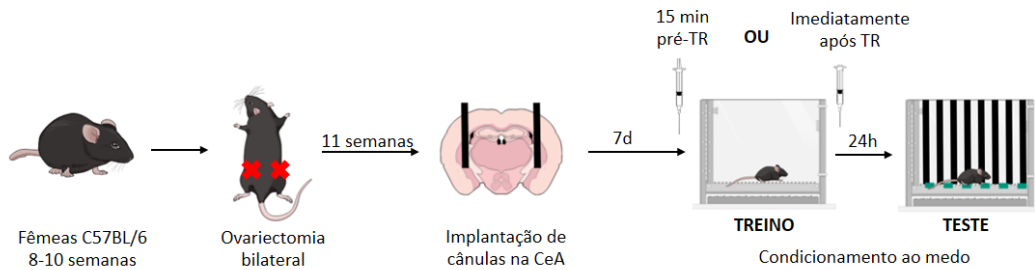
Figura 14. Análise das imagens de imunofluorescência para GAD65/67 na BLA e CeA utilizando o software ImageJ.

#### 4.9. Desenhos experimentais

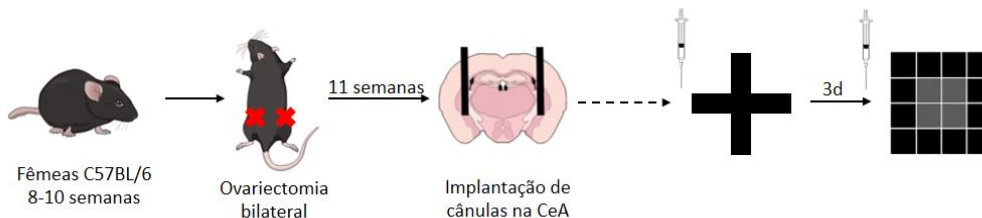
*Experimento 1:* Fêmeas normociclantes tiveram cânulas implantadas na CeA. Receberam bicuculina (n=9), muscimol (n=5) ou DMSO 50% (n=9) 15 minutos antes do treino e foram testadas após 24h.



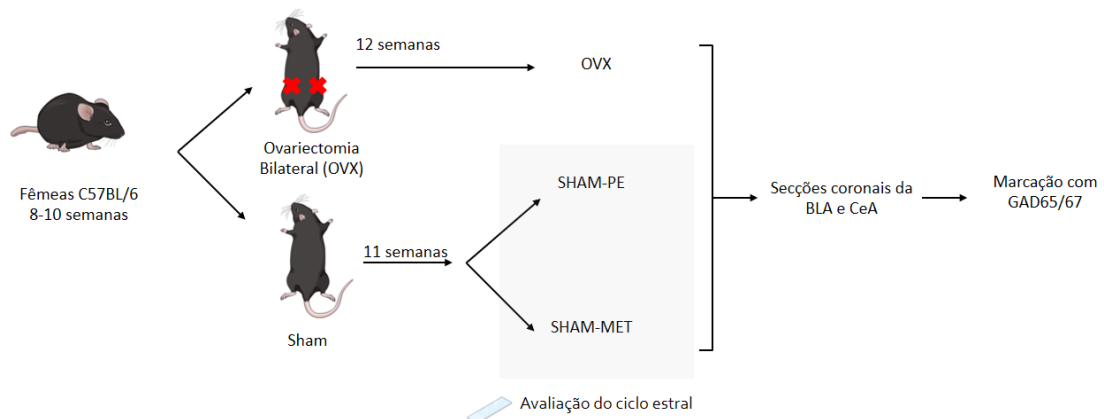
*Experimento 2:* Fêmeas OVX (12 semanas) tiveram cânulas implantadas na CeA e foram divididas em quatro grupos conforme tratamento e período da injeção: 1) bicuculina (n=5) ou 2) salina (n=6) injetadas 15-20 minutos antes do treino e 3) bicuculina (n=11) ou 4) salina (n=9) injetadas imediatamente após o treino.



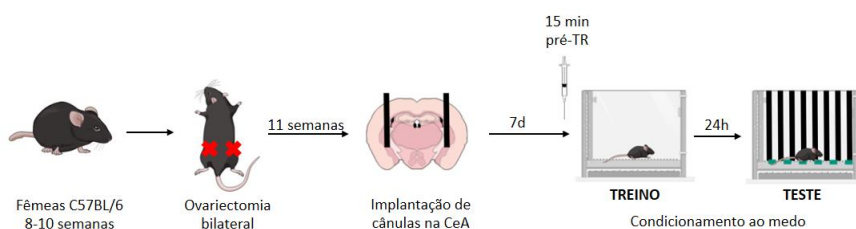
*Experimento 3:* Fêmeas OVX (12 semanas) receberam bicuculina (n=9) ou DMSO 20% (n=7) 15 minutos antes do labirinto em cruz elevado e, três dias após, receberam a mesma droga antes do teste de campo aberto. Esses animais já haviam passado pelo protocolo de condicionamento ao medo.



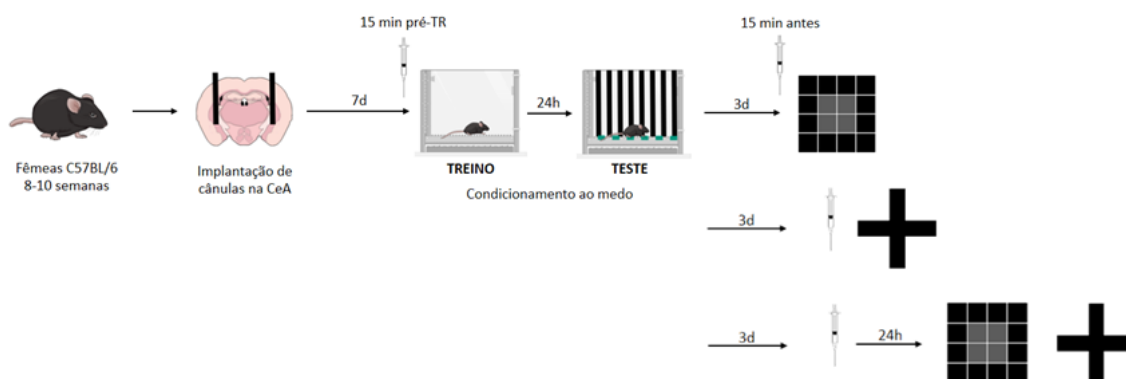
*Experimento 4:* Fêmeas OVX (n=5), SHAM-PE (Pro-estro; n=6) e SHAM-MET (Metaestro; n=4) (12 semanas) foram sacrificadas para coleta de amostras da BLA e CeA para detecção de GAD65/67 por imunofluorescência.



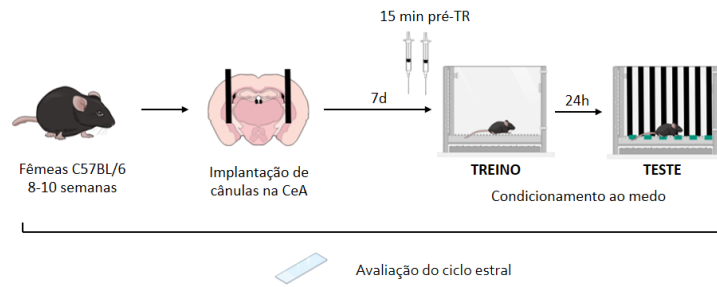
*Experimento 5:* Fêmeas OVX (12 semanas) tiveram cânulas implantadas na CeA e receberam  $\beta$ -estradiol (encapsulado em H $\beta$ C; n=9) ou H $\beta$ C (em salina; n=7) 15-20 minutos antes do treino. Os animais foram testados após 24h.



*Experimento 6:* Fêmeas normociclantes tiveram cânulas implantadas na CeA e receberam antagonistas de ERs (TPBM n=9; PHTPP n=10; ou G15 n=7) ou DMSO 20% (n=13) 15-20 minutos antes do treino de condicionamento. Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto 15 min após administração das mesmas drogas com um intervalo de no mínimo 3 dias (DMSO n=15; TPBM n=11; PHTPP n=7; G15 n=8). Dado o efeito do TPBM no teste de memória, outro grupo de animais foi submetido ao labirinto em cruz elevado 15min após injeção das drogas intra-CeA (DMSO n=8; TPBM n=9). Animais também foram testados 24h após do tratamento no campo aberto e labirinto em cruz elevado (DMSO n=8-9; TPBM n=9-10) no mínimo 3 dias após terem passado pelo condicionamento ao medo.



*Experimento 7:* Fêmeas normociclantes tiveram cânulas implantadas na CeA e receberam duas injeções consecutivas, sendo a última 15 minutos antes do treino. Foram administradas as drogas nas seguintes combinações: DMSO 20% + DMSO 20% (n=5), DMSO 20% + BIC (n=6), TPBM + DMSO 20% (n=9) e TPBM + BIC (n=7).



#### 4.10. Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Anderson-Darling ( $\alpha = 0,05$ ) no *software* MINITAB (Versão 14). Testes não-paramétricos foram aplicados às análises em que pelo menos um grupo apresentou distribuição fora da normalidade. Os dados normais são mostrados como média  $\pm$  SEM (erro padrão da média) e os dados não normais como mediana  $\pm$  IIQ (intervalo interquartil). Todos os testes foram executados pelo *software* GraphPad Prism 6, utilizando-se nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Para comparação dos comportamentos de *freezing* durante a sessão de treino dos experimentos de condicionamento ao medo pelo som, foi utilizado teste *t* de Student ou ANOVA de 1 via dependendo do número de grupos, e seus respectivos testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foi utilizada correção de Dunn nas comparações múltiplas.

Para comparações durante o teste, utilizou-se ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, sendo analisados os fatores ‘tratamento’ e ‘sessão’ (Pré-CS vs. CS) e a interação entre eles. Análises *post-hoc* foram executadas conforme a necessidade e estão explicitadas nos resultados. Aplicamos a correção de Sidak entre sessões de um mesmo grupo, e de Dunnett na comparação dos tratamentos em relação ao grupo controle.

Nos experimentos de campo aberto, labirinto em cruz elevado e nas análises referentes ao ensaio de imunofluorescência para GAD65/67, para os dados com distribuição normal, as médias dos grupos foram comparadas por teste *t* de Student ou ANOVA de 1 via, seguido do *post-hoc* adequado. Para os dados que não seguiram distribuição normal, as medianas foram comparadas pelos testes não-paramétricos Mann-Whitney (2 grupos) ou Kruskal-Wallis (3 grupos ou mais).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Em fêmeas normociclantes, a inibição do núcleo central da amígdala (CeA) durante a sessão de treino impede a aquisição da memória de medo condicionada ao som.*

A CeA é um núcleo amigdalóide tradicionalmente envolvido na expressão da memória de medo condicionado, em roedores machos. Recentemente, sua função tem ganhado novo significado devido a sua participação também na aquisição desta memória. Entretanto, a participação da CeA na memória de medo condicionado em fêmeas é desconhecida.

Para testar a participação deste núcleo na aquisição da memória de medo em camundongos fêmeas, selecionamos drogas capazes de modular neurônios contendo receptores GABA-A. Utilizamos a bicuculina (BIC) e o muscimol (MUS), um antagonista e um agonista dos receptores GABA-A, respectivamente. Os grupos experimentais foram compostos por fêmeas normociclantes, contendo distribuição semelhante de animais em diferentes fases do ciclo estral.

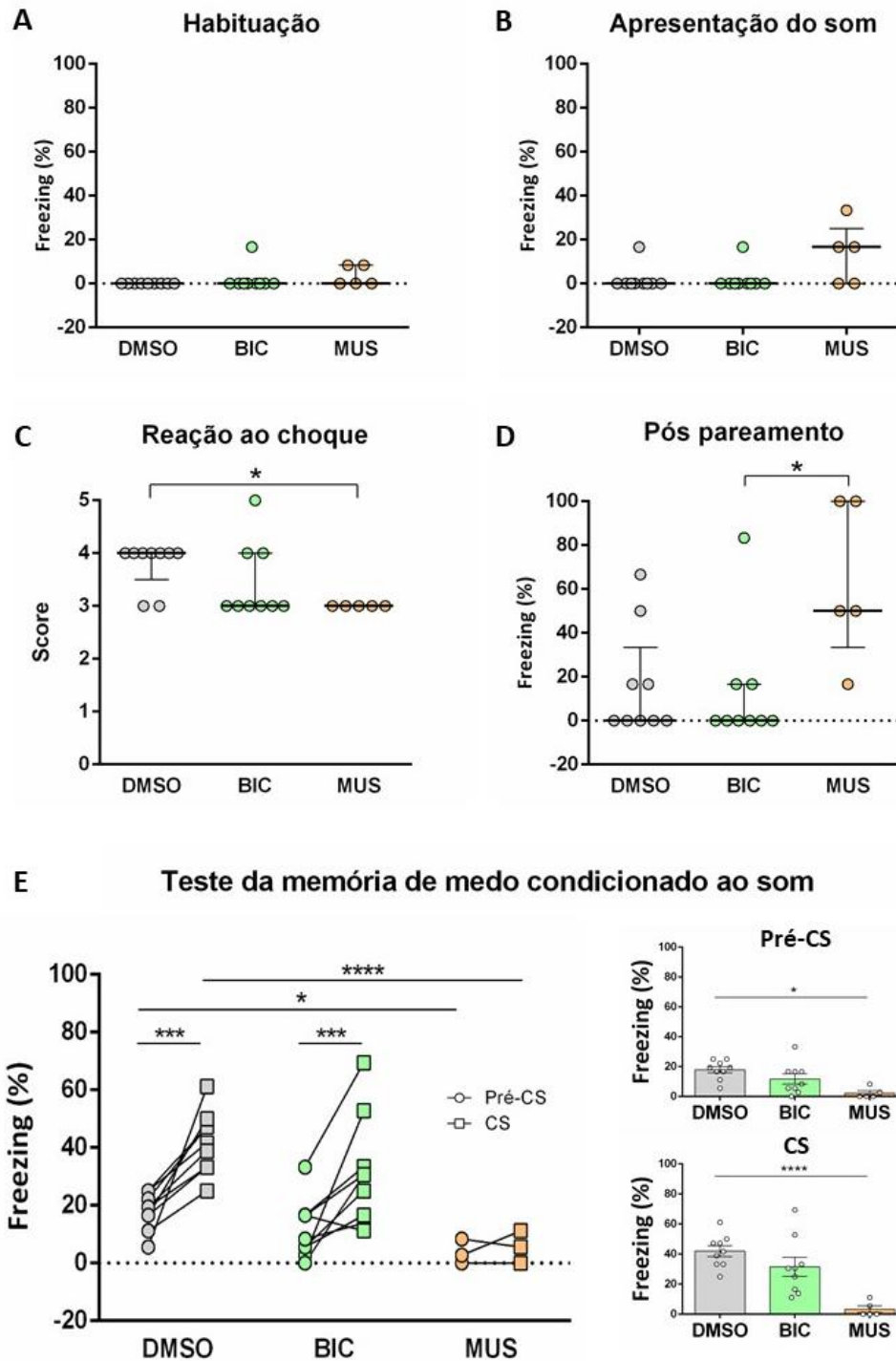
As drogas foram injetadas 15 minutos antes da sessão de treino. Desta forma, o comportamento dos animais foi observado e quantificado durante o treino para verificar se os tratamentos alteraram o *freezing* incondicionado ou a reação aos estímulos. Durante a habituação (Figura 17A), o *freezing* incondicionado não diferiu entre o grupo controle (DMSO=0±0) e os grupos que receberam bicuculina (BIC=0±0) ou muscimol (MUS=0±8,33) ( $H_2=3,96$ ;  $p=0,14$ ). Porém, durante a apresentação do som (Figura 17B), o grupo MUS (16,67±25,00) exibiu mais comportamento de *freezing* comparado ao DMSO (0±0) e BIC (0±0) com o valor de  $p$  próximo à significância ( $H_2=5,69$ ;  $p=0,058$ ). Novamente se diferenciando dos demais, durante o pareamento CS+US, verificamos uma diminuição da reação ao estímulo nocivo no grupo MUS (3±0) em relação ao controle (4,0±0,5) utilizando o Score de Nielsen & Crnic (2002) ( $H_2=6,978$ ;  $p=0,03$ ; teste de comparação múltipla de Dunn; Figura 17C). Não houve diferença entre o grupo BIC (3±1) e o grupo controle, embora os animais BIC tenham realizado “corridas” em maior frequência. Após o pareamento, período em que o animal permaneceu na caixa por 30s adicionais, houve diferença estatística no *freezing* entre os animais que receberam MUS (50±66,66) e aqueles que receberam BIC (0±16,67) (Figura 17D), mas nenhum deles foi

significativamente diferente do grupo DMSO ( $0 \pm 33,34$ ) ( $H_2=7,91$ ;  $p=0,019$ ; teste de comparação múltipla de Dunn).

Na sessão de teste, espera-se que o animal que estabeleceu a associação CS-US realize mais comportamentos de medo durante a apresentação do CS em relação ao período pré-CS. Para esta análise, os grupos foram comparados por ANOVA de 2 vias com medidas repetidas cujos fatores foram 'sessão' (pré-CS vs. CS) e 'tratamento' (DMSO, BIC ou MUS). Foi encontrado efeito dos fatores 'sessão' ( $F_{1,20}=25,6$ ;  $p<0,0001$ ) e 'tratamento' ( $F_{2,20}=14,6$ ;  $p=0,0001$ ), uma interação entre os fatores ( $F_{2,20}=4,75$ ;  $p=0,02$ ), mas não houve efeito dos 'sujeitos' ( $F_{20,20}=1,75$ ;  $p=0,11$ ). O teste de comparações múltiplas de Dunnett, usado para verificar diferença dos tratamentos em reação ao controle, revelou diferença estatística entre o grupo MUS-pré-CS ( $2,22 \pm 1,62$ ) e o grupo DMSO-pré-CS ( $17,89 \pm 2,18$ ) ( $p<0,05$ ) e entre MUS-CS ( $3,33 \pm 2,22$ ) e DMSO-CS ( $41,97 \pm 3,60$ ) ( $p<0,0001$ ). Não houve diferença entre as sessões BIC-pré-CS ( $11,7 \pm 3,42$ ) e BIC-CS ( $31,46 \pm 6,33$ ) comparadas às respectivas sessões do grupo DMSO (Figura 17E).

Tendo em vista o efeito da 'sessão', verificamos se houve aprendizado dentro de cada grupo experimental, ou seja, se os valores pré-CS diferiram dos valores encontrados na sessão CS. Nos grupos DMSO e BIC, a associação foi estabelecida (teste de comparações múltiplas de Sidak,  $p<0,001$ ). O grupo MUS mostrou-se mais uma vez diferenciado dos demais grupos, não tendo ocorrido a aprendizagem (Figura 17E).

Esses resultados demonstram que a inibição da CeA, resultante do aumento da sinalização GABAérgica, impede a formação de memórias de medo condicionado ao som em fêmeas normociclantes. A inibição da CeA também diminui a reação ao choque nesses animais.



**Figura 15. Efeito da inibição e desinibição da CeA de fêmeas normociclantes durante o treino de aquisição da memória de medo condicionado ao som.** O agonista GABAérgico muscimol (MUS) e o antagonista bicuculina (BIC) foram injetados intra-CeA 15 minutos antes do treino. **A**, Freezing durante a habituação. **B**, Freezing durante a apresentação o som. **C**, Reação ao choque. **D**, Freezing após pareamento CS+US. **E**, Teste da memória de medo condicionado realizado 24h após treino. O freezing foi analisado na sessão pré-CS e CS. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  IIQ em A-D (Kruskal-Wallis) e média  $\pm$  SEM em E (ANOVA de 2 vias; comparações múltiplas de Dunnett em Pré-CS e de Sidak em CS). DMSO n=9, BIC n=9, MUS n=5. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5.2. A desinibição da CeA durante a aquisição recupera a memória de medo condicionado ao som em fêmeas ovariectomizadas (OVX) por 12 semanas.

A CeA expressa receptores de estrógenos (Mitra et al., 2003) e esses hormônios regulam fenômenos de plasticidade em outras regiões cerebrais por alterar o balanço excitação/inibição (Murphy et al., 1998). Logo, é plausível que a privação crônica de hormônios ovarianos tenha efeitos sobre a CeA. Anteriormente, nosso grupo observou que 12 semanas de OVX prejudica a memória de medo condicionado ao som. Então, decidimos testar a hipótese de que fêmeas OVX (12 semanas) apresentariam maior inibição tônica na CeA, comprometendo a memória de medo e produzindo fenótipo semelhante ao observado no grupo ‘muscimol’ (MUS, Figura 17).

Para avaliar se o prejuízo de memória encontrado nas fêmeas OVX na tese de doutorado de Cristiane Bastos (2015) foi decorrente de um aumento do tônus inibitório na CeA, utilizamos a bicuculina (BIC) para reduzir a sinalização deste neurotransmissor mediada pelo receptor GABA-A. As drogas foram administradas 15 minutos (Figura 18A-E) antes ou imediatamente após (Figura 18F-J) a sessão de treino no condicionamento ao medo pelo som intra-CeA em fêmeas OVX (12 semanas) e salina foi utilizada como controle também em animais OVX.

Ao reduzir a inibição da CeA no momento da aquisição, observou-se que o comportamento de medo incondicionado foi alterado em alguns períodos do treino. Na habituação, as fêmeas OVX que receberam bicuculina (BIC) tiveram o *freezing* incondicionado um reduzido ( $27,50 \pm 5,53$ ) comparado aos animais que receberam salina (SAL:  $43,75 \pm 8,79$ ), mas esta diferença não atingiu significância ( $t_9=1,49$ ;  $p=0,17$ ; Figura 18A). No período seguinte, na apresentação do som, o *freezing* aumentou em ambos os grupos, mas a bicuculina amenizou este aumento. Os animais BIC realizaram *freezing* em  $46,67 \pm 6,24\%$  do tempo enquanto os animais SAL realizaram em  $75,00 \pm 7,14\%$  do tempo ( $t_9=2,92$ ;  $p=0,017$ ; Figura 18B). Não houve diferença entre os grupos na reação ao choque (SAL:  $5 \pm 1,25$ ; BIC:  $5 \pm 2,5$ ;  $U_9=13,5$ ,  $p=0,77$ ; Figura 18C). Após o pareamento, os animais dos dois grupos realizaram comportamento de medo elevado, superior a 70% (SAL:  $70,8 \pm 30,0$ ; BIC:  $80,0 \pm 23,3$ ;  $U_9=13,0$ ,  $p=0,76$ ; Figura 18D).

No teste da memória de medo (Figura 18E), observou-se efeito da ‘sessão’ ( $F_{1,9}=17,9$ ;  $p=0,002$ ) mas não do ‘tratamento’ ( $F_{1,9}=0,54$ ;  $p=0,48$ ). A interação entre os fatores ( $F_{1,9}=5,1$ ;  $p=0,051$ ) assim como o fator ‘sujeito’ ( $F_{9,9}=2,8$ ;  $p=0,069$ ) não foram estatisticamente significativos. O teste de comparações múltiplas de Sidak revelou

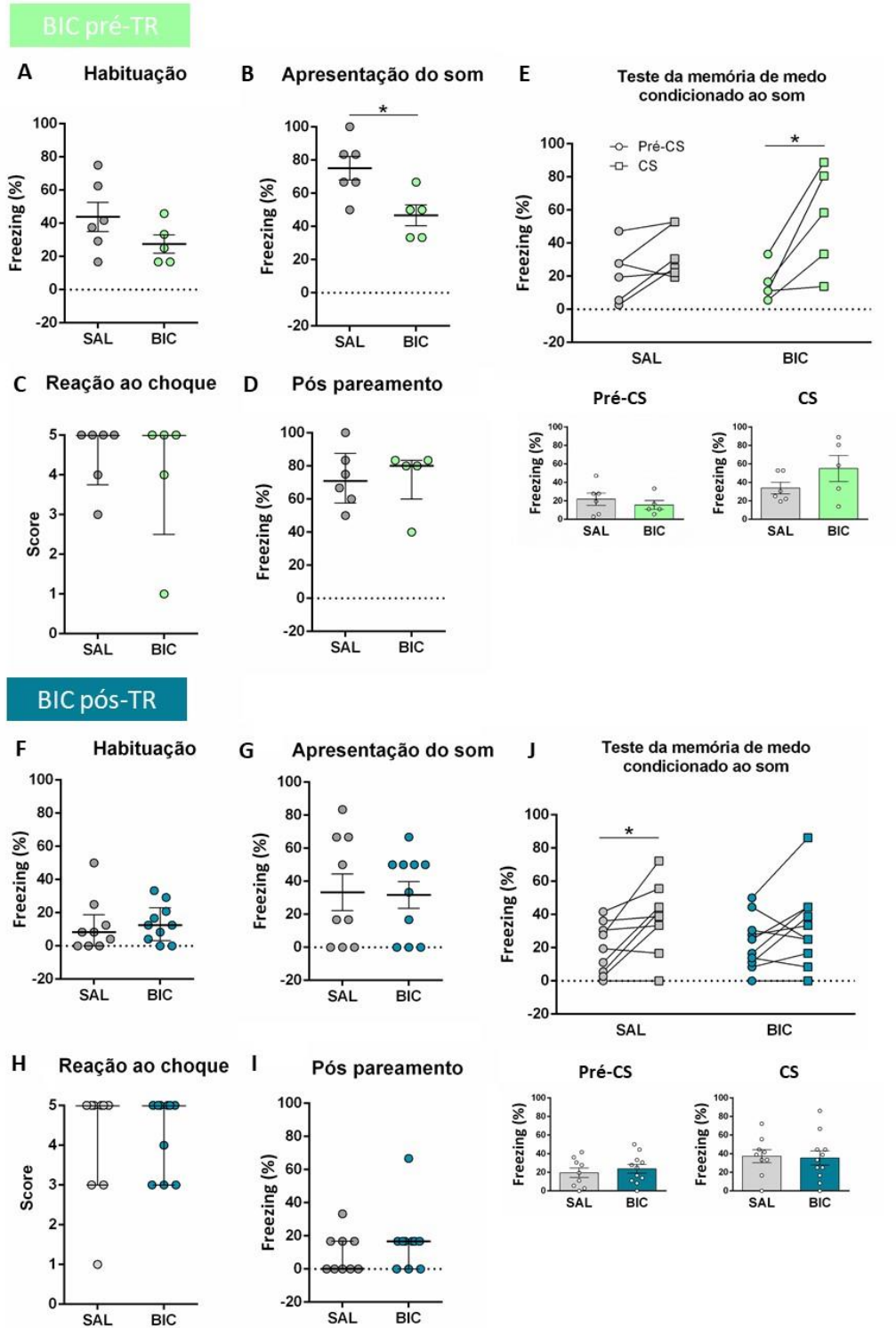
ausência de diferenças entre as sessões dentro do grupo SAL (pré-CS:  $21,8 \pm 6,7$ ; CS:  $33,8 \pm 6,2$ ), reproduzindo os dados anteriores do grupo que mostravam prejuízo de memória, porém a bicuculina administrada antes do treino promoveu aumento no *freezing* durante CS, acarretando diferença estatística entre as sessões BIC pré-CS ( $15,6 \pm 4,8$ ) e BIC CS ( $55,0 \pm 14,1$ ) ( $p < 0,01$ ). Esta diferença observada dentro do grupo BIC pré-TR é um indicativo da ação da droga sobre a CeA, embora o fator tratamento na ANOVA não tenha sido significativo. É bastante provável que a ampliação da amostra produziria diferença estatística entre os períodos CS nos grupos BIC vs. SAL.

Para verificar se o prejuízo de memória nas fêmeas OVX se devia a prejuízos restritos à consolidação da memória de medo, injetamos a bicuculina imediatamente após o treino (Figura 2F-J). Como esperado, por não ter havido tratamento farmacológico nos animais previamente à sessão de treino, o comportamento entre os grupos que posteriormente receberiam SAL e BIC não mostrou diferenças durante treino (Figura 18F-I). Na habituação, animais SAL ( $8,33 \pm 18,75$ ) e BIC ( $12,50 \pm 16,66$ ) não diferiram quanto ao comportamento de *freezing* ( $U_{19} = 44,5$ ,  $p = 0,48$ ; Figura 18F). A apresentação do som (Figura 18G) também não alterou o comportamento dos animais divididos nos diferentes grupos (SAL:  $33,33 \pm 9,94$ ; BIC:  $30,30 \pm 7,39$ ;  $t_{19} = 0,25$ ,  $p = 0,81$ ), embora tenha aumentado o *freezing* incondicionado em ambos, comparado à habituação. Os grupos se mostraram extremamente similares na reação ao choque (SAL:  $5 \pm 2$ ; BIC  $5 \pm 2$ ;  $U = 45,0$ ;  $p > 0,99$ ) (Figura 18H). Após o pareamento, os animais demonstraram níveis baixos e semelhantes de *freezing* no grupo SAL ( $0 \pm 16,67$ ) e no grupo BIC ( $16,67 \pm 16,67$ ) ( $U_{19} = 43,5$ ;  $p = 0,37$ ; Figura 18I). Portanto, os animais utilizados para injeção de BIC e SAL pós-treino constituíam grupos bastante homogêneos.

No dia seguinte, 24h após o treino, os animais foram testados (Figura 18J). Novamente, houve efeito do fator ‘sessão’ ( $F_{1,17} = 10,9$ ;  $p = 0,002$ ) mas não do ‘tratamento’ ( $F_{1,17} = 0,01$ ;  $p = 0,88$ ) e tampouco interação ( $F_{1,17} = 1,04$ ;  $p = 0,46$ ). Foi observado efeito dos ‘sujeitos’ ( $F_{17,17} = 3,6$ ;  $p = 0,006$ ). Dentro dos grupos, de maneira curiosa, os animais SAL mostraram pequeno acréscimo na quantidade de *freezing* durante o CS ( $37,35 \pm 6,95$ ) do que no período pré-CS ( $19,45 \pm 5,11$ ), apresentando significância estatística ( $p < 0,05$ ; teste de comparações múltiplas de Sidak). Pelos traçados individuais, percebe-se que uma parcela dos animais OVX-SAL-pós-TR não foi capaz de aprender a associação choque-som, enquanto outra foi. A bicuculina injetada após a aquisição não foi capaz de alterar a formação da memória atuando na consolidação, visto que os animais continuaram exibindo níveis semelhantes de *freezing* entre as fases pré-CS (BIC:  $23,74 \pm 4,65$ ) e CS

(BIC:  $35,35 \pm 7,56$ ) ( $p > 0,05$ ) e novamente com animais incapazes de atribuir valência ao som, semelhante ao encontrado no grupo SAL.

Portanto, verificamos que a bicuculina injetada previamente ao treino teve efeito sobre o aprendizado de medo. Sugerimos a partir desses experimentos que a OVX bilateral por 12 semanas aumenta a inibição tônica da CeA, prejudicando a formação da memória de medo ainda na fase de aquisição. Além disso, a bicuculina pré-treino minimiza o *freezing* incondicionado durante alguns momentos do treino de aquisição.



**Figura 16. Efeito da desinibição da CeA de fêmeas OVX-12w no treino de aquisição da memória de medo condicionado ao som.** O antagonista bicuculina (BIC) foi injetado intra-CeA 15 minutos antes (A-E) ou imediatamente após (F-I) o treino. **A, F.** Freezing durante a habituação. **B,G.** Freezing durante a apresentação o som. **C, H.** Reação ao choque. **D, I.** Freezing após pareamento CS+US. **E, I.** Teste da memória de medo condicionado realizado 24h após treino no grupo que recebeu bicuculina antes (E) e imediatamente após (I) o treino. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (A, B, E, F, H, I, J) ou mediana  $\pm$  IIQ (C, D, G). SAL-préTR n=6, BIC-préTR n=5, SAL-pósTR n=9, BIC-pósTR n=11. \*  $p < 0,05$ .

### **5.3. A desinibição da CeA diminui o fenótipo tipo-ansioso em fêmeas OVX (12 semanas), mas não altera a atividade locomotora.**

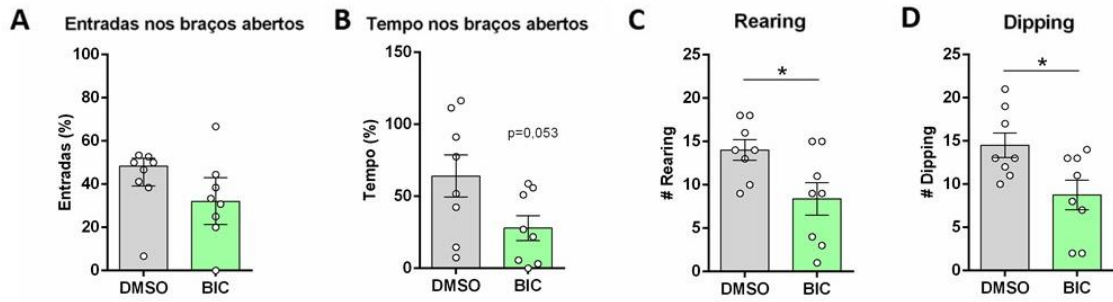
A desinibição da amígdala central melhorou a performance das fêmeas OVX no teste de memória de medo condicionado ao som. Para avaliar se os efeitos encontrados pelo tratamento com bicuculina, tanto no treino quanto no teste, se devem a alterações na ansiedade ou no padrão locomotor de fêmeas, realizamos o mesmo tratamento farmacológico anteriormente ao teste do labirinto em cruz elevado (Figura 19) e ao teste de campo aberto (Figura 20) em fêmeas OVX (12 semanas).

No labirinto em cruz elevado, a porcentagem de entradas nos braços abertos durante a livre exploração do aparato por 5 minutos mostrou-se levemente diminuída no grupo BIC em comparação ao grupo DMSO, mas sem atingir significância estatística (DMSO:  $48,34 \pm 12,83$ ; BIC:  $32,1 \pm 21,7$ ;  $U_{14}=16,50$ ,  $p=0,11$ ; Figura 19A). No entanto, quando avaliamos a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos sobre o tempo nos braços fechados, verificamos que os animais do grupo BIC evitaram permanecer nos braços abertos ( $27,93 \pm 8,64$ ) comparado ao grupo DMSO ( $64,07 \pm 14,72$ ) com um valor de  $p$  marginalmente significativo ( $t_{14}=2,12$ ;  $p=0,053$ ; Figura 19B). Os comportamentos de *rearing* (Figura 19C) e *dipping* (Figura 19D) também ocorreram em menor número no grupo BIC (*rearing*:  $8,34 \pm 1,88$ ; *dipping*:  $8,75 \pm 1,71$ ) comparado aos animais controle (*rearing*:  $14,0 \pm 1,2$ ,  $t_{14}=2,53$ ,  $p=0,02$ ; *dipping*:  $14,5 \pm 1,4$ ,  $t_{14}=2,59$ ,  $p=0,02$ ), sugerindo aumento de ansiedade no grupo BIC.

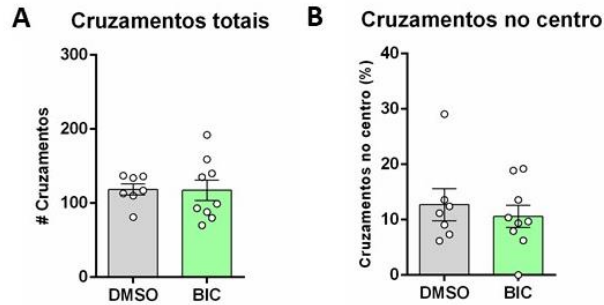
Ao avaliar a atividade locomotora após a administração de bicuculina na CeA de animais OVX, verificamos que esta droga não altera o número de cruzamentos totais (DMSO:  $118,3 \pm 7,56$ ; BIC:  $117,3 \pm 13,72$ ,  $t_{14}=0,05$ ,  $p=0,95$ ; Figura 20A) tampouco a porcentagem de cruzamentos no centro da arena (DMSO:  $11,19 \pm 6,23$ ; BIC:  $9,68 \pm 9,12$ ;  $U_{14}=29,0$ ,  $p=0,82$ ; Figura 20B).

Portanto, a desinibição da CeA modifica parâmetros associados à ansiedade nos animais OVX 12 semanas, diminuindo exploração dos braços abertos e redução de comportamentos exploratórios, o que sugere um fenótipo tipo-ansioso. Não houve qualquer prejuízo à atividade locomotora dos animais.





**Figura 17. Efeito do antagonista GABA-A (bicuculina) administrado intra-CeA 15 minutos antes do teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas OVX (12 semanas).** **A.** Porcentagem de entradas nos braços abertos. **B.** Porcentagem de tempo nos braços abertos. **C.** Número de explorações verticais (rearing). **D.** Número de mergulhos de cabeça (dipping). Dados mostrados como mediana  $\pm$  IIQ (Mann-Whitney) em A e média  $\pm$  SEM (teste t de Student) em B-D. DMSO n=7, BIC n=9. \* $p<0,05$ .



**Figura 18. Atividade locomotora 15 minutos após administração de antagonista GABA-A (bicuculina) intra-CeA em fêmeas OVX (12 semanas) no teste de campo aberto.** **A.** Cruzamento totais. **B.** Porcentagem de cruzamentos no centro. Dados mostrados como mediana  $\pm$  IIQ (Mann-Whitney) em A e média  $\pm$  SEM (teste t de Student) em B. DMSO n= 7, BIC n=9.

#### 5.4. A quantidade das enzimas GAD65 e GAD67 aumenta após privação de hormônios ovarianos por 12 semanas

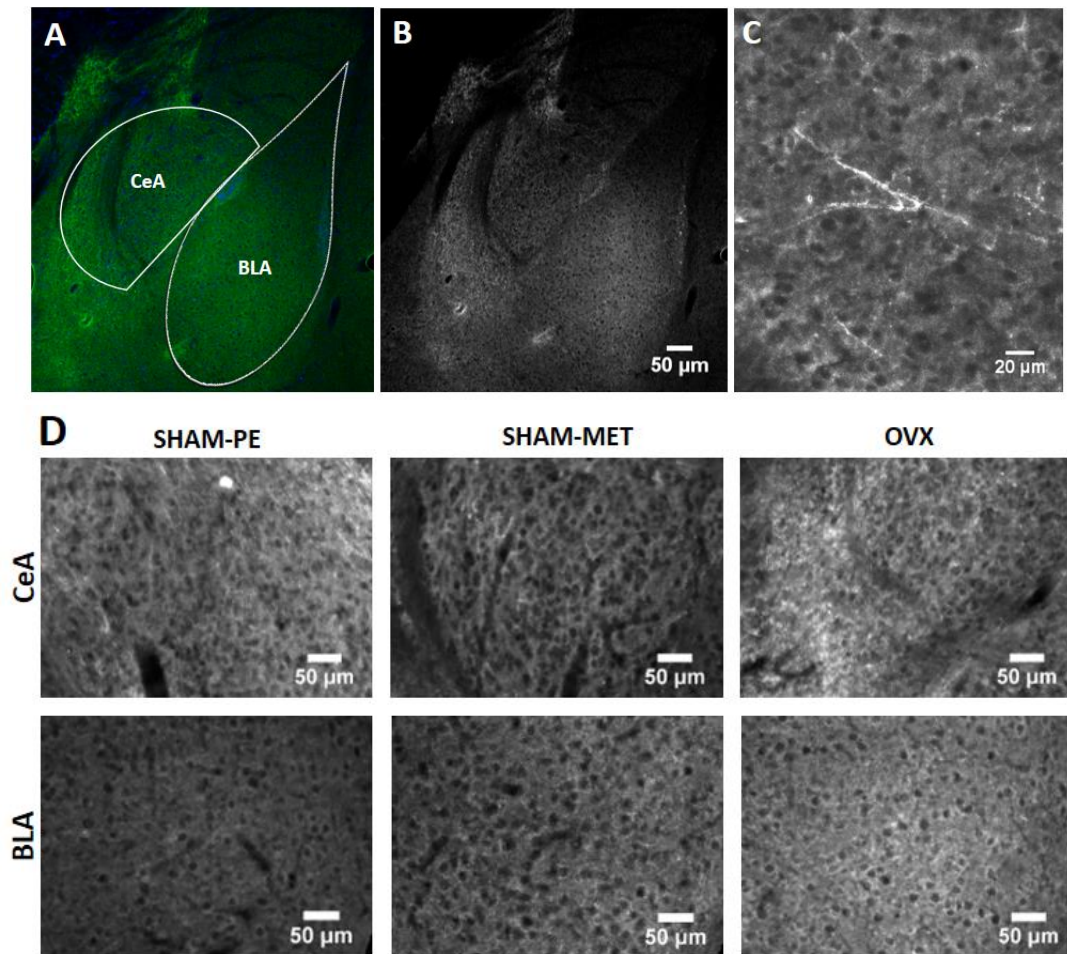
Visto que as fêmeas OVX possuem prejuízo de memória e a redução do tônus GABAérgico da CeA antes do treino a recupera, o próximo passo foi buscar um correlato molecular. Para isto, utilizamos a marcação pelas enzimas GAD65/67 (Figura 21), que fazem parte da maquinaria de síntese do neurotransmissor GABA e são frequentemente empregadas para identificação de neurônios inibitórios GABAérgicos no sistema nervoso central. Os níveis de GAD65/67 de fêmeas OVX foram comparados aos níveis de animais SHAM em duas fases opostas do ciclo estral em relação aos níveis sistêmicos de estrógenos: SHAM-PE em proestro (altos níveis de estrógeno) e SHAM-MET em metaestro (baixos níveis de estrógeno).

Para a quantificação da marcação por fluorescência, foram aplicados dois tipos de análise em que os parâmetros área marcada e intensidade da marcação foram extraídos das imagens sem (Figura 22A-C, G-I) e com (Figura 22D-F, J-L) remoção do *background*.

Nas análises sem remoção de *background* na CeA, a área fluorescente GAD65/67+ não diferiu entre os grupos (SHAM-PE:  $2,92 \pm 0,30$ ; SHAM-MET:  $2,46 \pm 0,44$ ; OVX:  $4,25 \pm 1,05$ ;  $F_{2,12}=1,80$ ,  $p=0,21$ ; Figura 22A) nem a intensidade por área (SHAM-PE:  $19,46 \pm 11,48$ ;  $14,57 \pm 12,33$ ;  $29,91 \pm 29,06$ ,  $H_2=2,96$ ,  $p=0,24$ ; Figura 22B), embora houve uma tendência no grupo OVX de apresentar valores maiores para os dois parâmetros. Evidentemente os limiares calculados pelo método *Triangle* para o grupo OVX ( $153 \pm 68,3$ ) se mostraram mais elevados do que nos grupos SHAM-PE ( $106 \pm 86,5$ ) e SHAM-MET ( $104 \pm 98$ ) ( $H_2=10,38$ ,  $p=0,006$ ; teste de comparações múltiplas de Dunn; Figura 22C), o que, juntamente à observação das imagens, nos fez questionar se este valor aumentado poderia retratar um *background* mais acentuado no grupo OVX.

A remoção do *background* em todos os grupos evidenciou diferenças (Figura 22D e E), mantendo o mesmo padrão observado nas Figuras 22A e 22B. A área marcada no grupo OVX foi superior ao grupo SHAM-MET, sem diferir do grupo SHAM-PE (SHAM-PE:  $2,85 \pm 0,22$ ; SHAM-MET:  $2,12 \pm 0,25$ ; OVX:  $3,49 \pm 0,39$ ;  $F_{2,12}=4,15$ ,  $p=0,043$ ; teste de Holm-Sidak; Figura 22D). O mesmo ocorreu quanto às intensidades por área, visto que as fêmeas OVX apresentaram maior intensidade de pixels ( $15,02 \pm 2,23$ ) do que fêmeas SHAM-MET ( $6,01 \pm 0,60$ ), mas não houve diferença em relação aos animais SHAM-PE ( $10,67 \pm 1,43$ ) ( $F_{2,12}=6,56$ ;  $p=0,012$ ; teste de Holm-Sidak; Figura 22E). Os limiares

traçados para o grupo OVX permaneceram altos e significativamente diferentes dos demais (SHAM-PE:70,69±4,35; SHAM-MET: 66,38±6,37; OVX: 87,48±4,20;  $F_{2,81}=4,90$ ,  $p=0,0098$ ; Figura 22F). Nesse caso, subtraído o *background*, possivelmente os maiores limiares atribuídos às fêmeas ovariectomizadas reflitam a maior marcação por GAD65/67, que modificaram o padrão dos histogramas de pixels neste grupo.

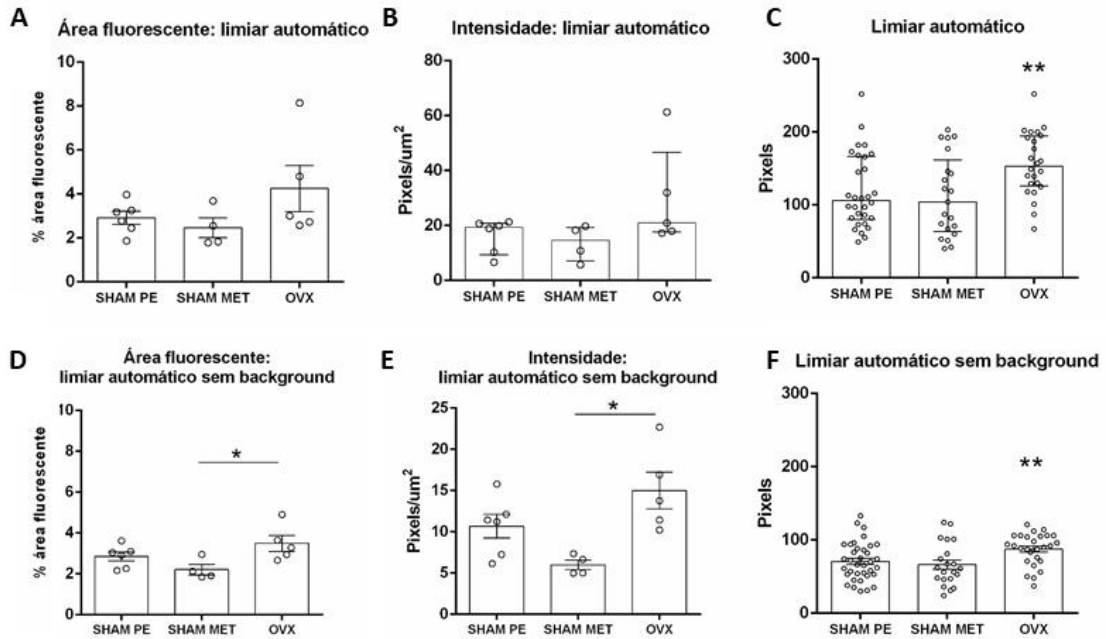


**Figura 19. Marcação por GAD65/67 (1:600) na amígdala de fêmeas C57BL/6.** **A.** Marcação das enzimas GAD65/67 (verde) e DAPI (núcleos celulares, em azul) em cores digitais. **B.** Imunorreatividade ao GAD65/67. **C.** Neurônio GAD65/67+. **D.** Imagens representativas da CeA e BLA nos diferentes grupos analisados (SHAM-PE, SHAM-MET e OVX). Na CeA, o grupo OVX mostrou aumento de imunorreatividade ao GAD65/67.

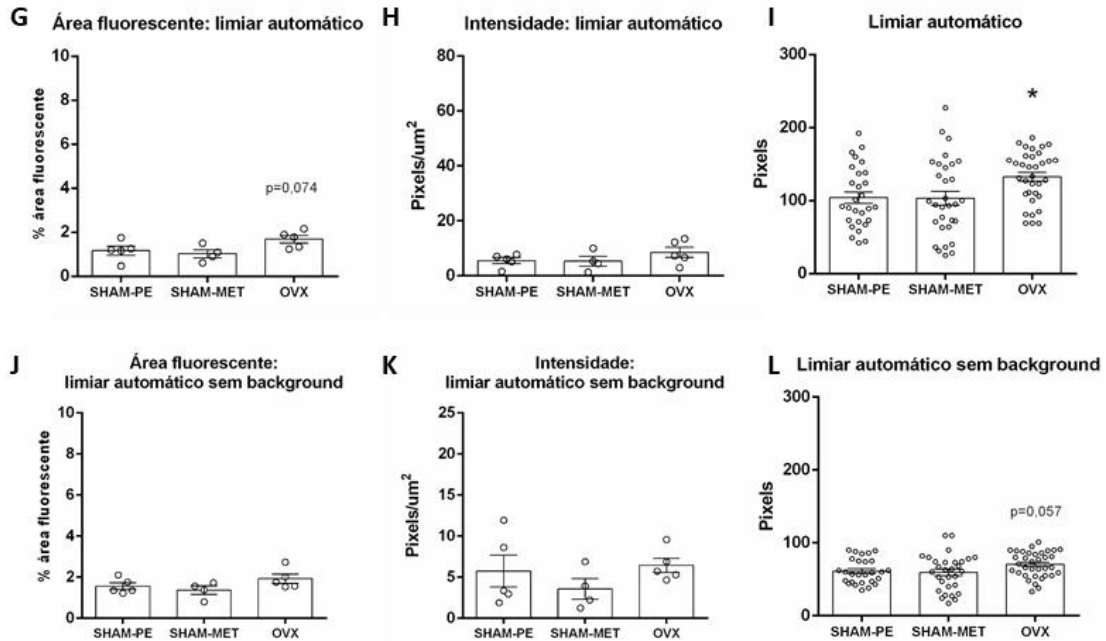
Visto que a BLA emite projeções para a CeA ao mesmo tempo que possui interneurônios inibitórios locais, também realizamos a quantificação da enzima GAD65/67 na BLA. Nas análises sem remoção do *background*, a área fluorescente no grupo OVX foi ligeiramente maior do que nos demais grupos, porém não atingiu significância estatística (SHAM-PE:  $1,17 \pm 0,20$ ; SHAM-MET:  $1,03 \pm 0,18$ ; OVX:  $1,69 \pm 0,17$ ,  $F_{2,12}=3,34$ ,  $p=0,074$ ; Figura 22G). As intensidades da fluorescência não se alteraram entre os grupos (SHAM-PE:  $5,53 \pm 1,09$ ; SHAM-MET:  $5,29 \pm 1,81$ ; OVX:  $8,52 \pm 1,93$ ;  $F_{2,12}=1,25$ ,  $p=0,33$ ; Figura 22H). Novamente, os limiares calculados para as imagens do grupo OVX foram mais elevados (SHAM-PE:  $104 \pm 7,89$ ; SHAM-MET:  $103,3 \pm 9,52$ ; OVX:  $132,6 \pm 6,02$ ;  $F_{2,90}=4,74$ ,  $p=0,011$ ; teste de Holm-Sidak, Figura 22I). Após a remoção do *background*, o grupo OVX exibiu porcentagem de área marcada mais próxima aos demais grupos (SHAM-PE:  $1,56 \pm 0,16$ ; SHAM-MET:  $1,37 \pm 0,20$ ; OVX:  $1,93 \pm 0,22$ ;  $F_{2,11}=1,99$ ,  $p=0,18$ ; Figura 22J). O padrão dos dados de intensidade/área tornou-se mais semelhante àquele visto na CeA, estando o grupo SHAM-MET menores valores de intensidade ( $3,58 \pm 1,24$ ) do que os animais SHAM-PE ( $5,76 \pm 1,93$ ) e OVX ( $6,44 \pm 0,87$ ). No entanto, o teste estatístico não detectou diferença entre os grupos ( $F_{2,11}=0,98$ ,  $p=0,41$ , Figura 22K). Por fim, os limiares definidos após a remoção do *background* tornaram-se mais uniformes, embora as fêmeas OVX tenham apresentado limiares sutilmente mais altos (SHAM-PE:  $61,15 \pm 3,29$ ; SHAM-MET:  $59,27 \pm 4,51$ ; OVX:  $70,51 \pm 2,95$ ;  $F_{2,89}=2,97$ ,  $p=0,057$ ; Figura 22L).

Esses resultados corroboram os dados farmacológicos por demonstrarem um maior conteúdo das enzimas GAD65/67 especificamente na CeA de fêmeas OVX, sugerindo aumento do tônus inibitório da CeA pela ovariectomia bilateral por 12 semanas.

**CEA**



**BLA**



**Figura 22. Quantificação da fluorescência GAD65/67 nas fatias de amígdala de fêmeas contendo CeA (A-F) e BLA (G-L).** A, D, G J. Porcentagem da área fluorescente. B, E, H, K. Intensidade dos pixels correspondentes à área fluorescente. C, F, I, L. Limiares calculados pelo método *Triangle*. As análises foram realizadas sem (A-C, G-I) e com (D-F, J-L) remoção do *background*. **CEA:** SHAM-PE n= 6, SHAM-MET n=4, OVX n= 5; Estruturas analisadas A-C: SHAM-PE n=30, SHAM-MET n=21, OVX n=24; D-F: SHAM-PE n=36, SHAM-MET n=21, OVX n=27. **BLA:** SHAM-PE n= 5, SHAM-MET n=4, OVX n= 5, Estruturas analisadas G-I: SHAM-PE n=28, SHAM-MET n=31, OVX: 34; J-L: SHAM-PE n=27, SHAM-MET n=30, OVX n=35. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

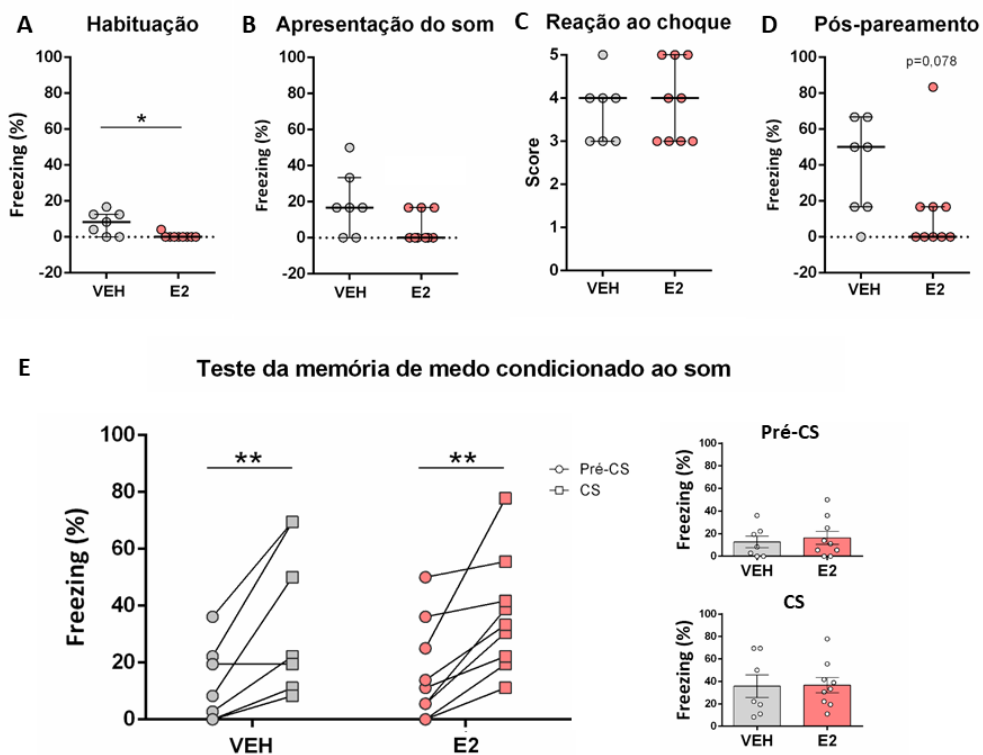
### 5.5. A sinalização aguda por estradiol na CeA durante a aquisição não altera a formação de memórias de medo condicionado em fêmeas OVX (12 semanas).

O estradiol é capaz de regular a inibição em tecidos cerebrais, tais como o hipocampo (Murphy et al., 1998). Para testar se a sinalização aguda pelo estradiol na CeA reverteria os prejuízos cognitivos causados pelo aumento de inibição na CeA de fêmeas OVX, administramos E2 encapsulado na molécula HBC (grupo E2) ou HBC em salina (grupo veículo, VEH) intra-CeA em fêmeas OVX (12 semanas).

Na fase de treino (Figura 23A-D), a presença de estradiol na CeA provocou redução dos níveis de *freezing* (E2:  $0 \pm 0$ ) comparado aos animais que receberam veículo (VEH:  $8,33 \pm 12,5$ ) ( $U_{15}=10,50$ ,  $p=0,019$ ; Figura 23A). O estradiol atenuou levemente o aumento da frequência de *freezing* (comparado à habituação), observado no grupo VEH, tanto na apresentação do som quanto no pós-pareamento, porém a diferença não foi significativa em ambos os momentos analisados (Apresentação do som VEH:  $16,67 \pm 33,33$ , E2:  $0 \pm 16,67$ ,  $U_{15}=16,50$ ,  $p=0,089$ ; Figura 23B; Pós-pareamento VEH:  $50 \pm 50$ , E2:  $0 \pm 16,67$ ,  $U_{15}=15,50$ ,  $p=0,078$ , Figura 23D). O estradiol administrado não causou qualquer alteração na reação ao choque das fêmeas tratadas ( $4 \pm 2$ ) em comparação ao grupo controle ( $4 \pm 1$ ) ( $U_{15}=28,50$ ,  $p=0,80$ ; Figura 23C).

No teste de retenção da memória (Figura 23E), os dois grupos comportaram-se de maneira similar, não havendo efeito do fator ‘tratamento’ ( $F_{1,14}=0,06$ ;  $p=0,80$ ). Houve efeito da sessão ( $F_{1,14}=27,4$ ;  $p=0,0001$ ) mas não houve interação entre os fatores ( $F_{1,14}=0,10$ ;  $p=0,75$ ). O efeito dos sujeitos foi significativo ( $F_{14,14}=4,85$ ;  $p=0,003$ ). No grupo controle (VEH pré-CS:  $12,70 \pm 5,17$ ; VEH CS:  $35,71 \pm 10,10$ ) e grupo tratado (E2 pré-CS:  $16,36 \pm 5,77$ ; E2 CS:  $36,73 \pm 6,75$ ), os animais apresentaram, em média, mais *freezing* durante o CS em relação ao Pré-CS ( $p=0,0001$ ; teste de comparações múltiplas de Sidak). Dessa forma, neste experimento não conseguimos reproduzir o prejuízo de memória que foi observado previamente em fêmeas OVX-controles e por isso não é possível avaliar o efeito do estradiol sobre o prejuízo de memória.

Os dados demonstram que a sinalização aguda por estradiol nesses animais não amplifica a formação da memória de medo, apesar de se mostrar eficaz em alterar comportamentos imediatamente após sua administração, na sessão de treino.



**Figura 23. Efeito da administração de estradiol (E2) intra-CEA antes do treino de aquisição da memória de medo condicionado em fêmeas OVX (12 semanas).** **A.** *Freezing* durante a habituação. **B.** *Freezing* durante a apresentação o som. **C.** Reação ao choque. **D.** *Freezing* após pareamento CS+US. **E.** Teste da memória de medo condicionado realizado 24h após treino. O *freezing* foi analisado na sessão pré-CS e CS. Dados são mostrados como mediana  $\pm$  IIQ (Mann-Whitney) em A-D, e mostrados como média  $\pm$  SEM (ANOVA de 2 vias com medidas repetidas e comparações múltiplas Sidak) em E. VEH n=7, E2 n=9. \* p<0,05; \*\*p<0,01.

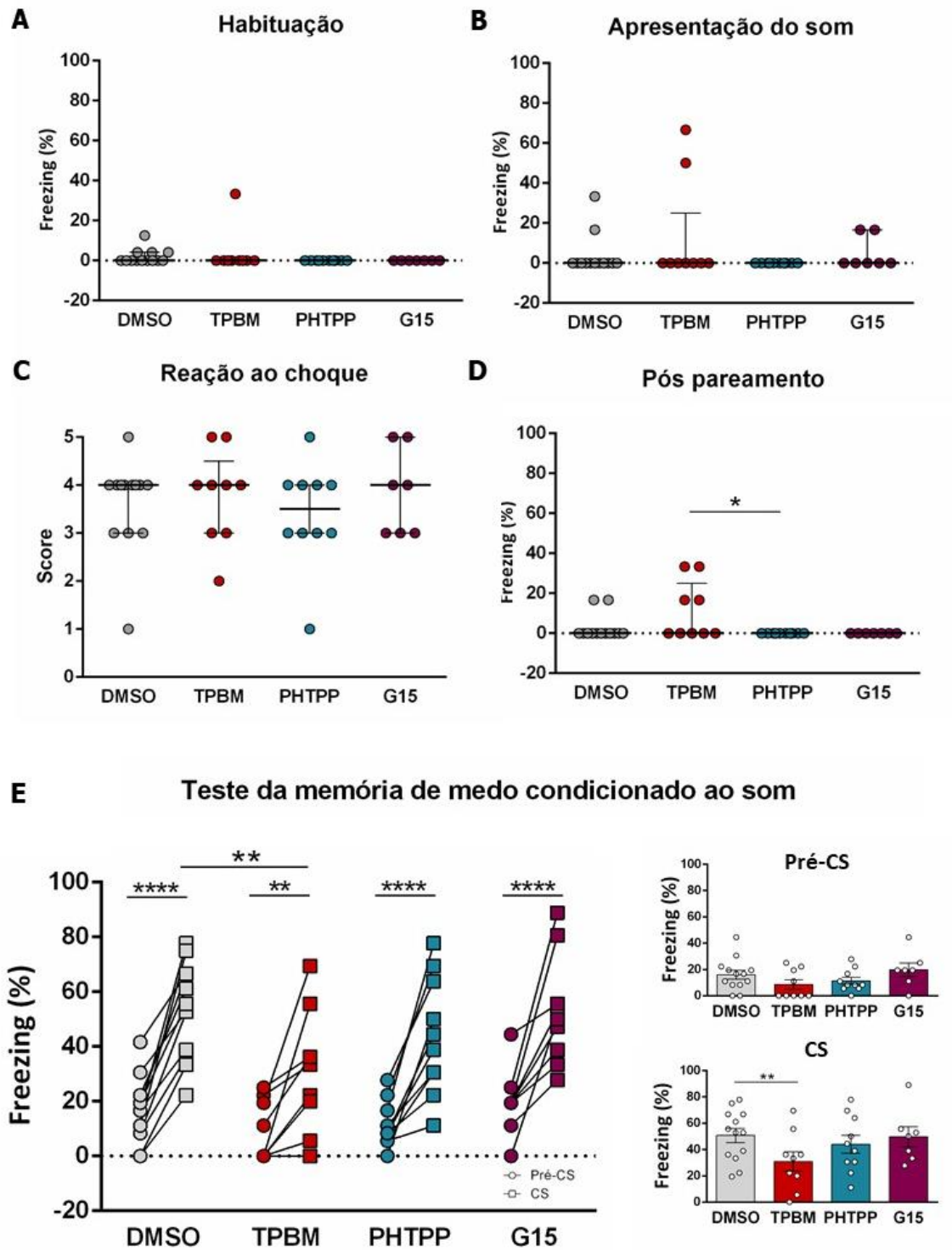
### 5.6. Em fêmeas normociclantes, o antagonismo de receptores de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) na CeA durante o treino prejudica a aquisição da memória de medo condicionado.

Para verificar se o estradiol tem papel fisiológico na aquisição da memória de medo condicionado ao som e quais os receptores envolvidos nesta sinalização, utilizamos antagonistas seletivos de receptores de estrógenos intra-CeA em fêmeas normociclantes durante a aquisição da memória. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento farmacológico: veículo (DMSO 20%), antagonista de  $ER\alpha$  (TPBM), antagonista de  $ER\beta$  (PHTPP) e antagonista de GPER (G15). Os animais receberam o tratamento farmacológico intra-CeA 15 minutos antes do treino do condicionamento ao medo pelo som.

Durante a habituação (Figura 24A), os níveis de *freezing* não diferiram entre os grupos (DMSO=1,92±1,01; TPBM=3,70±3,70; PHTPP=0±0; G15=0±0;  $H_3=5,75$ ,  $p=0,125$ ). Também não foi observada diferença no comportamento dos animais durante a apresentação do som (DMSO=3,85±2,77; TPBM=12,96±8,69; PHTPP=0±0; G15=4,76±3,07;  $H_3=2,94$ ,  $p=0,40$ ; Figura 24B). Quanto à reação ao choque (Figura 24C), os tratamentos farmacológicos não alteraram a reação dos animais ao US (TPBM=4±1,5; PHTPP=3,5±1; G15=4±2) quando comparado aos controles (DMSO=4±1) ( $H_3=0,91$ ,  $p=0,82$ ). No período pós-pareamento (Figura 24D), o teste detectou diferença entre os grupos TPBM (11,11±4,81) e PHTPP (0±0), mas esses grupos nem o grupo G15 (0±0) diferiram do grupo controle (2,57±1,74) ( $H_3=9,105$ ;  $p=0,028$ ).

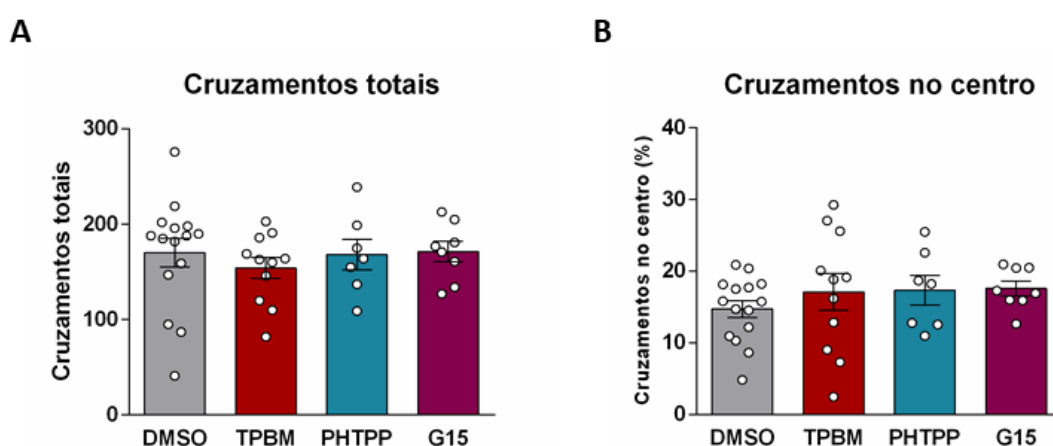
Na fase de teste da memória de medo, verificou-se efeito do tratamento ( $F_{3,36}=2,89$ ;  $p=0,049$ ) e da sessão ( $F_{1,36}=122,4$ ;  $p<0,0001$ ), mas não houve interação entre os fatores ( $F_{3,36}=1,28$ ;  $p=0,312$ ). Ao recorrer ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, verificou-se que apenas o tratamento com TPBM reduziu os níveis de *freezing* durante o CS (30,93±7,40) comparado ao controle DMSO (50,64±5,32) ( $p<0,01$ ). Dentro dos grupos, comparando as sessões, houve diferença entre pré-CS e CS no grupo DMSO (pré-CS: 16,02±3,36; CS: 50,64±5,32;  $p<0,0001$ ), no grupo PHTPP (pré-CS: 11,39±2,67; CS: 43,89±6,80;  $p<0,0001$ ) e G15 (pré-CS: 19,84±5,12; CS: 49,60±7,63;  $p<0,0001$ ; comparação múltipla de Sidak). Apesar da redução observada em relação ao controle na sessão CS, também houve diferença significativa no grupo TPBM entre as sessões (pré-CS: 8,64±3,63; CS: 30,93±7,40;  $p<0,01$ ) (Figura 24E).





**Figura 24. Efeito dos antagonistas de ER na CeA de fêmeas normociclantes no treino de aquisição da memória de medo condicionado ao som.** O comportamento de medo *freezing* foi analisado na sessão de treino (A, B e D) e teste (E). O antagonista ER $\alpha$  causou redução no *freezing* no período CS em comparação ao Pré-CS. **A.** *Freezing* durante a habituação. **B.** *Freezing* durante a apresentação do som. **C.** Reação ao choque. **D.** *Freezing* após pareamento CS+US. **E.** Teste da memória de medo condicionado realizado 24h após treino. O *freezing* foi comparado entre a sessão pré-CS e CS. Dados são mostrados como mediana  $\pm$  IIQ (Kruskall-Wallis) em A-D e média  $\pm$  SEM (ANOVA de 2 vias com medidas repetidas; comparações múltiplas de Dunnett e Sidak) em E. DMSO n=13, TPBM n=9, PHTPP n=10, G15 n=7. \*p<0,05, \*\* p<0,01.

Para verificar se os tratamentos farmacológicos afetaram a atividade locomotora dos animais, podendo influenciar na aquisição da memória de medo, o teste de campo aberto foi conduzido 15 minutos após a administração das drogas. Não foi observada diferença nos cruzamentos totais entre grupos (DMSO:  $170,2 \pm 15,01$ ; TPBM:  $154,0 \pm 11,11$ ; PHTPP:  $168,3 \pm 15,94$ ; G15:  $171,1 \pm 10,74$ ;  $F_{3,37}=0,33$ ;  $p=0,80$ ; Figura 25A). Os tratamentos também não alteraram o comportamento de tigmotaxia, verificado pela porcentagem de cruzamentos no centro na arena (DMSO:  $14,74 \pm 1,17$ ; TPBM:  $17,12 \pm 2,57$ ; PHTPP:  $17,35 \pm 2,08$ ; G15:  $17,61 \pm 1,02$ ;  $F_{3,37}=0,64$ ;  $p=0,59$ ; Figura 25B).



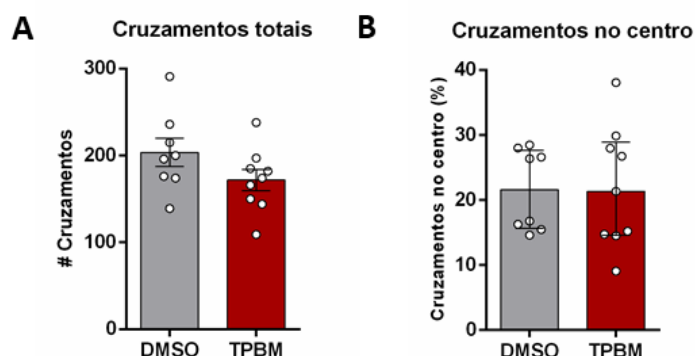
**Figura 25. Atividade locomotora e fenótipo tipo-ansioso 15 minutos após administração de antagonistas de ER intra-CeA no teste de campo aberto. A. Cruzamento totais. B. Porcentagem de cruzamentos no centro. Dados mostrados como média  $\pm$  SEM (One-way ANOVA). DMSO n= 15, TPBM n=11, PHTPP n=7, G15 n=8.**

A diminuição do comportamento de *freezing* no grupo TPBM no teste de memória de medo condicionado, em comparação ao grupo veículo, sugere a participação do receptor de estrógeno  $\alpha$  na aquisição e fases iniciais da consolidação da memória de medo auditiva, não havendo influência da droga sobre a atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso verificados no teste de campo aberto.

**5.7. Em fêmeas normociclantes, o antagonismo de receptores de estrógeno  $\alpha$  na CeA não altera o comportamento locomotor nem o comportamento tipo-ansioso nas fases de aquisição e evocação da memória de medo.**

Para testar se o TPBM poderia ter causado uma alteração persistente na CeA responsável por diminuir a expressão do *freezing* na sessão de teste, verificamos se este antagonista teria efeito na atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso 24h após sua administração, intervalo que coincide com a evocação da memória de medo.

Foi realizado o teste de campo aberto para verificação da atividade locomotora nesta janela de tempo específica (Figura 26). O tratamento com TPBM não alterou a quantidade de cruzamentos totais (DMSO:  $203,4 \pm 16,20$ ; TPBM:  $171,1 \pm 12,09$ ;  $t_{15}=1,59$ ;  $p=0,13$ ; Figura 26A), tampouco a porcentagem de cruzamentos no centro (DMSO:  $21,57 \pm 2,21$ ; TPBM:  $21,94 \pm 3,12$ ;  $U_{15}=34,0$ ;  $p=0,87$ ; Figura 26B). Portanto, a droga não foi capaz de alterar a locomoção dos animais no dia seguinte a sua injeção.



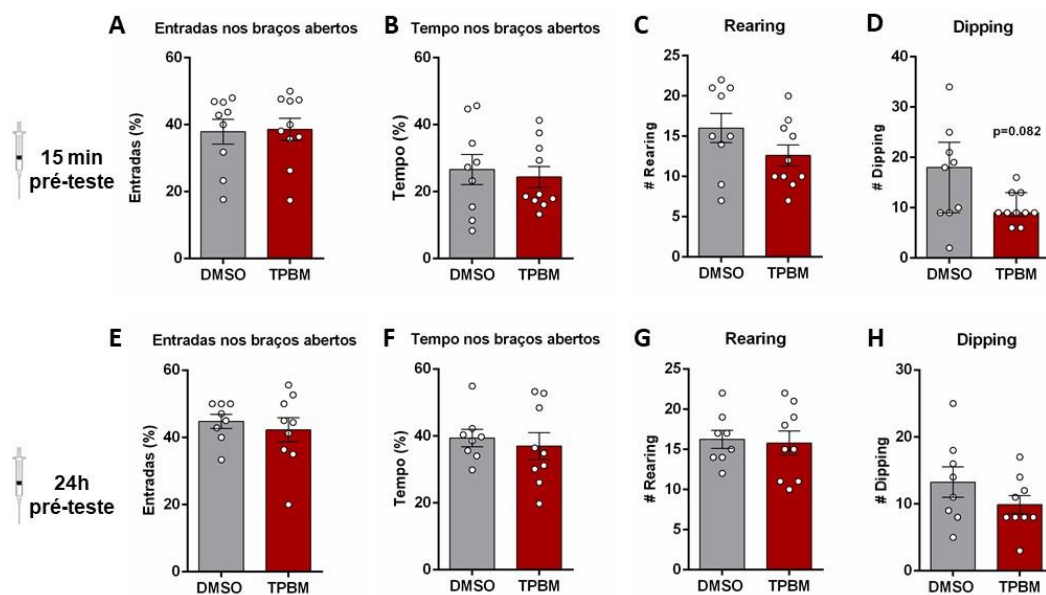
**Figura 26. Atividade locomotora e fenótipo tipo-ansioso 24h após administração de TPBM intra-CeA no teste de campo aberto. A.** Cruzamento totais. **B.** Porcentagem de cruzamentos no centro. Dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (teste t Student) em A e mediana  $\pm$  IIQ (Mann-Whitney) em B. DMSO n= 8, TPBM n=9.

Além disso, em vista da interação dos estrógenos com os fenótipos de ansiedade (Borrow & Handa, 2017), foi de nosso interesse avaliar se o antagonismo de receptores  $ER\alpha$  na CeA poderia alterar o estado de ansiedade do animal no momento do treino de aquisição (15 minutos após injeção) ou no período de evocação da memória (24h após injeção). Para responder a esta pergunta, utilizamos o teste do labirinto em cruz elevado após administração de TPBM nos tempos assinalados (Figura 27).

Permitiu-se que os animais explorassem o labirinto por 5 minutos e foram contabilizados a porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e os comportamentos de *rearing* e *dipping*. Na avaliação do efeito agudo da droga no fenótipo ansioso, verificamos que não houve interferência na porcentagem de entradas nos braços abertos no grupo TPBM-15min ( $38,59 \pm 3,29$ ) comparado aos controles (DMSO-15min:  $37,88 \pm 3,69$ ) ( $t_{17}=0,144$ ;  $p=0,89$ ; Figura 27A) assim como no tempo de permanência nesta parte do aparato (DMSO-15min:  $26,59 \pm 4,5$ ; TPBM-15min:  $24,35 \pm 3,16$ ) ( $t_{17}=0,42$ ,  $p=0,68$ ; Figura 27B). Os animais que receberam o antagonista realizaram índices de exploração vertical (*rearing*) e mergulhos de cabeça (*dipping*) ligeiramente menores que o grupo controle, porém a diferença entre os grupos não atingiu significância estatística. No grupo TPBM, o número de *rearings* foi  $12,6 \pm 1,32$ , comparado a  $16,0 \pm 1,82$  nos controles ( $t_{17}=1,54$ ;  $p=0,14$ ; Figura 27C). A quantidade de *dippings* realizados foi  $9,00 \pm 4,75$  no grupo TPBM e  $18,0 \pm 14,0$  no grupo DMSO, mas não houve diferença estatística ( $U_{17}=24,0$ ;  $p=0,082$ ; Figura 27D). Observou-se grande variabilidade no grupo controle nesta tarefa em contraste a maior homogeneidade no grupo que recebeu a droga.

Ao verificar se a droga poderia alterar o comportamento dos animais 24h após sua administração, momento em que esses estariam evocando a memória no protocolo de condicionamento ao medo, não detectamos diferenças nos parâmetros analisados. Primeiramente, não houve diferença na porcentagem de entradas nos braços abertos (DMSO-24h:  $44,78 \pm 2,09$ ; TPBM-24h:  $42,24 \pm 3,62$ ;  $t_{15}=0,59$ ;  $p=0,57$ ; Figura 27E). A droga também não alterou o tempo de permanência nos braços abertos (DMSO-24h:  $39,39 \pm 2,62$ ; TPBM-24h:  $36,97 \pm 3,99$ ;  $t_{15}=0,49$ ;  $p=0,63$ ; Figura 27F). Os comportamentos analisados não foram alterados pela ação do antagonismo de ER $\alpha$ . O *rearing* durante a tarefa foi similar (DMSO-24h:  $16,25 \pm 1,13$ ; TPBM-24h:  $15,78 \pm 1,50$ ;  $t_{15}=0,25$ ;  $p=0,81$ ; Figura 27G) e o *dipping* foi, mais uma vez, sutilmente menor, mas estatisticamente não houve diferença significativa (DMSO-24h:  $13,25 \pm 2,27$ ; TPBM-24h:  $9,89 \pm 1,37$ ;  $t_{15}=1,30$ ;  $p=0,21$ ; Figura 27H).

Portanto, a ação da droga na CeA durante a aquisição da memória de medo ou sua evocação não foi capaz de alterar o estado ansioso do animal, não sendo responsável pelo déficit de memória encontrado no grupo TPBM.



**Figura 27.** Efeito do antagonista de ER- $\alpha$  (TPBM) 15 minutos (A-D) ou 24h (E-H) após administração intra-CeA em fêmeas normociclantes no labirinto em cruz elevado. **A, E:** Porcentagem de entradas nos braços abertos. **B, F:** Porcentagem de tempo nos braços abertos. **C, G:** Número de explorações verticais (*rearing*). **D, H:** Número mergulhos de cabeça (*dipping*). Dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (teste t de Student) em A-H exceto em D, em que são mostrados como mediana  $\pm$  IIQ (Mann-Whitney). DMSO-15min n=9, TPBM-15min n=10, DMSO-24h n=8, TPBM-24h n=9.

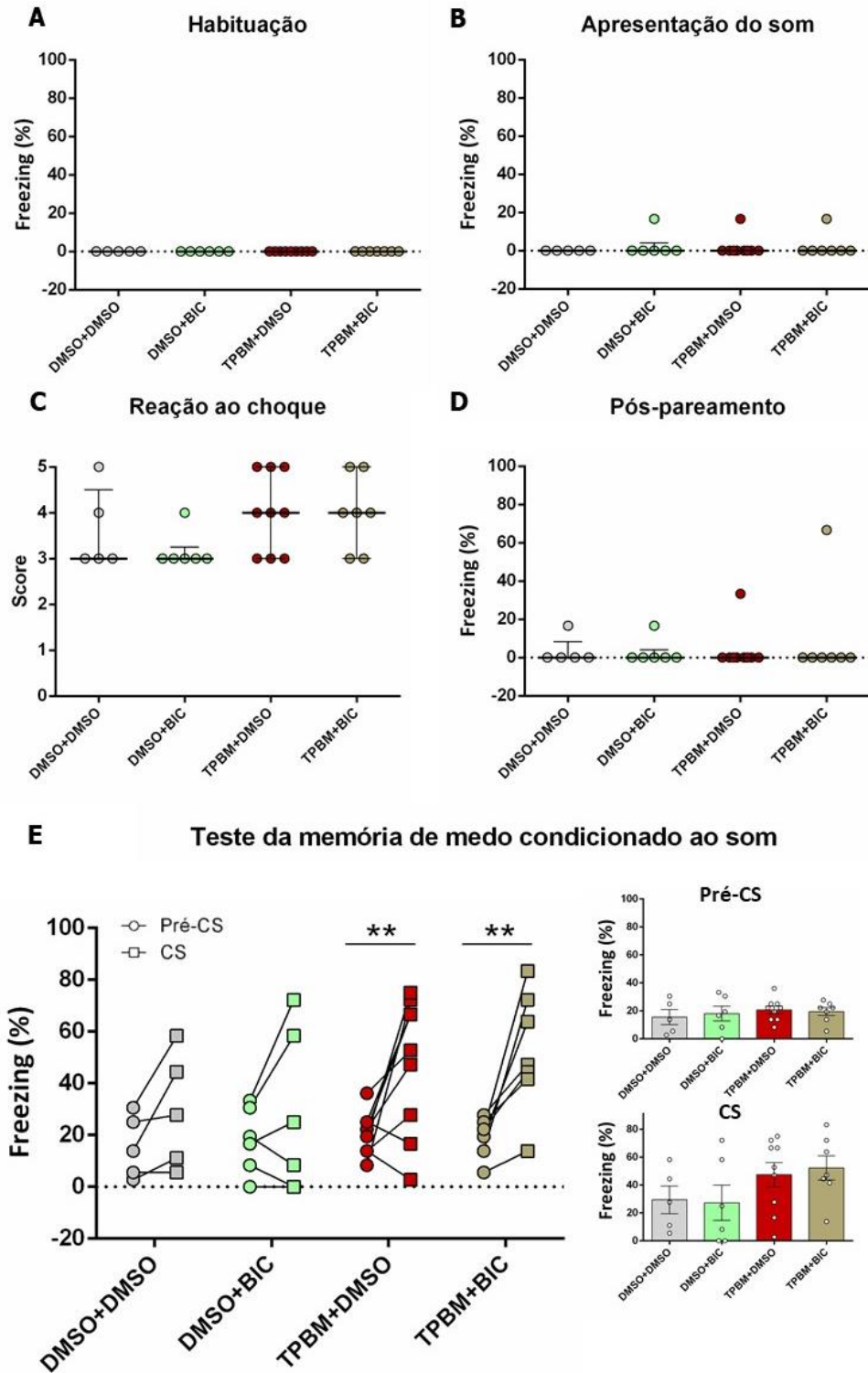
### 5.8. Efeito do bloqueio de receptores GABA-A na CeA sobre o prejuízo de memória causado pelo antagonista de ER $\alpha$ (TPBM).

Constatamos que o bloqueio da sinalização de estrógenos via ER $\alpha$  na CeA durante o condicionamento ao medo implica em um prejuízo parcial de memória em fêmeas normociclantes. Nos perguntamos se este prejuízo resulta de alterações no tônus inibitório local induzidas pelo bloqueio de sinalização de E2. Pressupomos que, numa situação fisiológica, o estradiol endógeno regula o tônus GABAérgico da CeA, propiciando a excitabilidade necessária à aquisição da memória de medo. O uso do antagonista estaria deslocando o equilíbrio excitação-inibição em direção à inibição, causando o déficit observado. Para testar esta hipótese, investigamos se o prejuízo causado pelo bloqueio dos ER $\alpha$  é revertido na presença do antagonista GABA-A em fêmeas normociclantes.

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento farmacológico, recebendo duas injeções consecutivas: DMSO+DMSO, DMSO+BIC, TPBM+DMSO e TPBM+BIC. Durante a habituação, não foram observados episódios de *freezing* em nenhum animal (Figura 28A). Este comportamento também foi pouco observado durante a apresentação do som (DMSO+BIC:  $0 \pm 4,17$ ; demais grupos:  $0 \pm 0$ ;  $F_{3,23}=0,85$ ,  $p=0,84$ ; Figura 28B). A reação ao choque não diferiu estatisticamente entre os grupos ( $F_{3,23} = 4,99$ ,  $p=0,17$ ), porém a maior parte dos animais DMSO+DMSO ( $3 \pm 1,5$ ) e DMSO+BIC ( $3 \pm 0,25$ ) realizaram corrida, ao passo que os demais grupos apresentaram comportamentos variados, com mediana superior (TPBM+DMSO:  $4 \pm 2$ ; TPBM+BIC:  $4 \pm 2$ ; Figura 28C). Após o pareamento, os animais também realizaram pouco *freezing*, não diferindo entre os grupos (DMSO+DMSO:  $0 \pm 8,34$ ; DMSO+BIC:  $0 \pm 4,17$ ; TPBM+DMSO:  $0 \pm 0$ ; TPBM+BIC:  $0 \pm 0$ ;  $F_{3,23} = 0,13$ ,  $p=0,99$ ; Figura 28D).

Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram testados para a memória de medo condicionado (Figura 28E). Não houve efeito dos tratamentos sobre esta memória ( $F_{3,23}=1,3$ ;  $p=0,31$ ) nem interação entre os fatores ( $F_{3,23}=1,6$ ;  $p=0,22$ ), porém houve efeito da sessão ( $F_{1,23}=22,6$ ;  $p<0,0001$ ) e do pareamento dos sujeitos ( $F_{23,23}=2,14$ ;  $p=0,04$ ). Não houve diferença entre as sessões no grupo DMSO+DMSO (Pré-CS:  $15,6 \pm 5,4$ ; CS:  $29,4 \pm 9,9$ ), sugerindo que a alteração do protocolo prejudicou o condicionamento nos animais controle. O grupo DMSO+BIC também não apresentou diferença estatística entre Pré-CS e CS (Pré-CS:  $18,1 \pm 5,2$ ; CS:  $27,3 \pm 12,7$ ), comportando-se de maneira semelhante ao grupo controle. O teste de comparações múltiplas de Dunnett apontou diferenças entre as sessões Pré-CS e CS nos grupos TPBM+DMSO (Pré-CS:  $20,7 \pm 2,7$ ; CS:  $47,5 \pm 8,7$ ,  $p<0,01$ ) e TPBM+BIC (Pré-CS:  $19,4 \pm 2,8$ ; CS:  $52,4 \pm 8,7$ ;  $p<0,01$ ), produzindo resultados inesperados, uma vez que o grupo que recebeu TPBM+DMSO mostrou medo condicionado superior ao grupo controle DMSO+DMSO (Figura 28E) e em oposição aos dados encontrados com injeção única de TPBM no experimento anterior (Figura 24E).

Este experimento, contudo, não nos permitiu concluir se há interação do estradiol com o sistema GABAérgico devido à ausência de condicionamento no grupo controle DMSO+DMSO e ao aparecimento de uma memória robusta no grupo TPBM+DMSO.



**Figura 28.** Efeito da co-administração do antagonista de ERA (TPBM) e antagonista GABA-A (bicuculina) na CeA de fêmeas normociclantes no treino de aquisição da memória de medo condicionado ao som. O comportamento de medo *freezing* foi analisado na sessão de treino (A, B e D) e teste (E). **A**, *Freezing* durante a habituação. **B**, *Freezing* durante a apresentação do som. **C**, Reação ao choque. **D**, *Freezing* após pareamento CS+US. **E**, Teste da memória de medo condicionado realizado 24h após treino. O *freezing* foi analisado na sessão pré-CS e CS. Dados mostrados como mediana ± IIQ em A-D (Kruskall-Wallis) e média ± SEM em E (ANOVA de 2 vias com medidas repetidas; correção de Dunnett em Pré-CS e Sidak em CS). DMSO+DMSO n=5, DMSO+BIC n=6; TPBM+DMSO n=9, TPBM+BIC n=7.

## 6. DISCUSSÃO

A amígdala central (CeA) vem ganhando protagonismo nos processos relacionados ao condicionamento ao medo pelo som. Ciochi (2010), Wilensky (2006) e colaboradores mostraram que a dissociação da CeA do restante da amígdala causou enormes prejuízos para a aquisição da memória de medo *cued* em roedores do sexo masculino (Ciochi et al., 2010; Wilensky et al., 2006). Entretanto, grande parte dos trabalhos são realizados apenas em machos, negligenciando as particularidades do cérebro feminino e os efeitos dos hormônios sexuais.

O presente estudo investigou o papel da CeA na aquisição da memória de medo condicionado ao som em camundongos do sexo feminino e seu envolvimento com os déficits observados em fêmeas OVX (12 semanas), descritos na Tese de Doutorado de Cristiane Bastos (Bastos, 2015). Neste estudo, Bastos mostrou que, comparados ao grupo SHAM, animais fêmeas OVX (12 semanas) possuíam prejuízo total ou parcial na formação da memória de medo condicionado ao som. A CeA mostrou-se uma boa candidata à ação de estrógenos e como sítio de alterações fisiológicas causadas pela privação hormonal crônica. Primeiro, por exibir receptores de estrógenos de ambos os três subtipos de ER ( $\alpha$ ,  $\beta$  e GPER) (Osterlund et al., 1998; Tian et al., 2013). Segundo, pela alta sensibilidade exibida durante o treino de uma tarefa de reconhecimento de objeto após a terapia de reposição hormonal em fêmeas OVX (Fonseca et al., 2013). O terceiro ponto baseia-se no conhecimento de que o estradiol exerce controle sobre a atividade de interneurônios, modula correntes inibitórias e regula a síntese de GABA (Hudgens et al., 2009; Rudick & Woolley, 2000). Tendo em vista que a CeA é composta por uma rede de neurônios GABAérgicos, é possível que os estrógenos atuem nesta estrutura.

Inicialmente, buscamos reproduzir em fêmeas normociclantes o efeito encontrado ao inibir a CeA de machos. A ausência de acréscimo na resposta de medo durante o período CS no grupo que recebeu muscimol (MUS) mostra que os animais não atribuíram qualquer valência ao som. Esse resultado reproduz o efeito encontrado pela inibição da CeA (Ciochi et al., 2010; Wilensky et al., 2006). Se inibir a CeA no momento da aquisição da memória de medo resulta em prejuízo de memória, devemos supor que ou esta estrutura provê *inputs* para regiões onde ocorre plasticidade ou eventos plásticos se dão na própria CeA. De fato, recentemente ambos foram demonstrados. A inibição optogenética de células PKC- $\delta$ <sup>+</sup> na CeA reduziu o fortalecimento sináptico (razão dos



receptores AMPA/NMDA) na LA, ao mesmo tempo que prejudicou o condicionamento, demonstrando que a CeA regula a plasticidade na BLA (Yu et al., 2017).

Em comparação à BLA, sabe-se pouco dos eventos de plasticidade que ocorrem na CeA para a formação da memória de medo. A hiperpolarização pelo muscimol e o bloqueio de receptores NMDA durante o condicionamento provocam deficiências no aprendizado de medo (Goosens & Maren, 2003). A plasticidade pode ocorrer em vários locais dentro da rede inibitória da CeA (Ehrlich et al., 2009). É possível que ocorra diretamente em *inputs* sensoriais sobre a CeM, visto que esta recebe projeções do tálamo. Em fatias contendo amígdala, Samsons *et al.* demonstraram que as projeções talâmicas exibem LTP pré-sináptico dependente de NMDA nos contatos com as células da CeM após estimulação de alta frequência (Samson, 2005). Outra possibilidade seria a potenciação dos *inputs* sobre a CeL, que é contatada pelo PBN e BLA, dentre outros. Foi verificada a existência de LTP pré-sináptico que resulta no aumento da probabilidade de liberação de neurotransmissores entre PBN e CeL (Lopez De Armentia & Sah, 2007). Na via BLA-CeA, sinapses excitatórias entre LA e células SOM+ da CeL são fortalecidas após o condicionamento por mecanismos pré-sinápticos e o impedimento de plasticidade nessa via prejudica a aquisição da memória de medo condicionado (Li et al., 2013). Portanto, as formas de potenciação envolvendo a CeA são diversificadas e a manipulação pelo muscimol, inibindo toda a estrutura, provavelmente impactou um ou vários desses eventos.

A inibição da CeA também alterou a percepção ao choque nos animais, que já foi relatada em outros trabalhos. Neste estudo, todos os animais que receberam muscimol reagiram ao estímulo nociceptivo com corrida (escore = 3), que representa uma reação qualitativamente mais amena que o salto horizontal observado em outros grupos. Por isso, sugerimos que a inibição da CeA abrandou a reação ao choque. Han e colaboradores (2015) atribuíram à CeA um papel importante na percepção central da dor ao investigar a transmissão do estímulo nociceptivo pela via espino-parabraquial à amígdala, inclusive durante o pareamento CS+US. Neurônios do núcleo parabraquial (PBN), que participam do processamento central da dor e são essenciais para a percepção do choque nas patas (S. Han et al., 2015), são anatômica e funcionalmente conectados à CeA (Bernard et al., 1993; Han et al., 2010). A inativação de neurônios da subpopulação CGRP+ (*calcitonin gene-related protein*) na CeA gerou ausência de resposta ao choque no paradigma de condicionamento clássico. A ativação, por sua vez, substituiu o US no condicionamento ao medo contextual e à pista (Han et al., 2015). Em concordância, Yu *et al.* mostraram

que outra subpopulação da CeA, PKC- $\delta$ +, também é responsiva ao choque e provê informação aversiva ao animal (Yu et al., 2017),

As conexões entre PBN e CeA eram, no início dos estudos sobre circuito de medo, interpretadas simplesmente como uma maneira adicional pela qual a informação sobre o choque era integrada ao circuito após a convergência dos estímulos CS e US na LA. Neste contexto, a CeA era capaz somente de modificar o *output* por meio de sua atividade dependente do US (LeDoux, 2000). Atualmente, a CeA tem sido colocada como estrutura que propicia o aprendizado, e não apenas reguladora do *output* (Fadok et al., 2018). Confirmamos, com dados coletados em fêmeas, a participação, ainda que tímida, da CeA no processamento do choque, e sua participação fundamental na aquisição da memória de medo condicionado.

De maneira curiosa, a inibição da CeA, principal *output* da amígdala, causou aumento da resposta de *freezing* após o pareamento. Os animais MUS, apesar de terem reagido menos ao US, foram capazes de percebê-lo e atribuir valência negativa a ele durante as fases finais do treino. A inibição da CeA pode ter causado desequilíbrio na função de integração da resposta ansiogênica realizada pela amígdala, privilegiando o efeito da projeção da BLA para outros núcleos, como o BNST. O BNST promove resposta ansiogênica à situações de estresse (Christianson et al., 2011). A ativação da via BLA-BNST pelo choque pode ter causado os efeitos observados, independentemente da CeA, mas outros estudos devem ser conduzidos para esclarecer esse ponto.

A inibição da CeA foi prejudicial ao aprendizado assim como a privação crônica ovariana (OVX 12 semanas) (Bastos, 2015). Para testar se o prejuízo de memória das fêmeas OVX reportado previamente por nosso grupo estava relacionado a uma alteração na fisiologia da CeA, nossa estratégia foi desinibir a CeA de fêmeas OVX utilizando o antagonista GABA-A, a bicuculina. Trabalhamos com a hipótese de que a CeA das fêmeas OVX encontrava-se mais inibida, e por isso ocorreu prejuízo na memória dependente de amígdala. A administração da droga foi realizada em dois momentos, anterior e posteriormente ao treino de aquisição. Reproduzimos o prejuízo de memória no grupo controle que recebeu salina antes do treino (OVX SAL Pré-TR), e um prejuízo parcial no grupo controle que foi tratado após o treino (OVX SAL Pós-TR). Somente a desinibição farmacológica da CeA anteriormente ao treino foi capaz de reverter o déficit de memória no grupo OVX. Observamos que a bicuculina pré-treino ampliou o comportamento de medo durante a evocação da memória quando comparado ao respectivo grupo controle. Isto nos leva a confirmar nossa hipótese de que um desbalanço

na função da CeA está relacionado ao déficit observado nas fêmeas OVX, provavelmente envolvendo o bloqueio da plasticidade sináptica que leva à formação da memória.

Para explorar o efeito da bicuculina sobre a CeA, avaliamos se o reparo da memória poderia ter ocorrido por fatores relacionados à ansiedade. Medo e ansiedade, embora muitas vezes utilizados de maneira intercambiável, são conceitos distintos. A ansiedade é um estado de alta vigilância e responsividade, com valência negativa, que pode ocorrer normalmente, sendo adaptativa, ou pode acontecer de forma crônica, sendo patológica. A ansiedade emerge como resposta a um estímulo ambíguo, que não impõe perigo imediato. Já o medo é a emoção que emerge quando a fonte da ameaça é eminente e real (Calhoun & Tye, 2015; LeDoux & Pine, 2016). Sabemos, com base em estudos realizados por nosso grupo, que a ovariectomia de 12 semanas aumenta a emergência de comportamentos tipo-ansioso, expressos como a diminuição de entradas e da permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e índices mais baixos de comportamentos exploratórios neste aparato comparados aos animais SHAM (Bastos, 2015; Castro, 2017). Fêmeas OVX (12 semanas) também apresentaram aversão ao compartimento claro no teste de transição claro-escuro (Castro, 2017). Neste estudo, a desinibição da CeA em fêmeas OVX resultou na redução significativa dos parâmetros de exploração no labirinto em cruz elevado e na redução de tempo nos braços abertos, indicando aumento de ansiedade, sem qualquer efeito na locomoção. Em machos, o mesmo efeito foi observado após administração sistêmica de bicuculina (Dalvi & Rodgers, 1996) e, na CeA, o aumento da transmissão GABAérgica parece ser um dos mecanismos ansiolíticos do etanol (Roberto et al., 2003). O aumento de ansiedade provocado pela bicuculina nos animais OVX pode ter sido um fator favorável ao aparecimento de uma memória de medo condicionado ao som no grupo BIC-pré-TR.

Baseando-se no papel da CeA na circuitaria da ansiedade, o efeito ansiogênico da bicuculina era esperado. Lesões na CeA aumentam a exploração dos braços abertos em animais estressados cronicamente (Ventura-Silva et al., 2013). A ativação dos corpos celulares da BLA provoca aumento da ansiedade, possivelmente pela ativação direta de neurônios da CeM, que projetam-se para a PAG. Já a fotoestimulação da via BLA-CeL é ansiolítica, por estimular células na CeL que projetam-se diretamente para a CeM, inibindo o *output* da amígdala com conseqüente redução da resposta de ansiedade (Tye et al., 2011). A modulação farmacológica da CeA como um todo não nos permite distinguir quais subpopulações estão sendo mais afetadas, mas pelo resultado encontrado

neste estudo, podemos concluir que nossa manipulação acarretou desinibição da CeM, fazendo emergir comportamentos tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado.

Sugerimos que a CeA se encontrava mais inibida em termos basais e/ou os *inputs* excitatórios sobre ela estavam enfraquecidos em fêmeas OVX, dado que a restauração do balanço excitação/inibição, em direção à excitação, recuperou a memória. Um aumento da inibição basal em fêmeas OVX pode ser sugerido por dados do nosso grupo, coletados Luciana Castro em sua dissertação de mestrado (2017), que mostraram maior expressão de c-Fos em neurônios da CeA nos animais OVX naïve comparados aos SHAM naïve (Castro, 2017). Células c-Fos+ em maior número podem indicar uma maior atividade dos neurônios inibitórios, que prevalecem nesta estrutura, resultando em aumento da inibição basal. Ainda, observou-se ativação reduzida da BLA em animais OVX naïve, sugerindo uma redução no *input* excitatório sobre a CeA.

No estudo de Bastos (2015), a mesma abordagem havia sido realizada em animais OVX e SHAM treinados na tarefa de condicionamento ao medo com posterior contagem de células c-Fos+ após o teste de evocação. A amígdala dos animais OVX não condicionados mostrou padrão de ativação alterado em relação aos SHAM, mas em contraste aos dados de Castro (2017), já que, no grupo controle (não condicionado), CeL e CeM expressaram menos c-Fos nos animais OVX do que SHAM. Nos grupos condicionados, a ativação da BLA, CeL e CeM foi maior nos animais OVX do que SHAM, contrastando com a ausência de expressão de respostas de medo nas OVX. Ainda, a CeA, como um todo, mostrou-se mais ativada nas OVX condicionadas em comparação às OVX não condicionadas, sugerindo que o condicionamento alterou, de alguma forma, a ativação da CeA, mas não o suficiente para modificar o comportamento frente ao CS. A administração local de bicuculina parece reestabelecer o desequilíbrio funcional da CeA, intimamente atrelado aos processos de aprendizagem.

Também observamos reação diferenciada ao som nas fêmeas OVX, que apresentaram aumento de respostas defensivas no período de apresentação do som, quando este ainda era um estímulo neutro. Um pequeno aumento também foi observado nos animais controle (OVX-VEH) do experimento com E2 intra-CeA. Essa reatividade demonstra que a surdez não seria uma razão para o déficit no condicionamento no grupo OVX, embora um estudo utilizando fêmeas OVX (3 semanas) identificou maior latência de respostas auditivas no tronco encefálico à estimulação por 40kHz neste grupo, indicando piora na performance auditiva (Coleman et al., 1994). Entretanto, o nosso estudo se difere do de Coleman *et al.* pela duração da ovariectomia, que por ser mais

longa pode ter causado outras alterações no sistema auditivo. De fato, os hormônios ovarianos atuam no sistema auditivo de mulheres e roedores. Durante o ciclo menstrual, mulheres apresentam melhor performance auditiva (limiares auditivos mais baixos) nos estágios tardios da fase folicular, em que os estrógenos estão elevados (Souza et al., 2017). Em roedores, o sistema auditivo expressa receptores de estrógenos, que variam conforme os níveis de E2 e flutuam ao longo do ciclo estral (Charitidi et al., 2012). Ainda que a função auditiva tenha sido comprometida pela OVX, nossos resultados mostram que esses animais reagem de maneira exacerbada ao som. É possível que essa percepção disfuncional ocorra em um nível posterior à percepção sensorial, ou seja, em áreas associativas como a amígdala, que recebe *inputs* sobre a informação sonora. No caso das fêmeas OVX, a resposta exacerbada ao som pode ser um reflexo da atividade alterada da amígdala.

Em consonância com essa hipótese, as manipulações na CeA com a bicuculina em fêmeas OVX apontam para contribuição desta estrutura à modulação da resposta ao som. Em fêmeas OVX, a bicuculina pré-treino atenuou o *freezing* em resposta ao som com significância estatística. É plausível que a administração intra-CeA de bicuculina exerça efeitos neste substrato mediante a apresentação do estímulo sonoro, visto que a amígdala é particularmente sensível a estímulos auditivos, o que propicia seu papel fundamental no condicionamento ao medo. A porção lateral (LA) recebe informação sensorial sonora do tálamo, e esses *inputs* também alcançam a CeA diretamente (Samson, 2005). A amígdala também exerce modulação sobre a resposta de ansiedade (Tye et al., 2011) e sobre amplitude da resposta de sobressalto (Suzanne & Canlon, 2012), que é a reação a sons de alta intensidade. Portanto, modular a atividade da amígdala foi eficaz em modificar comportamentos de *freezing* durante o treino em fêmeas OVX por seu papel sobre a percepção auditiva ou sobre o estado emocional dos animais.

Até então, observamos que manipulações em sentidos contrários (agonista vs. antagonista GABAérgico intra-CeA) em fêmeas com status hormonal opostos (normociclantes vs. OVX) produziram fenótipo semelhante: 1) o muscimol prejudicou a memória em fêmeas normociclantes, já a bicuculina recuperou esta memória em fêmeas OVX, 2) aumento de *freezing* ao som após muscimol intra-CeA e este aumento em fêmeas OVX foi revertido pela bicuculina intra-CeA, e 3) o aumento de *freezing* após pareamento nas fêmeas OVX BIC pré-treino foi visto também no grupo muscimol intra-CeA. Isto aponta para uma desregulação da função da CeA de fêmeas OVX em direção ao aumento de inibição, como já sugerido. Baseado nos trabalhos que implicam a BLA

na ansiedade, também é possível que o fluxo de informação na via BLA-CeL esteja enfraquecido nos animais privados hormonalmente, propiciando menor excitação à CeL. Em consequência, esse quadro aumentaria a ansiedade ao mesmo tempo que prejudicaria a formação da associação de medo.

Procuramos confirmar nossa hipótese de uma inibição basal aumentada nas OVX por meio da análise quantitativa das enzimas GAD65 e GAD67, que poderiam estar mais expressas, causando aumento da inibição tônica. De fato, encontramos um aumento da marcação pelo anticorpo GAD65/67, tanto em área quanto em intensidade, especificamente na CeA de fêmeas OVX naive, confirmando nossa hipótese. Em contraste, fêmeas SHAM em proestro (alto E e baixa P) mostraram níveis de inibição mais semelhantes às OVX do que as fêmeas SHAM-MET (baixo E e alto P), mas não houve diferença estatística entre este grupo comparado aos demais.

As enzimas GAD são fundamentais no sistema inibitório. Embora as duas enzimas sejam classificadas e diferenciadas quanto ao tipo de liberação de GABA (tônica vs. fásica), evidências apontam para a ação de ambas no controle do tônus inibitório (Walls et al., 2010). Portanto, o aumento da expressão de GAD65/67 nas fêmeas OVX pode significar o aumento do tônus inibitório na CeA. É plausível que a retirada hormônios ovarianos circulantes tenham causado tal efeito, visto que os estrógenos atuam sobre a expressão de mRNA das duas isoformas de GAD. A hibridização *in situ* com sondas de RNA em animais tratados sistemicamente com estradiol por dois dias consecutivos detectou tanto um aumento quanto diminuição da expressão de GAD65 e GAD67 dependendo da região cerebral analisada, com padrão diferenciado para cada subtipo, em três regiões hipotalâmicas (McCarthy et al., 1995). No hipocampo, Murphy *et al.* observaram redução nos níveis de GAD 24h pós tratamento *in vitro* (Murphy et al., 1998). Em animais OVX (3 dias), o tratamento com E2 subcutâneo por dois dias reduziu de forma transiente a imunorreatividade ao GAD65 no hipocampo, mas foi observado aumento da marcação 48h após a última injeção, considerado uma compensação ao aumento de excitabilidade local (Rudick & Woolley, 2001). Portanto, é possível que o estradiol atue de forma semelhante na amígdala e que sua ausência crônica tenha resultado em aumento da expressão de GAD65/67, provocando aumento de inibição na CeA.

Contraditoriamente ao papel do estradiol encontrado no hipocampo pelos estudos citados, fêmeas SHAM-MET, que apresentam níveis baixos de estrógenos, exibiram os menores valores de marcação GAD65/67+ na CeA. De fato, não é possível atribuir somente aos estrógenos toda a modulação exercida sobre as enzimas GAD, uma vez que

os efeitos dos estrógenos e progesterona estão mesclados durante o ciclo reprodutivo no modelo utilizado. Os níveis elevados de progesterona durante o metaestro conjuntamente aos baixos níveis de estrógenos podem ser responsáveis pelos resultados encontrados. Na análise da expressão de genes da maquinaria GABAérgica em macacos-rhesus, o tratamento com E+P produziu resultados diferentes na regulação de *GAD1*, que codifica GAD67, em comparação ao tratamento com E na amígdala (Noriega et al., 2010).

Em vista da potencial modulação do sistema GABAérgico pelos estrógenos e de sua capacidade de auxiliar a formação de memórias quando administrado de forma aguda no hipocampo (Bastos, 2015), verificamos se o hormônio injetado intra-CeA seria capaz de recuperar a memória de medo em fêmeas OVX. A literatura relata um aumento de respostas defensivas (*freezing*) no teste de condicionamento clássico ao som após tratamento com E2 subcutâneo por 10-14 dias, utilizando modelo animal com apenas 2 semanas de OVX (Jasnow et al., 2006; Morgan & Pfaff, 2001). Porém, neste experimento não encontramos um prejuízo de memória robusto nas fêmeas OVX (12 semanas; grupo VEH). Nossos dados mostraram que uma única injeção intra-CeA não causou alterações na formação de memórias de medo nas fêmeas OVX (12 semanas; grupo E2) comparadas ao grupo controle. Portanto, não fomos capazes de concluir se a administração aguda de E2 seria capaz de reverter o déficit de memória observado anteriormente em fêmeas OVX. Utilizamos uma dose hormonal de estradiol hidrossolúvel que consistentemente tem efeito promnésico no hipocampo numa tarefa de memória espacial (Fernandez et al., 2008). A ausência de efeito na CeA pode apontar para a necessidade de adequação da dose utilizada. Para isto, seria necessário construir uma curva de concentração-resposta da droga injetada intra-CeA antes de descartar a possibilidade de o estradiol atuar sobre a CeA de fêmeas OVX. Ainda, a duração e início do tratamento tem contribuições importantes, pois alguns efeitos são vistos somente com tratamentos crônicos ou em janelas de tempo específicas após OVX crônica (Fonseca et al., 2013; Sherwin, 2007).

Os dados do treino sugerem que o E2 atuou sobre a amígdala, reduzindo comportamentos de *freezing* em algumas fases do treino, apesar de não ter sido eficaz sobre a memória de medo. A redução do *freezing* pode ser reflexo da contribuição do E2 para a ansiedade, cujo efeito ansiolítico e ansiogênico foram atribuídos ao ER $\beta$  e ER $\alpha$ , respectivamente (Borrow & Handa, 2017). Na CeA, a dose administrada pareceu ter efeito ansiolítico nas fêmeas OVX, em contraste à ausência de efeito do E2 injetado periféricamente em fêmeas OVX (12 semanas) submetidas ao labirinto em cruz elevado (Bastos, 2015).

Em seguida, verificamos se os estrógenos estão fisiologicamente envolvidos na aquisição do medo em fêmeas normociclantes. Ainda que flutuações sistêmicas fisiológicas não alterem o aprendizado de medo auditivo e a retenção da memória, não podemos descartar a participação dos estrógenos sintetizados localmente e as correlações entre E2 e memória de medo obtidas em mulheres. A concentração do estradiol no tecido cerebral é região-específica e varia de forma independente dos níveis sistêmicos (Barker et al., 2009). A BLA e CeA são capazes de sintetizar estradiol localmente pela conversão da testosterona (Saleh et al., 2005). Na BLA, esta síntese está atrelada à densidade de espinhas dendríticas, que é reduzida após inibição da aromatase (Bender et al., 2017). Portanto, somente é possível desconsiderar a atuação dos estrógenos sobre a aprendizagem de medo ao bloquear a sinalização endógena sobre seus receptores. Nenhum estudo dentro de nossa busca na literatura empregou o bloqueio de receptores de estrógenos na amígdala no paradigma de condicionamento clássico. Por isso, nosso trabalho foi pioneiro em administrar intra-CeA antagonistas dos três ERs descritos: TPBM para o ER $\alpha$ , PHTPP para o ER $\beta$  e G15 para GPER.

De forma geral, o comportamento dos animais não se alterou devido às drogas durante o treino, exceto no pós-pareamento, em que o TPBM causou aumento de *freezing* comparado ao grupo PHTPP, mas não ao DMSO, lembrando o efeito do muscimol intra-CeA em fêmeas normociclantes e contrário ao efeito do E2 em fêmeas OVX. No entanto, percebe-se efeito do bloqueio de ER $\alpha$  sobre a porcentagem de congelamento realizado durante o teste, 24h pós treino. Pelos traçados comparando o mesmo animal no período Pré-CS e CS, é possível observar que, exceto 2 dentre 9 animais, as fêmeas possuem pouco acréscimo de *freezing* mediante o som. Traçados como este não prevalecem nos demais grupos, e comparando as médias entre eles no período CS, observamos diferença estatística dos controles ao TPBM. Por isso, sugerimos que o E2 participa da aquisição da memória de medo por meio da ativação dos ER $\alpha$  na CeA.

O efeito do TPBM encontrado neste estudo pode resultar de alterações em diversos mecanismos mediados pelo estradiol na formação e consolidação de memórias, incluindo efeitos genômicos e efeitos não-genômicos (Cover et al., 2014). O bloqueio da sinalização via ER $\alpha$  pode ter prejudicado a iniciação da transcrição gênica associada à plasticidade, visto que a expressão de pelo menos 44 genes na amígdala de camundongos estão sob controle direto ou indireto do estradiol (Jasnow et al., 2007). Além disso, estrógenos interagem com a expressão gênica de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina associada positivamente ao LTP e remodelamento dendrítico, e



um aumento nos níveis de mRNA, pro-BDNF e BDNF no hipocampo dorsal foram detectados 4h após infusão local de E2 (Fortress et al., 2013). Efeito não-genômicos envolvidos na aprendizagem são mediados por vias intracelulares incluindo PI3K, MAPK/ERK e cAMP, que também são moduladas pelo E2 (Cover et al., 2014). Por meio de ERs associados à membrana no hipocampo, o estradiol regula a fosforilação de CREB (*cAMP response element binding protein*) por um mecanismo dependente de MAPK, numa escala de tempo tão curta quanto 5 minutos (Boulware et al., 2005). Efeitos rápidos no balanço excitação/inibição também foram detectados. Células piramidais responsivas aos estrógenos no hipocampo mostraram aumento de EPSC após 2-3 minutos da infusão de E2 em *whole-cell voltage clamp* (Rudick & Woolley, 2003). Sobre o tônus inibitório no estriado, a administração subcutânea de E2 em animais OVX (7 semanas) provocou redução de GABA extracelular evocada por K<sup>+</sup>, avaliada por microdiálise, numa janela de tempo de 30 minutos (Schultz et al., 2009). Portanto, o antagonista ER $\alpha$  administrado 15-20 minutos antes do treino pode ter afetado a atividade neuronal e a sinalização molecular necessárias para o aprendizado associativo.

Na amígdala central, a localização dos ERs começou a ser desvendada. Recentemente, a colocalização de receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  e marcadores de interneurônios na amígdala foi investigada na BLA e na CeA de porquinhos-da-índia. Neurônios positivos para calbindina (CB) e somatostatina (SOM) na CeA quase nunca expressaram ER $\alpha$ , mas houve pequena colocalização CB+/ER $\beta$ + e ausência de SOM+/ER $\beta$ + (Równiak, 2017). Entretanto, não foi investigada a colocalização entre SOM e ER $\alpha$ , que poderia auxiliar a desvendar a interação dos estrógenos com o circuito de medo, visto que as células CeL-ON são majoritariamente SOM+ e os *inputs* que recebem são alvos de plasticidade.

A modulação da memória de medo pelo TPBM não aparenta estar ligada à mudanças na ansiedade, ainda que nossos dados em fêmeas OVX apontem para um efeito do E2 sobre a CeA no que se refere ao comportamento tipo-ansioso. Não verificamos efeito significativo do TPBM em nenhum parâmetro no labirinto em cruz elevado, realizado após 15 minutos ou 24h após injeção da droga.

Quanto aos demais receptores testados, a inativação de ambos não prejudicou a formação da memória, embora dados da literatura apontem para suas contribuições nos processos de formação de memória hipocámpais e relacionados à emoção. Por exemplo, foi visto que o agonista de ER $\beta$  tem efeito promnésico no hipocampo quando injetado imediatamente após o treino da memória de reconhecimento de objeto em fêmeas OVX

(12 semanas) (Bastos, 2015). Ainda, este receptor parece ser importante para os efeitos ansiolíticos do E2 (Frye & Walf, 2004), mas a participação da CeA não foi estudada. Quanto ao GPER, foi mostrado que este receptor também tem efeito sobre memórias espaciais dependentes de hipocampo (Hammond et al., 2009). Na BLA, a ativação de GPER aumenta a transmissão sináptica inibitória, regulando o balanço excitação-inibição desta estrutura, e exerce efeito ansiolítico em fêmeas OVX (15 dias) submetidas a protocolos de estresse por nado forçado e contenção (Tian et al., 2013). Diante disso, é possível que esses receptores atuem no circuito de medo, mas aparentemente não contribuem para a fase de aquisição dependente da CeA.

A ativação dos ER $\alpha$  contribui para a aquisição da memória de medo e a ovariectomia por 12 semanas eleva o tônus inibitório na CeA. Para integrar diretamente a sinalização do estradiol à regulação do tônus inibitório, realizamos um protocolo em fêmeas normociclantes em que o antagonista GABA-A (bicuculina) foi injetado conjuntamente ao antagonista ER $\alpha$  (TPBM). Pressupomos que, num cenário em que a inativação de ER $\alpha$  eleva o tônus inibitório, o bloqueio de receptores GABA-A contrabalancearia o aumento da inibição, restaurando a fisiologia da CeA. Todos os animais receberam duas injeções consecutivas, mas aparentemente a mudança no protocolo experimental refletiu-se em resultados inesperados. Os animais controle condicionaram-se pouco, ao passo que alguns dos animais TPBM apresentaram uma memória de medo robusta. Não foi possível concluir, por meio deste experimento, a interação entre E2 e sistema GABAérgico.

Experimentos incluindo administrações consecutivas são encontrados na literatura. Inclusive, um estudo com foco na CeA identificou a interação entre o neuromodulador ocitocina e o sistema GABAérgico na preferência social utilizando o mesmo protocolo aqui empregado (Dong et al., 2017). Alguns fatores podem ter contribuído para a não reprodução de nosso experimento anterior, sendo eles o estresse causado pela maior duração da administração das drogas, o aumento em volume dos tratamentos que pode ter alterado a fisiologia da CeA, e a possível diluição da droga que foi injetada primeiramente devido ao aumento do volume total injetado. Por exemplo, o grupo TPBM+DMSO recebeu primeiramente uma injeção de TPBM, na mesma concentração utilizada no experimento anterior, e em seguida recebeu a dose do DMSO. É possível que a diminuição da concentração da droga possa ter reduzido a interação desta aos receptores. Modificações no protocolo experimental terão que ser realizadas para testar a hipótese da interação entre a sinalização pelo estradiol e o sistema GABAérgico.

Estudos futuros que verifiquem diretamente como o estradiol interage com os neurônios GABAérgicos na CeA, por meio de medidas eletrofisiológicas na CeA ou comportamentais com ensaios farmacológicos, irão contribuir para o entendimento da ação dos estrógenos na CeA sobre a memória de medo condicionado. Responder em quais subpopulações GABAérgicas residentes na amígdala encontram-se os receptores ER $\alpha$  também auxiliarão a esclarecer os mecanismos por trás dessa ação. Ainda, seria interessante determinar a contribuição dos estrógenos, em específico, para o aumento de inibição observado nas fêmeas OVX.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo identificou a participação da CeA na aquisição da memória de medo condicionado ao som em fêmeas normociclantes C57BL/6 e demonstrou que a ausência crônica dos hormônios ovarianos perturba a aquisição de memórias de medo por alterar a fisiologia da amígdala central. Identificamos que uma dessas perturbações é o aumento do tônus inibitório nesta estrutura em decorrência da ovariectomia por 12 semanas. Em fêmeas normociclantes, verificamos pela primeira vez que os estrógenos endógenos, atuando pelo receptor ER $\alpha$ , contribuem para a aquisição de memórias de medo condicionado ao som.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X)
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., & Damasio, A. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372(6507), 669–672. <https://doi.org/10.1038/372669a0>
- Akama, K. T., Thompson, L. I., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2013). Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6438–6450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412478>
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Ji, F. Y., ... Obata, K. (1996). Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229(3), 891–895. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1898>
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Kanbara, N., ... Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6496–6499. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6496>
- Barker, J. M., Galea, L. A. M., & Eb, D.-. (2009). General and Comparative Endocrinology Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex , amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and Comparative Endocrinology*, 164(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.008>
- Bastos, C. P. (2015). *Efeitos do estradiol na memória e comportamentos afetivos causados pela privação de hormônios ovarianos*. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Beery, A., & Zucker, I. (2012). Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. *Neurosci Behav Rev*, 35(3), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
- Bender, R. A., Zhou, L., Vierk, R., Brandt, N., Keller, A., Gee, C. E., ... Rune, G. M. (2017). Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 37(6), 1532–1545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1532-16.2016>
- Bender, R. A., Zhou, L., Vierk, R., Brandt, N., Keller, A., Gee, X. E., ... Rune, X. G. M. (2017). Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala, *The Journal of Neuroscience*, 37(6), 1532–1545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1532-16.2016>
- Bergado-Acosta, J. R., Sangha, S., Narayanan, R. T., Obata, K., Pape, H.-C., & Stork, O. (2008). Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learn. Mem*, 15, 163–171. <https://doi.org/10.1101/lm.705408>
- Bernard, J.-F., Alden, M., & Besson, J.-M. (1993). The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: Aphaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 329(2), 201–229. <https://doi.org/10.1002/cne.903290205>
- Berne, & Levy. (2009). *Fisiologia*. (B. M. Koeppen & B. A. Stanton, Eds.) (6a ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Borrow, A. P., & Handa, R. J. (2017). *Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior*. *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.08.004>
- Boulware, M. I., Heisler, J. D., & Frick, K. M. (2013). The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(38), 15184–15194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1716-13.2013>

- Boulware, M. I., Weick, J. P., Becklund, B. R., Kuo, S. P., Groth, R. D., & Mermelstein, P. G. (2005). Estradiol Activates Group I and II Metabotropic Glutamate Receptor Signaling, Leading to Opposing Influences on cAMP Response Element-Binding Protein. *Journal of Neuroscience*, *25*(20), 5066–5078. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-05.2005>
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., ... Dun, N. J. (2006). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology*, *193*, 311–321. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0017>
- Brinton, R. D. (2012). Minireview: Translational animal models of human menopause: Challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, *153*(8), 3571–3578. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2009). Sustained Conditioned Responses in Prelimbic Prefrontal Neurons Are Correlated with Fear Expression and Extinction Failure. *Journal of Neuroscience*, *29*(26), 8474–8482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0378-09.2009>
- Busti, D., Geracitano, R., Whittle, N., Dalezios, Y., Man, M., Kaufmann, W., ... Ferraguti, F. (2011). Different Fear States Engage Distinct Networks within the Intercalated Cell Clusters of the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, *31*(13), 5131–5144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6100-10.2011>
- Calhoon, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1394–1404. <https://doi.org/10.1038/nn.4101>
- Caligioni, C. (2010). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Curr Protoc Neurosci*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48.Assessing>
- Castro, L. C. (2017). *Bases neurais da ansiedade em modelo animal de pós-menopausa*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Charitidi, K., Meltser, I., & Canlon, B. (2012). Estradiol treatment and hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate the expression of estrogen receptors in the auditory system and the prepulse inhibition of acoustic startle response. *Endocrinology*, *153*(9), 4412–4421. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1416>
- Chen, L., Tzeng, W., Chuang, J., Cheng, C. G., Gean, P., & Yu, L. (2014). Roles of testosterone and amygdaloid LTP induction in determining sex differences in fear memory magnitude. *Hormones and Behavior*, *66*(3), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.07.008>
- Christianson, J. P., Jennings, J. H., Ragole, T., Flyer, J., Benison, A. M., Barth, D., ... Maier, S. F. (2011). Safety signals mitigate the consequences of uncontrollable stress via a circuit involving the sensory insular cortex and bed nucleus of the stria terminalis. *Biological Psychiatry*, *70*(5), 458–464. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>
- Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S. B. E., Letzkus, J. J., Vlachos, I., ... Lu, A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, *468*, 277–282. <https://doi.org/10.1038/nature09559>
- Coleman, J. R., Campbell, D., Cooper, W. A., Welsh, M. G., & Moyer, J. (1994). Auditory brainstem responses after ovariectomy and estrogen replacement in rat. *Hearing Research*, *80*, 209–215.
- Compton, D. R., Sheng, S., Carlson, K. E., Rebacz, N. A., Lee, I. Y., Katzenellenbogen, B. S., & Katzenellenbogen, J. A. (2004). Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(24), 5872–5893. <https://doi.org/10.1021/jm049631k>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *43*(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Cossio, R., Carreira, M. B., Vásquez, C. E., & Britton, G. B. (2016). Sex differences and estrous cycle effects on foreground contextual fear conditioning. *Physiology & Behavior*, *163*, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.026>
- Cover, K. K., Maeng, L. Y., Lebrón-Milad, K., & Milad, M. R. (2014). Mechanisms of estradiol in fear circuitry:

- Implications for sex differences in psychopathology. *Translational Psychiatry*, 4(March).  
<https://doi.org/10.1038/tp.2014.67>
- Curz, P., Rustay, N. R., & Browman, K. E. (2009). Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 1–12.
- Dalvi, A., & Rodgers, R. J. (1996). GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology*, 128(4), 380–397. <https://doi.org/10.1007/s002130050148>
- Dennis, M. K. (2004). In vivo Effects of a GPR30 Antagonist. *Science*, 5(6), 421–427.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.168>
- Dong, N., Du, P., Hao, X., He, Z., Hou, W., Wang, L., ... Tai, F. (2017). Involvement of GABAA receptors in the regulation of social preference and emotional behaviors by oxytocin in the central amygdala of female mandarin voles. *Neuropeptides*, (July), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.07.006>
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- Duvarci, S., & Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82(5), 966–980.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.042>
- Duvarci, S., Popa, D., & Pare, D. (2011). Central amygdala activity during fear conditioning. *J Neurosci*, 31(1), 289–294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4985-10.2011>
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>
- Ekman, P., & Cordaro, D. (2011). What is meant by calling emotions basic. *Emotion Review*, 3(4), 364–370.  
<https://doi.org/10.1177/1754073911410740>
- Estrada, C. M., Ghisays, V., Nguyen, E. T., Caldwell, J. L., Streicher, J., & Solomon, M. B. (2018). Hormones and Behavior Estrogen signaling in the medial amygdala decreases emotional stress responses and obesity in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, 98(May 2017), 33–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.12.002>
- Fadok, J. P., Krabbe, S., Markovic, M., Courtin, J., Xu, C., Massi, L., ... Lüthi, A. (2017). A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature*, 542(7639), 96–100.  
<https://doi.org/10.1038/nature21047>
- Fadok, J. P., Markovic, M., Tovote, P., & Lüthi, A. (2018). New perspectives on central amygdala function. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.009>
- Fanselow, M. S., & Wassum, K. M. (2016). The origins and organization of vertebrate pavlovian conditioning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021717>
- Felix-Ortiz, A. C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C. A., Craig, P., & Tye, K. M. (2014). BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors. *Neuron*, 79(4), 658–664. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.016>
- Fenton, G. E., Pollard, A. K., Halliday, D. M., Fenton, G. E., Pollard, A. K., Halliday, D. M., ... Stevenson, C. W. (2014). Persistent prelimbic cortex activity contributes to enhanced learned fear expression in females Persistent prelimbic cortex activity contributes to enhanced learned fear expression in females. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 21, 55–60. <https://doi.org/10.1101/lm.033514.113>
- Fernandez, S. M., Lewis, M. C., Pechenino, A. S., Harburger, L. L., Orr, P. T., Gresack, J. E., ... Frick, K. M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(35), 8660–8667. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1968-08.2008>
- Ferri, S. L., Hildebrand, P. F., Way, S. E., & Flanagan-cato, L. M. (2014). Estradiol regulates markers of synaptic plasticity in the hypothalamic ventromedial nucleus and amygdala of female rats. *Hormones and Behavior*,

- 66(2), 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.016>
- Fonseca, C. S., Gusmão, I. D., Raslan, A. C. S., Monteiro, B. M. M., Massensini, A. R., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. (2013). Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiology of Learning and Memory*, *101*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.016>
- Forman, S. a, Chou, J., & Strichartz, G. R. (2009). Farmacologia da Neurotransmissão Gabaérgica. *Princípios de Farmacologia*, 146–165. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1029000>
- Fortress, A. M., Heisler, J. D., & Frick, K. M. (2015). The mTOR and canonical Wnt signaling pathways mediate the mnemonic effects of progesterone in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, *25*(5), 616–629. <https://doi.org/10.1002/hipo.22398>
- Fortress, A. M., Lu, F., Orr, P. T., Zhao, Z., & Frick, K. M. (2013). Estradiol-induced object recognition memory consolidation is dependent on activation of mTOR signaling in the dorsal hippocampus. *Learning and Memory*, *20*(3), 147–155. <https://doi.org/10.1101/lm.026732.112>
- Foy, M. R., Xu, J., Xie, X., Brinton, R. D., Thompson, R. F., & Berger, T. W. (1999). 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *Journal of Neurophysiology*, *81*(1994), 925–929. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.925>
- Freitas, K. M., Silva, Â. R. D. V., & Silva, R. M. (2004). Mulheres vivenciando o climatério. *Acta Scientiarum - Health Sciences*, *26*(1), 121–128. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v26i1.1633>
- Frick, A. M. F. and K. M. (2015). Epigenetic regulation of estrogen-dependent memory. *Nature Publishing Group*, *16*(10), 1–4. <https://doi.org/10.1038/nrm4048>
- Frick, K. M. (2015). Molecular mechanisms underlying the memory-enhancing effects of estradiol. *Hormones and Behavior*, *74*(May), 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.001>
- Frye, C. A., & Walf, A. A. (2004). Estrogen and/or Progesterone Administered Systemically or to the Amygdala Can Have Anxiety-, Fear-, and Pain-Reducing Effects in Ovariectomized Rats. *Behavioral Neuroscience*, *118*(2), 306–313. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.2.306>
- Garcia-Segura, L. M., Cardona-Gómez, G. P., Chowen, J. A., & Azcoitia, I. (2000). Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *Journal of Neurocytology*, *29*(5/6), 425–437. <https://doi.org/10.1023/A:1007125626308>
- Goosens, K. A., & Maren, S. (2003). Pretraining NMDA receptor blockade in the basolateral complex, but not the central nucleus, of the amygdala prevents savings of conditional fear. *Behavioral Neuroscience*, *117*(4), 738–750. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.4.738>
- Graham, B. M., & Milad, M. R. (2011). Translational Research in the Neuroscience of Fear Extinction: Implications for Anxiety Disorders. *American Journal of Psychiatry*, *168*(12), 1255–1265. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.11040557>
- Hammond, R., Mauk, R., Ninaci, D., Nelson, D., & Gibbs, R. B. (2009). Chronic treatment with estrogen receptor agonists restores acquisition of a spatial learning task in young ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, *56*(3), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.06.008>
- Han, J. S., Adwanikar, H., Li, Z., Ji, G., & Neugebauer, V. (2010). Facilitation of synaptic transmission and pain responses by CGRP in the amygdala of normal rats. *Molecular Pain*, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-10>
- Han, S., Soleiman, M., Soden, M., Zweifel, L., & Palmiter, R. D. (2015). Elucidating an Affective Pain Circuit that Creates a Threat Memory. *Cell*, *162*(2), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.057>
- Handa, R. J., Mani, S. K., & Uht, R. M. (2012). Estrogen receptors and the regulation of neural stress responses. *Neuroendocrinology*, *96*(2), 111–118. <https://doi.org/10.1159/000338397>
- Hart, S. A., Patton, J. D., & Woolley, C. S. (2001). Quantitative analysis of ER?? and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rat. *Journal of Comparative Neurology*, *440*(2), 144–155.



- <https://doi.org/10.1002/cne.1376>
- Hart, S. A., Snyder, M. A., Smejkalova, T., & Woolley, C. S. (2007). Estrogen Mobilizes a Subset of Estrogen Receptor-Immunoreactive Vesicles in Inhibitory Presynaptic Boutons in Hippocampal CA1. *Journal of Neuroscience*, 27(8), 2102–2111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5436-06.2007>
- Haubensak, W., Kunwar, P. S., Cai, H., Ciocchi, S., Wall, N. R., Ponnusamy, R., ... Anderson, D. J. (2010). Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*, 468(7321), 270–276. <https://doi.org/10.1038/nature09553>
- Heldt, S. A., Mou, L., & Ressler, K. J. (2012). In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Translational Psychiatry*, 2(11), e181-12. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.101>
- Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nrn2850>
- Hojo, Y., Hattori, T. -a., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. -t., ... Kawato, S. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 865–870. <https://doi.org/10.1073/pnas.2630225100>
- Hojo, Y., Murakami, G., Mukai, H., Higo, S., Hatanaka, Y., Ogiue-Ikeda, M., ... Kawato, S. (2008). Estrogen synthesis in the brain-Role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.017>
- Hudgens, E. D., Ji, L., Carpenter, C. D., & Petersen, S. L. (2009). The gad2 promoter is a transcriptional target of estrogen receptor (ER)alpha and ER beta: a unifying hypothesis to explain diverse effects of estradiol. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(27), 8790–8797. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1289-09.2009>
- Hwang, M. J., Zsido, R. G., Song, H., Pace-schott, E. F., Miller, K. K., Lebron-milad, K., ... Milad, M. R. (2015). Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. *BMC Psychiatry*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12888-015-0673-9>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jasnow, A. M., Mong, J. A., Romeo, R. D., & Pfaff, D. W. (2007). Estrogenic regulation of gene and protein expression within the amygdala of female mice. *Endocrine*, 32(3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9043-4>
- Jasnow, A. M., Schalkin, J., & Pfaff, D. W. (2006). Estrogen facilitates fear conditioning and increases corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala in female mice. *Hormones and Behavior*, 49(2), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.06.005>
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., & Hudspeth, A. (2014). Princípios de Neurociências - Kandel - 5ª Edição - 2014 - Ebook - Português - By Aclerton.pdf.
- Keifer, O. P., Hurt, R. C., Ressler, K. J., & Marvar, P. J. (2015). The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. *Physiology*, 30(5), 389–401. <https://doi.org/10.1152/physiol.00058.2014>
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. *Arch Gen Psychiatry*, 62(June 2005), 593–602.
- Kim, J., & Fanselow, M. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675–677.
- Kim, J., Szinte, J. S., Boulware, M. I., & Frick, K. M. (2016). 17 -Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell-Signaling Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 36(11), 3309–3321. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0257-15.2016>
- Kim, W. Bin, & Cho, J. H. (2017). Encoding of Discriminative Fear Memory by Input-Specific LTP in the Amygdala.

- Neuron*, 95(5), 1129–1146.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.004>
- Kong, E., Monje, F. J., Hirsch, J., & Pollak, D. D. (2014). Learning not to fear: Neural correlates of learned safety. *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.191>
- Kwon, J. T., Nakajima, R., Kim, H. S., Jeong, Y., Augustine, G. J., & Han, J. H. (2014). Optogenetic activation of presynaptic inputs in lateral amygdala forms associative fear memory. *Learning and Memory*, 21(11), 627–633. <https://doi.org/10.1101/lm.035816.114>
- Laubert, A. H., Mobbs, C. V., Muramatsu, M., & Pfaff, D. W. (1991). Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*, 129(6), 3180–3186. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3180>
- LeDoux, J., Cicchetti, P., Xagoraris, A., & Romanski, L. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 10(4)(4), 1062–1069. <https://doi.org/2329367>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Focus*, 7(2), 274–274. <https://doi.org/10.1176/foc.7.2.foc274>
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(7), 2517–2529. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1001-06.2006>
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and anxiety: A two-system framework. *American Journal of Psychiatry*, 173(11), 1083–1093. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16030353>
- Lee, S., Kim, S.-J., Kwon, O.-B., Lee, J. H., & Kim, J.-H. (2013). Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00129>
- Li, H., Penzo, M. A., Taniguchi, H., Kopec, C. D., Huang, Z. J., & Li, B. (2013). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nature Neuroscience*, 16(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/nn.3322>
- Liu, X., & Shi, H. (2015). Regulation of Estrogen Receptor Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2015/949085>
- Lopez De Armentia, M., & Sah, P. (2007). Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala. *Journal of Physiology*, 581(3), 961–970. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.121822>
- Mao, C., Patterson, N. M., Cherian, M. T., Aninye, I. O., Zhang, C., Montoya, J. B., ... Shapiro, D. J. (2008). A new small molecule inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12819–12830. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709936200>
- Maren, S., De Oca, B., & Fanselow, M. S. (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Research*, 661(1–2), 25–34. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91176-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91176-2)
- McCarthy, M. M., Kaufman, L. C., Brooks, P. J., Pfaff, D. W., & Schwartz-Giblin, S. (1995). Estrogen modulation of mRNA levels for the two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) in female rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 360(4), 685–697. <https://doi.org/10.1002/cne.903600412>
- McKenzie, S., & Eichenbaum, H. (2011). Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron*, 71(2), 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.037>
- Medina, J. F., Repa, J. C., Mauk, M. D., & LeDoux, J. E. (2002). Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 122–131. <https://doi.org/10.1038/nrn728>
- Mendoza-Garcés, L., Mendoza-Rodríguez, C. A., Jiménez-Trejo, F., Picazo, O., Rodríguez, M. C., & Cerbón, M. (2011). Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat. *Anatomical Record*, 294(11), 1913–1919. <https://doi.org/10.1002/ar.21247>
- Merchenthaler, I., Lane, M. V., Numan, S., & Dellovade, T. L. (2004). Distribution of Estrogen Receptor A and B in the Mouse Central Nervous System: In Vivo Autoradiographic and Immunocytochemical Analyses. *The Journal*

- of *Comparative Neurology*, 291(September 2003), 270–291. <https://doi.org/10.1002/cne.20128>
- Merz, C. J., Tabbert, K., Schweckendiek, J., Klucken, T., Vaitl, D., Stark, R., & Wolf, O. T. (2012). Neuronal correlates of extinction learning are modulated by sex hormones. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 7(7), 819–830. <https://doi.org/10.1093/scan/nsr063>
- Milad, M. R., Igoe, S. A., Lebron-Milad, K., & Novales, J. E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, 164(3), 887–895. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.011>
- Milad, M. R., Zeidan, M. A., Contero, A., Roger, K., Klibanski, A., Rauch, S. L., & Goldstein, J. M. (2011). The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. *Neuroscience*, 168(3), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.030>.The
- Milner, T. A., Ayoola, K., Drake, C. T., Herrick, S. P., Tabori, N. E., McEwen, B. S., ... Alves, S. E. (2005). Ultrastructural localization of estrogen receptor  $\beta$  immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology*, 491(2), 81–95. <https://doi.org/10.1002/cne.20724>
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., ... Alves, S. E. (2003). Immunolocalization of Estrogen Receptor B in the Mouse Brain: Comparison with Estrogen Receptor A. *Endocrinology*, 144(5), 2055–2067. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221069>
- Morgan, M. A., & Pfaff, D. W. (2001). Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Hormones and Behavior*, 40(4), 472–482. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1716>
- Murphy, D. D., Cole, N. B., Greenberger, V., & Segal, M. (1998). Estradiol Increases Dendritic Spine Density by Reducing GABA Neurotransmission in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2550–2559.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12, 120–150. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>
- Nelson, J. F., Karelus, K., Bergman, M. D., & Felicio, L. S. (1995). Neuroendocrine involvement in aging: Evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiology of Aging*, 16(5), 837–843. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00072-M](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00072-M)
- Nielsen, D. M., & Crnic, L. S. (2002). Automated analysis of foot-shock sensitivity and concurrent freezing behavior in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 115(2), 199–209. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00020-1)
- Noriega, N. C., Eghlidi, D. H., Garyfallou, V. T., Kohama, S. G., Kryger, S. G., & Urbanski, H. F. (2010). Influence of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on GABAergic gene expression in the arcuate nucleus, amygdala and hippocampus of the rhesus macaque. *Brain Research*, 1307, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.011>
- Österlund, M. K., Gustafsson, J. A., Keller, E., & Hurd, Y. L. (2000). Estrogen receptor beta (ER beta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: Distinct distribution pattern to ER alpha mRNA. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(10), 3840–3846. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.10.6913>.Share
- Osterlund, M. K., Keller, E., & Hurd, Y. L. (2000). The human forebrain has discrete estrogen receptor alpha messenger RNA expression: high levels in the amygdaloid complex. *Neuroscience*, 95(2), 333–342. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658612>
- Osterlund, M., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., & Hurd, Y. L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 54(1), 175–180. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526077>
- Palmiter, R. D. (2018). The Parabrachial Nucleus: CGRP Neurons Function as a General Alarm. *Trends in Neurosciences*, 41(5), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.007>
- Pearson, R., & Lewis, M. B. (2005). Fear recognition across the menstrual cycle. *Hormones and Behavior*, 47(3), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.11.003>

- Pellman, B. A., & Kim, J. J. (2016). What Can Ethobehavioral Studies Tell Us about the Brain's Fear System? *Trends in Neurosciences*, 39(6), 420–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.001>
- Pereira, L. M., Bastos, C. P., de Souza, J. M., Ribeiro, F. M., & Pereira, G. S. (2014). Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor  $\alpha$ . *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.04.001>
- Rescorla, R. A. (1996). Preservation of Pavlovian associations through extinction. *Quarterly Journal of Experimental Psychology: Comparative & Physiological Psychology*, 49(3), 245–258. <https://doi.org/10.1080/713932629>
- Rivas-Arancibia Seiva, & Vazquez-Pereyra, F. (1994). HORMONAL MODULATION OF EXTINCTION RESPONSES INDUCED BY SEXUAL STEROID. *Life Sciences*, 54(21), 363–367.
- Roberto, M., Madamba, S. G., Moore, S. D., Tallent, M. K., & Siggins, G. R. (2003). Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 2053–2058. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437926100>
- Rogan, M. T., Staubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390(6660), 604–607. <https://doi.org/10.1038/37601>
- Romanski, L. M., Clugnet, M. C., Bordi, F., & LeDoux, J. E. (1993). Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 107(3), 444–450. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8329134>
- Romanski, L. M., & LeDoux, J. E. (1992). Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 12(11), 4501–4509. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-11-04501.1992>
- Rossetti, M. F., Cambiasso, M. J., Holschbach, M. A., & Cabrera, R. (2016). Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(7), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jne.12402>
- Równiak, M. (2017). The neurons expressing calcium-binding proteins in the amygdala of the guinea pig: precisely designed interface for sex hormones. *Brain Structure and Function*, 222(8), 3775–3793. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1432-0>
- Rudick, C. N., & Woolley, C. S. (2000). Estradiol induces a phasic Fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus*, 10(3), 274–283. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:3<274::AID-HIPO8>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:3<274::AID-HIPO8>3.0.CO;2-Q)
- Rudick, C. N., & Woolley, C. S. (2001). Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat. *J Neurosci*, 21(17), 6532–6543. <https://doi.org/21/17/6532> [pii]
- Rudick, C. N., & Woolley, C. S. (2003). Selective estrogen receptor modulators regulate phasic activation of hippocampal CA1 pyramidal cells by estrogen. *Endocrinology*, 144(1), 179–187. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220581>
- Saleh, T. M., Connell, B. J., Legge, C., & Cribb, A. E. (2005). Estrogen synthesis in the central nucleus of the amygdala following middle cerebral artery occlusion: Role in modulating neurotransmission. *Neuroscience*, 135(4), 1141–1153. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.061>
- Samson, R. D. (2005). Activity-Dependent Synaptic Plasticity in the Central Nucleus of the Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1847–1855. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3713-04.2005>
- Sato, M., Ito, M., Nagase, M., Sugimura, Y. K., Takahashi, Y., Watabe, A. M., & Kato, F. (2015). The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice. *Molecular Brain*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0108-z>
- Schultz, K. N., Esenwein, S. a Von, Hu, M., Bennett, A. L., T, R., Musatov, S., ... Becker, J. B. (2009). Viral Vector Mediated Over-Expression of Estrogen Receptor- $\alpha$  in Striatum Enhances the Estradiol-induced Motor Activity in Female Rats and Estradiol Modulated GABA Release. *Journal Neuroscience*, 29(6), 1897–1903.

- <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4647-08.2009>.Viral
- Segal, M., & Murphy, D. (2001). Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: Functional correlates. In *Hormones and Behavior* (Vol. 40, pp. 156–159). <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1688>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (96), 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Sherwin, B. B. (2007). The critical period hypothesis: Can it explain discrepancies in the oestrogen-cognition literature? *Journal of Neuroendocrinology*, 19(2), 77–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01508.x>
- Shughrue, P. J., & Dorsa, M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic Acid in Female Rat Brain during the Estrous Cycle: A Comparison Females and Intact Males, *Endocrinology*, 131, 381-388.
- Silva, B. A., Gross, C. T., & Gräff, J. (2016). The neural circuits of innate fear: Detection, integration, action, and memorization. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.042812.116>
- Simerly, R. B., & Young, B. J. (1991). Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(3), 424–432. <https://doi.org/10.1210/mend-5-3-424>
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6)
- Smith, D. M., & Bulkin, D. A. (2014). The form and function of hippocampal context representations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.005>
- Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrus cycle and early pseudopregnancy in the rat: gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(December), 219–226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Sophocleous, A., & Idris, A. I. (2014). Rodent models of osteoporosis. *BoneKEY Reports*, 3, 614. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.109>
- Souza, S., Luckwu, B., Teobaldo, W., & Andrade, L. De. (2017). Variation in the Hearing Threshold in Women during the Menstrual Cycle. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 21, 323–328.
- Spitzer, N., Sammons, G. S., & Price, E. M. (2012). Autofluorescent cells in rat brain can be convincing importers in green fluorescent reporter studies. *J Neurosci Methods*, 197(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.029>.Autofluorescent
- Stumpf, W. E., & Sar, M. (1971). Estradiol Concentrating Neurons in the Amygdala. *Proc Soc Exp Biol Med*, 136(1), 102–106.
- Suzanne, K., & Canlon, B. (2012). Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems . Effects of noise and tinnitus. *Hearing Research*, 288(1–2), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.02.009>
- Suzuki, N., Yano, T., Nakazawa, N., Yoshikawa, H., & Taketani, Y. (1995). A possible role of estrone produced in adipose tissues in modulating postmenopausal bone density. *Maturitas*, 22(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(95\)00902-W](https://doi.org/10.1016/0378-5122(95)00902-W)
- Tabatadze, N., Smejkalova, T., & Woolley, C. S. (2013). Distribution and Posttranslational Modification of Synaptic ER $\alpha$  in the Adult Female Rat Hippocampus. *Endocrinology*, 154(2), 819–830. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1870>
- Taubøll, E., Sveberg, L., & Svalheim, S. (2015). Interactions between hormones and epilepsy. *Seizure*, 28, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.02.012>
- Teyler, T. J., Vardaris, R. M., Lewis, D., & Rawitch, A. B. (1980). Gonadal Steroids: Effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science*, 551(1978), 1978–1980.
- Tian, N., Petersen, C., Kash, S., Baekkeskov, S., Copenhagen, D., & Nicoll, R. (1999). The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12911–12916. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536022>
- Tian, Z., Wang, Y., Zhang, N., Guo, Y., Feng, B., Liu, S., & Zhao, M. (2013). Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(10), 2218–2233. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.04.011>
- Tulving, E., & Schacter, D. L. (1990). Priming and human memory systems. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(1985), 301–306. <https://doi.org/10.1126/science.2296719>
- Tye, K. M., Prakash, R., Kim, S., Fenno, L. E., Grosenick, L., Zarabi, H., ... Deisseroth, K. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, *471*(7338), 358–362. <https://doi.org/10.1038/nature09820>
- Valença, C. N., & Germano, R. M. (2010). Women ' S Conceptions About Menopause and Climateric. *Revista Da Rede de Enfermagem Do Nordeste*, *11*(1), 161–171.
- Ventura-Silva, A. P., Melo, A., Ferreira, A. C., Carvalho, M. M., Campos, F. L., Sousa, N., & Pêgo, J. M. (2013). Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00032>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica*, *24*(3), 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
- Walf, A. ., & Frye, C. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, *2*(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Walls, A. B., Nilsen, L. H., Eyjolfsson, E. M., Vestergaard, H. T., Hansen, S. L., Schousboe, A., ... Waagepetersen, H. S. (2010). GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *Journal of Neurochemistry*, *115*(6), 1398–1408. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07043.x>
- Wegerer, M., Kerschbaum, H., Blechert, J., & Wilhelm, F. H. (2014). Low levels of estradiol are associated with elevated conditioned responding during fear extinction and with intrusive memories in daily life. *Neurobiology of Learning and Memory*, *116*, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.001>
- Weiland, N. G., Orikasa, C., Hayashi, S., & McEwen, B. S. (1997). Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *Journal of Comparative Neurology*, *388*(4), 603–612. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971201\)388:4<603::AID-CNE8>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971201)388:4<603::AID-CNE8>3.0.CO;2-6)
- Weiser, M. J., Foradori, C. D., & Handa, R. J. (2009). Estrogen Receptor Beta in the Brain : From Form to Function. *Brain Res Rev*, *57*(2), 309–320.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., & LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the Fear Circuit: The Central Nucleus of the Amygdala Is Required for the Acquisition, Consolidation, and Expression of Pavlovian Fear Conditioning. *Journal of Neuroscience*, *26*(48), 12387–12396. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4316-06.2006>
- Wong, M., & Moss, R. L. (1991). Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Research*, *543*(1), 148–152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91057-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91057-8)
- Wong, M., & Moss, R. L. (1992). Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(8), 3217–3225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353794>
- Woolley, C. S. (2007). Acute Effects of Estrogen on Neuronal Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*(1), 657–680. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219>
- Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(7), 2549–2554. <https://doi.org/10.1002/cne.903360210>

- Yin, F., Yao, J., Sancheti, H., Feng, T., Melcangi, R. C., Morgan, T. E., ... Roberta, D. (2016). The Perimenopausal Aging Transition in the Female Rat Brain: Decline in Bioenergetic Systems and Synaptic Plasticity. *Neurobiol Aging*, 36(7), 2282–2295. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.013>.The
- Yu, K., Ahrens, S., Zhang, X., Schiff, H., Ramakrishnan, C., Fenno, L., ... Li, B. (2017). The central amygdala controls learning in the lateral amygdala. *Nature Neuroscience*, 20(12), 1680–1685. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0009-9>
- Zack, G. W., Rogers, W. E., & Latt, S. A. (1977). Automatic measurement os sister chromatid exchange frequency. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25(7), 741–753.
- Zeidan, M. A., Igoe, S. A., Linnman, C., Vitalo, A., Levine, J. B., Klibanski, A., ... Milad, M. R. (2011). Estradiol Modulates Medial Prefrontal Cortex and Amygdala Activity During Fear Extinction in Women and Female Rats. *BPS*, 70(10), 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.016>
- Zhao, Z., Fan, L., & Frick, K. M. (2010). Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), 5605–5610. <https://doi.org/10.1073/pnas.091057810>