

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

RODRIGO CAMPOS CARDOSO

Efeitos da inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos

Ribeirão Preto

2022

RODRIGO CAMPOS CARDOSO

Efeitos da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos

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

Área de Concentração: Neurociências

Orientadora: Professora Doutora Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Campos-Cardoso, Rodrigo

Efeitos da inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos / Rodrigo Campos Cardoso; orientadora: Cláudia Maria Padovan. – 2022

104 f.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2022.

1. Transtorno de estresse pós-traumático, 2. Imipramina, 3. Metirapona, 4. Imunoistoquímica, 5. Adolescentes

Campos-Cardoso, Rodrigo. **Efeitos da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos.** 2022. 104 f. Tese (Doutorado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Eu dedico este trabalho, de todo meu coração, aos que me apoiaram, desde sempre, e estiveram ao meu lado para tudo!

Aos meus pais, Romeu Alves Cardoso e Márcia Alves Campos Cardoso e meus irmãos Juninho e Teca e meus sobrinhos Pedro e Heitor.

Dedico também ao meu marido, Flávio. Fonte de carinho, amor, suporte e companheirismo enormes. Foi meu alicerce durante o percurso do doutorado.

Sem vocês ao meu lado, eu não seria nada.

Obrigado! <3

Agradecimentos

Em seu livro “Sobre o autoritarismo brasileiro”, Lilia Schwartz nos conta uma narrativa sobre como o nosso país, possui práticas sociais que estão estreitamente ligadas a violência. Este país que foi o último a abolir a escravidão, que mais mata sua população LGBTQIA+, sobretudo a população transexual, em que o estado promove chacinas nos morros, em que o racismo estrutural está entranhado nas estruturas sociais e estatais e que a violência de gênero contra mulheres é um fato corriqueiro, elegeu em 2018 o seu pior presidente da história.

Durante o percurso do meu doutorado, convivi com ataques sistemáticos aos povos originários, à população preta, a nós que somos LGBTQIA+, à Ciência e a Educação promovidos por este ser e seu governo. Neste cenário, a Ciência brasileira agoniza...

O capítulo mais triste de nossa história foi a pandemia de COVID-19 que infelizmente matou, de forma oficial, fora as subnotificações, quase 700 mil brasileiras e brasileiros. A Ciência mostra, de forma irrefutável, que seriam mortes evitadas, e que não foram por negligência, projeto de poder ou quiçá, prazer... Um dia a história nos responderá.

Concluo meu doutorado, que foi um dos melhores capítulos da minha vida, neste cenário desastroso do ponto de vista social e sanitário. Isso tudo pesa, e torna as coisas muito mais difíceis, mas também é uma superação que deve ser comemorada! Apesar de tudo, apesar deles, apesar dele, chego à reta final desta jornada!

Lembro aqui o papel fundamental das agências de fomento públicas que financiam nossa Ciência e Educação. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. O CNPq financiou minha bolsa e a taxa de bancada (processo 164177/2018-3). Houve também o financiamento do projeto vinculado a tese pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2020/03608-3.

Meu primeiro agradecimento é à sociedade brasileira que financia as nossas universidades, paga nossas bolsas, projetos, salários dos professores e outros funcionários das universidades e que, acredita que a educação pública e de qualidade é um direito. Obrigado!

Agradeço por toda a ajuda neste percurso a minha orientadora Cláudia. Você demonstrou uma confiança e respeito grandes pelas minhas ideias, projetos e planos para o futuro. Me deu suporte neste trajeto e oportunidades que mudaram o rumo da minha vida. Obrigado!

Agradeço de forma especial a minha amiga e colega de bancada Júlia. Sem a sua ajuda, suporte e apoio em vários momentos, eu certamente não conseguiria finalizar este processo. Não há palavras para descrever a sua atitude e seu companheirismo inabaláveis frente a cada desafio que superamos juntos. Obrigado!

Aos meus amigos de sempre e novos: Bruno, Marcella, Carlos, Marina, Giovana, Joel, Priscila(s), Grazi, Laura, Piru, Carol, Lívea, Tamiris, José e todos os outros que sempre estiveram ao meu lado e me deram apoio e foram fonte distração e alívio do dia a dia em todos os momentos em quem precisei. Obrigado!

Ao meu marido e amor Flávio. Você tem um carinho e cuidado tão especiais. Você cuida de mim, me dá suporte, me guia e me faz feliz todos os dias da minha vida. Sem você ao meu lado, eu não teria conseguido nada. Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos, Romeu Júnior e Pollyane, que sempre foram fonte de confiança, suporte e afeto, além dos meus sobrinhos Pedro e Heitor. Eu amo vocês! Obrigado!

Aos meus amados pais, Romeu e Márcia, por sempre terem me apoiado em tudo! Em casa escolha, em cada momento difícil e decisivo e por terem feitos sacrifícios enormes para que eu pudesse alcançar cada um dos meus objetivos e vitórias ao longo da vida. Sem vocês, eu não seria nada! Muito obrigado!

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse executado e escrito, meu muitíssimo obrigado!

Dias melhores virão, apesar de tudo!

“Qualquer comparação entre a ditadura militar e a democracia brasileira, só pode partir de quem não dá valor à democracia brasileira.

Eu tinha 19 anos, fiquei três anos na cadeia e fui barbaramente torturada, senador. E qualquer pessoa que ousar dizer a verdade para os seus interrogadores, compromete a vida dos seus iguais e entrega pessoas para serem mortas. Eu me orgulho muito de ter mentido senador, porque mentir na tortura não é fácil. Agora, na democracia se fala a verdade, diante da tortura, quem tem coragem, dignidade, fala mentira. E isso (aplausos) e isso, senador, faz parte e integra a minha biografia, que eu tenho imenso orgulho, e eu não estou falando de heróis.

Feliz do povo que não tem heróis desse tipo, senador, porque aguentar a tortura é algo difícilíssimo, porque todos nós somos muito frágeis, todos nós. Nós somos humanos, temos dor, e a sedução, a tentação de falar o que ocorreu e dizer a verdade é muito grande senador, a dor é insuportável, o senhor não imagina quanto é insuportável. Então, eu me orgulho de ter mentido, eu me orgulho imensamente de ter mentido, porque eu salvei companheiros, da mesma tortura e da morte.

Não tenho nenhum compromisso com a ditadura em termos de dizer a verdade. Eu estava num campo e eles estavam noutra e o que estava em questão era a minha vida e a de meus companheiros. E esse país, que transitou por tudo isso que transitou, que construiu a democracia, que permite que hoje eu esteja aqui, que permite que eu fale com os senhores, não tem a menor similaridade, esse diálogo aqui é o diálogo democrático. A oposição pode me fazer perguntas, eu vou poder responder, nós estamos em igualdade de condições humanas, materiais.

Nós não estamos num diálogo entre o meu pescoço e a força, senador. Eu estou aqui num diálogo democrático, civilizado, e por isso eu acredito e respeito esse momento. Por isso, todas as vezes eu já vim aqui nessa comissão antes. Então, eu começo a minha fala dizendo isso, porque isso é o resgate desse processo que ocorreu no Brasil. Vou repetir mais uma vez:

Não há espaço para a verdade, e é isso que mata na ditadura. O que mata na ditadura é que não há espaço para a verdade porque não há espaço para a vida, senador. Porque algumas verdades, até as mais banais, podem conduzir à morte. É só errarem a mão no seu interrogatório.

E eu acredito, senador, que nós estávamos em momentos diversos da nossa vida em
70.

Eu asseguro para o senhor, eu tinha entre 19 e 21 anos e, de fato, eu combati a ditadura militar, e disso eu tenho imenso orgulho.”

Dilma Rousseff

RESUMO

Campos-Cardoso, Rodrigo. **Efeitos da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina e da inibição da síntese de corticosterona na ativação de neurônios do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral durante as respostas de medo condicionado ao contexto em ratos adolescentes e adultos.** 2022. 104 f. Tese (Doutorado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O medo condicionado tem sido utilizado como modelo para transtornos de ansiedade, como o transtorno de estresse pós-traumático. A literatura aponta para a importância do papel do sistema de neurotransmissão serotoninérgico e da sinalização por glicocorticoides na modulação das respostas condicionadas de medo. Estes sistemas atuam em diversas estruturas encefálicas que estão relacionadas as respostas comportamentais e fisiológicas a este protocolo, dentre estas destacam-se o córtex pré-frontal medial (mPFC) e o complexo basolateral da amígdala (BLA). O mPFC possui duas regiões que atuam de forma antagônica em resposta ao condicionamento aversivo, o mPFC pré-límbico (PL) e o infra-límbico (IL). O mPFC-PL estaria relacionado a expressão de comportamentos condicionados aversivos, como o medo. Por outro lado, o mPFC-IL modularia a extinção de respostas condicionadas aversivas. O BLA, por sua vez, teria papel importante na sinalização de estímulos aversivos para outras regiões, como o mPFC. Além disso, durante a adolescência as sinapses locais, aferências e eferências do mPFC estão passando por um importante processo de maturação que podem, de alguma forma, diferenciar as respostas de adolescentes a de adultos ao protocolo de condicionamento de medo. Desta forma, buscamos entender como os tratamentos com a imipramina (um inibidor da síntese de serotonina e/ou noradrenalina) ou a metirapona (um inibidor da síntese de corticosterona) afetariam a expressão do comportamento condicionado de medo bem como a sua extinção. Além disso, buscamos avaliar a ativação neuronal nas áreas PL e IL, além do BLA em resposta a este mesmo protocolo. Para tanto, animais adolescentes (PND=29) e adultos (PND=59) foram submetidos ao condicionamento de medo contextual que consistiu em sessões de habituação, condicionamento, teste e quatro reexposições

subsequentes, a extinção do medo condicionando. Os animais foram tratados com imipramina ou metirapona em três diferentes momentos: entre a habituação e o condicionamento, entre o condicionamento e o teste e, três semanas antes do condicionamento, para avaliarmos os efeitos de longo prazo dos tratamentos neste mesmo protocolo. Animais do grupo controle, em cada uma das condições e idades receberam tratamento com veículo. A avaliação da ativação neuronal foi feita em dois momentos distintos: após o teste ou após a extinção. Em animais tratados entre a habituação e o condicionamento observamos que a imipramina atenuou o medo em animais adultos durante o teste, sem efeitos na extinção. Este efeito comportamental foi acompanhado de diminuição da ativação de neurônios no mPFC e BLA. Em animais adolescentes, observamos um efeito da imipramina aumentando o congelamento durante a extinção, sem alterar a atividade nas áreas estudadas. A metirapona, por sua vez, apresentou efeitos semelhantes em adolescentes e adultos, com uma diminuição do congelamento durante o condicionamento, o teste e a extinção do medo. Em adultos, observamos uma diminuição da atividade do BLA, já em adolescentes, um aumento da atividade do mPFC-IL em resposta ao tratamento. Quando tratamos os animais entre o condicionamento e o teste não observamos efeitos da imipramina em adultos, porém em adolescentes o tratamento diminuiu o congelamento durante o teste e a extinção, sem efeitos na ativação neuronal. Em animais tratados com a metirapona, novamente observamos efeitos comportamentais semelhantes em adolescentes e adultos: atenuação do medo no teste. Em adolescentes, porém, o tratamento aumentou o congelamento durante a extinção do medo condicionado. O tratamento com metirapona aumentou a atividade do mPFC-IL durante a extinção em adolescentes e adultos. Por fim, ao tratarmos os animais 21 dias antes do condicionamento observamos diminuição do congelamento em adultos tratados com imipramina, sem efeitos no comportamento de adolescentes. A metirapona, no entanto, foi capaz de diminuir o congelamento em adolescentes durante o teste e a extinção da memória de medo, sem efeitos na ativação neuronal nas áreas estudadas em adolescentes. Nossos dados apontam que a serotonina e os glicocorticóides desempenham um papel modulatório nas respostas de medo condicionado ao contexto e que este papel depende da idade em que o animal é submetido ao protocolo, bem como momento que ocorrem os tratamentos

(antes ou após o condicionamento). Os efeitos de longo prazo da imipramina foram observados apenas em adultos, enquanto os da metirapona somente em adolescentes. De modo geral, observamos que os tratamentos com imipramina e metirapona alteram a ativação de neurônios no mPFC e BLA em curto prazo, mas não em longo prazo. Isso aponta que as alterações observadas no tratamento de longo prazo podem depender de outros mecanismos que não a ativação de neurônios do mPFC e do BLA.

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

ABSTRACT

Campos-Cardoso, Rodrigo. **Effects of serotonin and noradrenaline reuptake inhibition and corticosterone synthesis inhibition on activation of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala neurons during conditioned contextual-fear responses in adolescent and adult rats.** 2022. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina (Neurologia)) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Conditioned fear has been used as a model for anxiety disorders such as post-traumatic stress disorder. The literature points to the importance of the role of the serotonergic neurotransmission system and glucocorticoid signaling in the modulation of conditioned fear responses. These systems would act on several brain structures that are related to the behavioral and physiological responses to this protocol, among which the medial prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala complex (BLA) stand out. The mPFC has two regions that act antagonistically in response to aversive conditioning, the prelimbic (PL) and the infralimbic (IL) mPFC. The mPFC-PL is related to the expression of aversive conditioned behaviors, such as fear. On the other hand, mPFC-IL modulates the extinction of aversive conditioned responses. The BLA, in its turn, would play an important role in signaling aversive stimuli to other regions, such as the mPFC. Furthermore, during adolescence, the local synapses, afferents, and efferents of the mPFC are undergoing an important maturation process that may somehow differentiate the responses of adolescents and adults to the fear conditioning protocol. In this way, we sought to understand how treatments with imipramine (an inhibitor of serotonin and/or noradrenaline synthesis) or metyrapone (an inhibitor of corticosterone synthesis) would affect the expression of fear-conditioned behavior as well as its extinction. In addition, we sought to assess neuronal activation in the PL and IL areas, in addition to the BLA in response to this same protocol. Therefore, adolescent (PND=29) and adult (PND=59) animals were submitted to contextual fear conditioning that consisted of habituation, conditioning, testing sessions, and four subsequent re-exposures, conditioned fear extinction. The animals were treated with imipramine or metyrapone at three different time points: between habituation and conditioning, between conditioning and test, and three weeks before conditioning, to assess the long-term effects of

the treatments in the same protocol. Animals in the control group, in each of the conditions and ages, received vehicle treatment. The assessment of neuronal activation was performed at two different times: after the test or after extinction. In animals treated between habituation and conditioning, we observed that imipramine attenuated fear in adult animals during the test, with no effects on extinction. This behavioral effect was accompanied by decreased activation of neurons in mPFC and BLA. In adolescent animals, we observed an effect of imipramine increasing freezing during extinction, without altering activity in the studied areas. Metyrapone, in its turn, showed similar effects in adolescents and adults, with a decrease in freezing during conditioning, testing, and fear extinction. In adults, we observed a decrease in BLA activity, whereas in adolescents, an increase in mPFC-IL activity in response to treatment. When we treated animals between conditioning and testing, we did not observe the effects of imipramine in adults, but in adolescents, the treatment decreased freezing during testing and extinction, with no effect on neuronal activation. In animals treated with metyrapone, we again observed similar behavioral effects in adolescents and adults: attenuation of fear in the test. In adolescents, however, the treatment increased freezing during conditioned fear extinction. Metyrapone treatment increased mPFC-IL activity during extinction in adolescents and adults. Finally, when we treated the animals 21 days before conditioning, we observed a decrease in freezing in adults treated with imipramine, with no effects on the behavior of adolescents. Metyrapone, however, was able to decrease freezing in adolescents during the test and the extinction of fear memory, with no effects on neuronal activation in the areas studied in adolescents. Our data indicate that serotonin and glucocorticoids play a modulatory role in contextual conditioned fear responses and that this role depends on the age at which the animal is submitted to the protocol, as well as the time at which the treatments occur (before or after conditioning). The long-term effects of imipramine were seen only in adults, while those of metyrapone were only seen in adolescents. Overall, we observed that imipramine and metyrapone treatments alter neuron activation in mPFC and BLA in the short term, but not in the long term. This points out that the changes observed in the long-term treatment may depend on mechanisms other than the activation of mPFC and BLA neurons.

Keywords: Post-traumatic stress disorder. Imipramine. Metyrapone.
Immunohistochemistry. Adolescents.

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivos	31
2.1 Objetivos específicos	32
3 Material e métodos	33
3.1 Animais de experimentação	34
3.2 Delineamento experimental	34
3.3 Equipamentos, materiais, procedimentos e fármacos	37
3.3.1 Habituação, condicionamento, teste e extinção do medo condicionado ao contexto	37
3.3.2 Inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina por imipramina e da síntese de corticosterona por metirapona	38
3.3.3 Procedimento de eutanásia e coleta dos tecidos	38
3.3.4 Processamento dos tecidos, imunoistoquímica e quantificação das células imunopositivas para c-Fos	39
3.3.5 Análise estatística	40
4 Resultados	41
4.1 Efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona antes do condicionamento em ratos adolescentes e adultos	42
4.1.1 Em ratos adultos a metirapona diminui o congelamento durante o condicionamento e durante o teste e facilita a extinção da memória de medo, a imipramina diminui o congelamento apenas no teste	42
4.1.2 Os tratamentos com imipramina e metirapona afetam a expressão da proteína c-Fos em neurônios do mPFC e do BLA	44
4.1.3 Em ratos adolescentes a imipramina aumenta o congelamento afetando a extinção da memória de medo contextual	46
4.1.4 Em adolescentes, o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL durante o teste e a extinção da memória condicionada ... 48	
4.2 Efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona após o condicionamento em ratos adolescentes e adultos	52
4.2.1 Metirapona e imipramina não têm efeito na extinção da memória de medo contextual em ratos adultos	52
4.2.2 Efeitos dos tratamentos com imipramina ou metirapona após o condicionamento na ativação de neurônios do mPFC e BLA	54
4.2.3 Em ratos adolescentes a imipramina e a metirapona diminuem o congelamento durante o teste, porém apenas a imipramina facilita a extinção da memória condicionada	58
4.2.4 Em adolescentes, o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL durante o teste e do mPFC PL e IL durante a extinção da memória condicionada	60
4.3 Efeitos de longo prazo do tratamento com imipramina ou metirapona em ratos adolescentes e adultos	64

<i>4.3.1 O tratamento com imipramina apresenta efeitos de longa duração em adultos, diminuindo o congelamento no condicionamento e no teste, a metirapona não afeta as respostas comportamentais.....</i>	<i>64</i>
<i>4.3.2 Em ratos adolescentes, o tratamento com metirapona apresenta efeitos de longo prazo, diminuindo o congelamento durante o teste e facilitando a extinção da memória de medo contextual.....</i>	<i>66</i>
<i>4.3.3 Não são observadas alterações da ativação neuronal no mPFC e no BLA durante o teste.....</i>	<i>68</i>
5 Discussão.....	72
6 Conclusão	85
7 Referências Bibliográficas	87
ANEXO I – Submissão de manuscrito para publicação	103

1 Introdução

O organismo coordena respostas fisiológicas e comportamentais frente a estímulos estressores. Tais respostas têm um importante valor adaptativo, uma vez que preparam o indivíduo para enfrentar respostas ameaçadoras e aversivas. A depender da frequência e intensidade destes estímulos, e das respostas geradas por estes, processos mal adaptativos podem ser desencadeados (CHROUSOS, 2009; MCEWEN, 2012). Uma vez desencadeados, estes processos podem levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos de humor, como o transtorno depressivo maior, assim como transtornos de ansiedade, como ansiedade generalizada, síndrome do pânico e o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Dados da Organização Mundial da Saúde mostram o Brasil como um dos líderes do continente americano na prevalência destes transtornos. Estimativas apontam para cerca de 5,8% da população brasileira acometida com depressão, enquanto os transtornos de ansiedade chegam a atingir 9,3% da nossa população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Neste sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de elucidar os principais fatores que levariam alguns indivíduos a desenvolver o TEPT. Diversas abordagens têm sido utilizadas na tentativa de entender como os fatores de risco ambientais e genéticos, por exemplo, poderiam estar relacionados ao risco individual de desenvolvimento de respostas negativas frente a estressores diversos (MAREN; HOLMES, 2016; MCEWEN et al., 2012; MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015). Um dos fatores para a susceptibilidade aos efeitos deletérios do estresse seria o papel que o estado de excitação emocional durante o evento aversivo exerceria na memória (PARÉ, 2003), reforçando a sua consolidação, levando-se, portanto, a sua persistência quando comparada a recordações evocadas de ambientes ou contextos emocionalmente neutros. Neste sentido, experiências que aumentam o estado de excitação emocional tendem a aumentar a persistência de memórias associadas em comparação a memórias extraídas de contextos neutros (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016; MCGAUGH, 2004).

Os processos de memorização de eventos ameaçadores ou aversivos possuem importante papel adaptativo, uma vez que preparam o indivíduo a enfrentar eventuais situações semelhantes no futuro. No entanto, a persistência da recordação de um evento estressante agudo pode levar a uma condição

patológica característica em transtornos de ansiedade. Em situações como esta, a memória apresenta componentes traumáticos, sendo evocada de forma recorrente, característica presente em pacientes com diagnóstico de TEPT (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: DSM-V, 2013)

Modelos animais vêm sendo utilizados para o estudo das memórias emocionais e das alterações associadas ao estresse e a ansiedade, como por exemplo os mecanismos subjacentes ao TEPT. Dentre estes, destaca-se o uso do condicionamento clássico de medo (VERBITSKY; DOPFEL; ZHANG, 2020). Neste paradigma comportamental, durante o condicionamento, o roedor é exposto a estímulos condicionados (EC), como um estímulo sonoro ou luminoso por exemplo, pareado a um estímulo incondicionado (EI), como o choque nas patas. Ao se avaliar a memória adquirida no dia do condicionamento, a apresentação apenas do EC revela uma resposta emocional de medo, apesar da ausência do EI, caracterizada pelo congelamento do animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1971, 1969; BUCCAFUSCO, 2009; FANSELOW, 1980). Para além da resposta comportamental, estão presentes respostas autonômicas tal como o aumento da frequência cardíaca e respiratória e da pressão arterial assim como também respostas neuroendócrinas como aumento da liberação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) como a corticosterona (CORT) (LeDoux, 1992; LeDoux et al., 1988). Tais respostas condicionadas podem ser observadas quando o animal é apresentado ao mesmo aparato onde recebeu o EI, mesmo sem a presença do EC. Nesta situação, o condicionamento é associado ao contexto.

Diversos autores apontam ao longo do tempo para a participação de estruturas como o córtex pré-frontal (PFC), hipocampo, amígdala, hipotálamo, matéria cinzenta periaquedutal (PAG) e outras; além de sistemas de neurotransmissores, neuropeptídios e hormônios, como a noradrenalina, serotonina, fator de liberação de corticotrofina (CRF) e glicocorticoides. Estudos têm demonstrado, por exemplo, a importância de circuitos envolvendo o córtex, o hipocampo e a amígdala nos processos envolvendo a resposta condicionada, como a sincronização destas áreas durante processos mnemônicos que levam a respostas de medo (LIKHTIK et al., 2014; POPA et al., 2010; SEIDENBECHER et al., 2003). Cada uma destas estruturas possui funções distintas e as respostas observadas por cada uma delas está relacionada a diferenciação das

consequências comportamentais observadas em modelos de medo condicionado (CHAAYA; BATTLE; JOHNSON, 2018; FENDT; FANSELOW, 1999; GEWIRTZ; MCNISH; DAVIS, 2000; LIN et al., 2018; MAREN; FANSELOW, 1997; MORGAN; LEDOUX, 1995; RESSLER; MAREN, 2019; SILVA; GROSS; GRÄFF, 2016; SULLIVAN et al., 2004; XU et al., 2016). Em relação ao papel de cada uma destas estruturas, destaca-se o papel do córtex pré-frontal medial (mPFC) e da amígdala, sobretudo o papel do núcleo basolateral da amígdala (BLA).

O mPFC de roedores pode ser dividido em córtex cingulado anterior além de mais dois outros subnúcleos: área pré-límbica (PL) e área infra-límbica (IL), sendo os últimos os que têm sido mais ostensivamente estudados nas respostas condicionadas a estímulos aversivos (MAREK; SUN; SAH, 2019). Evidências na literatura apontam para um papel dicotômico e antagônico de cada um destes subnúcleos nas respostas condicionadas, especialmente, mas não exclusivamente nas aversivas (ADHIKARI et al., 2015; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). O mPFC PL estaria relacionado com a formação e expressão de respostas condicionadas. Por outro lado, o mPFC IL estaria relacionado com a inibição e extinção destas mesmas respostas (para uma revisão ver Howland et al., 2022). Em suporte ao papel antagônico destas áreas, evidências apontam para o efeito de lesões ou silenciamento farmacológico (SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011) do PL levando a uma dissociação entre EC e EI e supressão de respostas de medo em modelos animais. Por outro lado, uma maior ativação desta área, como através de microestimulação, leva a uma maior expressão do comportamento condicionado em modelos de condicionamento de medo (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). De maneira contrária, afetar a atividade do IL não afeta o condicionamento aversivo, porém atrapalha a sua extinção (SANTINI; QUIRK; PORTER, 2008). Ainda, a ativação de neurônios do IL por técnicas como a optogenética, revelou uma facilitação do aprendizado da extinção do comportamento condicionado (BUKALO et al., 2021; DO-MONTE et al., 2015). Complementarmente, o condicionamento de medo ao contexto é capaz de diminuir a atividade excitatória de neurônios do IL (SOLER-CEDEÑO et al., 2016), demonstrando que o aumento da atividade do PL afetaria a atividade do IL, sendo o contrário também verdadeiro. Cabe ressaltar que a extinção da memória de medo é um processo de aprendizagem ativo que ocorre

de forma independente do condicionamento aversivo que leva a resposta de medo. Consiste em supressão da resposta condicionada com sucessivas apresentações do EC sem a apresentação do EI (MAREN; HOLMES, 2016).

A amígdala, por sua vez, tem sido entendida com uma estrutura chave nos processos de aprendizado e condicionamento aversivos (GRÜNDEMANN; LÜTHI, 2015; LEDOUX, 1992, 2000; ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009), sobretudo o BLA. Estudos que lançam mão de diferentes técnicas e critérios funcionais, anatômicos e genéticos demonstram a amígdala como local convergente de processamento dos EC e EI - estímulos sensoriais que levam informações contextuais processadas em outros córtices como visual e auditivos, além de informações nociceptivas como o choque nas patas e demais estímulos aversivos (DEJEAN et al., 2015; HERRY; JOHANSEN, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). As projeções da amígdala, por sua vez, vão determinar a resposta comportamental do animal frente a estas situações. Corroborando a ideia de papel determinante na amígdala na organização destas respostas, trabalhos mostram que a inibição ou lesão dos neurônios deste núcleo leva a uma menor resposta condicionada (PHILLIPS; LEDOUX, 1992; RUIZ MARTINEZ; RIBEIRO DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2006) enquanto a estimulação ótica destas mesmas populações neuronais leva a uma maior resposta de medo ao se apresentar um EC, mesmo quando não pareado a um EI (JOHANSEN et al., 2010). Outra evidência relacionada ao papel chave da amígdala no processamento de estímulos sensoriais e orquestração das respostas comportamentais é a capacidade de neurônios desta estrutura darem uma valência positiva ou negativa a diferentes estímulos sensoriais. Populações distintas de neurônios no BLA são responsivas a estímulos condicionados ou incondicionados e são capazes de provocar respostas específicas de valência, gerando uma resposta comportamental e fisiológica apropriada para cada tipo de estímulo (GORE et al., 2015).

É importante ressaltar que o mPFC e o BLA possuem conexões recíprocas entre si. Em situações neutras ou sem a presença de um estímulo estressor, o PFC teria um papel de controlar a atividade de diversas áreas encefálicas, incluindo o BLA, ajudando na tomada de decisão e direcionando a atenção do indivíduo, o chamado controle "*top-down*" (MILLER; COHEN, 2001). Por outro lado, sob estresse ou durante situações aversivas, o papel inibitório

que o córtex possui sobre o BLA seria diminuído (ARNSTEN, 2009; ARNSTEN et al., 2015), aumentando a expressão de comportamentos relacionados a respostas de ansiedade (LOWERY-GIONTA et al., 2018), por exemplo. Corroborando esta ideia, durante tarefas de aproximação e esquiva, como o labirinto em cruz elevado, o campo aberto e o teste de interação social, a estimulação ótica da via BLA-mPFC em camundongos diminuiu a exploração dos braços abertos, da área central e o número de interações, respectivamente (FELIX-ORTIZ et al., 2016; LOWERY-GIONTA et al., 2018).

Para além do papel que o mPFC e o BLA desempenham nos processos de condicionamento e extinção de memórias aversivas e a interação que ocorre entre eles, sistemas de neurotransmissores como o serotoninérgico, e neuroendócrinos como liberação de glicocorticoides, também participam e regulam tais eventos.

A serotonina tem sido descrita como moduladora do aprendizado de medo (BURGHARDT; BAUER, 2013; MARCINKIEWCZ et al., 2016, 2019) e os antidepressivos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) são a primeira linha de tratamento para os transtornos de ansiedade. No entanto, este efeito de antidepressivos é seletivo para a serotonina, uma vez que inibidores de recaptção de noradrenalina não apresentam o mesmo efeito de atenuação do medo condicionado (SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006).

O mecanismo exato pelo qual a serotonina exerce seus efeitos no condicionamento de medo permanece desconhecido. A literatura tem apontado para a participação deste sistema na circuitaria envolvida em memórias de curto e longo prazo, nos processos de aprendizagem e expressão de medo, além dos processos de extinção da memória de medo (para revisão, ver Bauer, 2015). Em relação a este papel desempenhado pela serotonina, há dados que apontam para a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica como capaz de atenuar as consequências da exposição de roedores ao protocolo de medo condicionado (INOUE; TSUCHIYA; KOYAMA, 1996). De forma complementar, foi demonstrado que a diminuição da disponibilidade de serotonina, através da depleção da triptofano hidroxilase, passo limitante em sua síntese, aumenta a resposta de congelamento em animais submetidos ao condicionamento de medo (WAIDER et al., 2019). Neste sentido, alguns estudos foram capazes de demonstrar que tratamentos com inibidores seletivos de recaptção de

serotonina (ISRS) afetam a aquisição e a evocação da memória aversiva associada ao contexto. Desta forma, diferentes esquemas de tratamento foram capazes de diminuir os níveis de congelamento de roedores em resposta ao contexto aversivo ou às pistas condicionadas ou, ainda, de facilitarem o processo de extinção destas memórias ao longo do tempo (Burghardt et al., 2013; Burghardt; Bauer, 2013; Hashimoto; Inoue; Koyama, 1996; Inoue; Kitaichi; Koyama, 2011; Montezinho et al., 2010). Johnson et al. (2019) demonstraram que a diminuição da expressão de transportadores de serotonina no núcleo dorsal da rafe (NDR), principal núcleo de projeção serotoninérgica no encéfalo, aumenta a aquisição e afeta a extinção da memória de medo (Johnson et al., 2019). Corroborando estes achados Narayanan et al. (2011) observaram que o transportador de serotonina está associado a déficits na extinção do medo, relacionando-se a uma maior sincronização entre a amígdala lateral e o mPFC (Narayanan et al., 2011).

No entanto, a participação da serotonina parece ser bem mais complexa do que a ação dos ISRS e alterações no seu transportador. Ren e colaboradores (2018) mostraram que os neurônios do NDR se organizam em duas subpopulações distintas, e respondem de maneira oposta a estímulos aversivos. Os neurônios que se projetam para a amígdala promovem um estado tipo ansioso em roedores (SENGUPTA; HOLMES, 2019). Por sua vez, neurônios do NDR que se projetam para o PFC estariam relacionados a estratégias de enfrentamento (do inglês *coping*) a estímulos aversivos (REN et al., 2018). Estes neurônios serotoninérgicos do NDR são ativados durante a apresentação do EI e a liberação de serotonina no BLA desempenha importante papel na aquisição e expressão do medo condicionado (JOHNSON et al., 2015). O papel da serotonina na microcircuitaria do BLA não está totalmente elucidado, porém dados mostram que o neurotransmissor seria capaz de regular a atividade dos interneurônios parvalbuminérgicos (PV) e somatostatinérgicos (SOM) no BLA, alterando a excitação dos neurônios principais (Rainnie, 1999; para revisão, ver Bocchio et al., 2016) que coordenariam as alterações comportamentais do condicionamento de medo.

Em relação aos receptores de serotonina, os do tipo 5-HT₂, presentes no núcleo basolateral da amígdala e no núcleo leito da estria terminal, parecem estar relacionados à uma facilitação da aprendizagem de medo e a um aumento

da ansiedade em roedores e humanos (BAUER, 2015; MACEDO et al., 2007). Já receptores do tipo 5-HT3 estariam relacionados a um maior condicionamento de medo ao contexto, não sendo este o caso na presença de pistas, como tom sonoro ou luz (BAUER, 2015). Em acordo com estas evidências Stein et. al (2000) mostraram que receptores 5-HT1A geram uma inibição em diversas sub-regiões da amígdala, enquanto receptores do tipo 5-HT2 e 5-HT3 geram uma excitação (STEIN; DAVIDOWA; ALBRECHT, 2000). Outros autores demonstraram que a ativação de receptores de serotonina do tipo 5-HT1A pode estar relacionada a uma diminuição da expressão de medo. Resultados neste sentido foram encontrados a partir da ativação destes receptores no PFC (ALMADA; COIMBRA; BRANDÃO, 2015), hipocampo dorsal (ALMADA et al., 2009), PAG (BROIZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008), e núcleo mediano da rafe (BORELLI et al., 2005), além da amígdala mencionada anteriormente. Foi demonstrado ainda que a atenuação do medo condicionado mediada por outros agentes que não os agonistas do receptor 5-HT1A poderiam, em parte, ser dependentes destes receptores, como no núcleo leito da estria terminal (GOMES et al., 2012; MARCINKIEWCZ et al., 2019).

É importante ressaltar que o sistema de neurotransmissão serotoninérgico é influenciado pela ativação do eixo HPA e subsequente liberação de glicocorticoides. Indicando uma interação do sistema serotoninérgico com os sistemas de resposta ao estresse, estímulos estressores ou mesmo os glicocorticóides, como a CORT, são capazes de reduzir a expressão ou aumentar a internalização dos receptores 5-HT1A em diversas regiões encefálicas como o PFC e o BLA (ALBERT; VAHID-ANSARI; LUCKHART, 2014). Outra evidencia seria a ativação de receptores de glicocorticoides (GR) em neurônios do núcleo dorsal da rafe de camundongos inibindo a expressão de genes que codificam para a enzima triptofano hidroxilase (VINCENT et al., 2018). A deleção com vetores virais destes mesmos receptores causa um efeito ansiolítico e antidepressivo em testes como o labirinto em cruz elevado e do nado forçado, respectivamente (VINCENT; JACOBSON, 2014). A exposição dos roedores à estressores diversos levam a um aumento na liberação de glicocorticoides e na densidade de receptores do tipo GR (GANON-ELAZAR; AKIRAV, 2013) e, portanto, alterações na atividade destes receptores em áreas encefálicas como córtex frontal, hipocampo, amígdala e outras (REUL; DE

KLOET, 1985). Estas alterações, por sua vez, estariam relacionadas às alterações comportamentais em diversos modelos de transtornos psiquiátricos, como transtornos de ansiedade e de humor (DE KLOET et al., 1998). Por outro lado, a expressão de receptores GR no hipocampo de ratos envolveria a neurotransmissão mediada por serotonina, a qual teria importante papel na densidade destes receptores nesta mesma área (LAPLANTE; DIORIO; MEANEY, 2002). Além disso, é sabido que a imipramina também modula a expressão de GR, o que poderia explicar, em parte, a atenuação dos sintomas depressivos gerados pelo fármaco (ANACKER et al., 2011; PARIANTE; MILLER, 2001). Corroborando esta ideia, foi demonstrado que após três semanas, o tratamento subcrônico com imipramina aumenta a expressão de receptores GR no hipocampo dorsal e que este aumento atenua os efeitos da pré-exposição no teste do nado forçado (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021).

Os hormônios corticosteroides desempenham um papel importante em tarefas cognitivas e de aprendizado (MEIR DREXLER; WOLF, 2017; ROOZENDAALL; BOHUS; MCGAUGH, 1996; SAZMA; SHIELDS; YONELINAS, 2019). O aumento de cortisol em humanos e CORT em roedores seria essencial para os processos de aquisição e consolidação de memórias (CORODIMAS et al., 2006; DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016; MCGAUGH, 2004). Uma das evidências neste sentido seria seus efeitos facilitando a ocorrência de potenciação de longa duração (LTP) (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1999) dependente de ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e GR, importante mecanismo para processos de aprendizagem e memória. A participação dos glicocorticoides seria, portanto, mediada por receptores MR e GR. Esta ideia encontra suporte em experimentos onde roedores tratados com antagonistas destes receptores em áreas encefálicas envolvidas com tarefas de aprendizado (CORDERO; SANDI, 1998; DONLEY; SCHULKIN; ROSEN, 2005; KORTE et al., 1995) ou, com inibidor de síntese de corticosterona, têm uma deficiência na aquisição e consolidação destas memórias (CAREAGA et al., 2015; CONRAD; MAULDIN-JOURDAIN; HOBBS, 2001; CORDERO et al., 2002). Complementarmente, há evidências mostrando efeitos do aumento crônico de glicocorticoides como um facilitador da resposta de congelamento em roedores (SKÓRZEWSKA et al., 2007). Tal participação dos glicocorticoides está de acordo com a ideia de o estado de excitação emocional moldar os mecanismos

de aquisição e consolidação de memórias, como dito anteriormente. Além dos processos de aquisição e consolidação, os glicocorticoides também regulam a extinção da memória condicionada. Uma evidência clínica neste sentido é o fato de pacientes com TEPT apresentarem menor nível do cortisol ou menor resposta do eixo HPA quando comparados a indivíduos controle (EHLERT; GAAB; HEINRICHS, 2001; HANDWERGER, 2009; RAUCH et al., 2020), o que poderia ser devido a um comprometimento da resposta do eixo, com uma maior resposta de feedback negativo (YEHUDA et al., 2006), levando a menores níveis de cortisol (para revisão, ver PITMAN et al., 2012). Neste sentido, é proposto que a diminuição do cortisol seria um dos fatores que afetam os mecanismos de extinção da memória em pacientes com TEPT. Estudos demonstram a efetividade da psicoterapia como tratamento eficaz na redução dos sintomas do TEPT (para revisão, ver KAR, 2011) e que a administração de glicocorticoides em pacientes diagnosticados juntamente com psicoterapia cognitivo-comportamental levaria a uma melhora ainda maior dos sintomas relacionados ao quadro (DE QUERVAIN et al., 2011; GOETTER; MARQUES, 2015; YEHUDA et al., 2015). Experimentalmente em roedores, foi demonstrado que o tratamento com antagonistas de GR ou inibidores da liberação de CORT afetaram a extinção do comportamento condicionado, levando a uma manutenção da resposta de congelamento mesmo após sucessivas exposições ao EC (BARRETT; GONZALEZ-LIMA, 2004; BLUNDELL et al., 2011; YANG; CHAO; LU, 2006). Por outro lado, um aumento na sinalização de GCs leva a uma facilitação da extinção destes mesmos comportamentos (YANG; CHAO; LU, 2006). Vale ressaltar que os efeitos dos GCs nestes processos são tempo dependentes (Hui et al., 2004), ou seja, a influência que exercem nestes processos ocorre dentro de uma janela temporal.

Para além das implicações dos GCs na aquisição, consolidação e extinção da resposta condicionada, os efeitos da liberação de GCs no encéfalo em consequência a estímulos estressores vêm sendo amplamente estudados na neurobiologia de transtornos psiquiátricos, como o transtorno de ansiedade generalizada.

No PFC, um dos efeitos do estresse mais bem descritos é a atrofia dos neurônios na área medial (MCEWEN; MORRISON, 2013), com diminuição das ramificações e espinhas dendríticas, diminuição de plasticidade sináptica,

aumento (YUEN et al., 2011) ou diminuição (MCKLVEEN et al., 2016) da excitação dos neurônios principais. Especialmente na área IL, o estresse teria um efeito de inibir a ativação dos neurônios, enquanto na área PL um efeito contrário de excitação, levando a consequências comportamentais deletérias, como maior expressão de comportamentos relacionados a ansiedade, como diminuição da exploração de áreas aversivas e menor interação com pistas ambientais novas, além de déficits na memória. Vale ressaltar que estes efeitos ocorrem através da ativação de GR (GULYAEVA, 2021), ressaltando a importância dos GCs nessas consequências plásticas e comportamentais. Além destes efeitos descritos para os neurônios principais, há também efeitos na microcircuitaria das áreas PL e IL. Os GCs afetariam a atividade de interneurônios -PV e -SOM que regulam a atividade dos neurônios principais, alterando o balanço excitatório/inibitório, o que também levaria a consequências comportamentais deletérias (para revisão, ver McKlveen et al., 2019). O PFC é ainda um sítio de regulação do eixo-HPA, sendo uma das áreas responsáveis pelo *feedback* negativo de liberação de GCs. Neste sentido, a lesão da área, leva a aumento da concentração de CORT em resposta a estressores (DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993; FIGUEIREDO et al., 2003).

Na amígdala, o estresse e os GCs teriam um papel diferente do observado no PFC, levando a hipertrofia dos NP. O estresse agudo de restrição foi capaz de aumentar o número de ramificações e de espinhas dendríticas no BLA, levando a expressão de comportamento tipo-ansioso (MITRA et al., 2005). Efeito similar foi observado apenas com a administração de CORT (MITRA; SAPOLSKY, 2008). De forma contra intuitiva, a administração de CORT antes (RAO et al., 2012) ou após (CHAKRABORTY et al., 2020) o estresse de restrição é capaz de atenuar os efeitos comportamentais e plásticos observados. Tais resultados demonstram um efeito modulatório que os GCs teriam nos neurônios do BLA, e que a manipulação do eixo-HPA após um evento estressor pode atenuar os seus efeitos comportamentais e plásticos. Um dos mecanismos possíveis para os efeitos plásticos em decorrência do estresse observados na amígdala poderia ser o aumento do BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) (LAKSHMINARASIMHAN; CHATTARJI, 2012), facilitando a hipertrofia do neurônios da região. O estresse leva ainda a mudanças nas propriedades da membrana de neurônios do BLA, levando a um aumento na taxa de disparos de

potenciais de ação (ZHANG; ROSENKRANZ, 2012), o que levaria a uma maior ativação da área e às consequências comportamentais já descritas anteriormente (HETZEL; ROSENKRANZ, 2014).

Estes efeitos do estresse no PFC e no BLA descritos ocorrem de maneira dependente da duração e intensidade do estímulo estressor, como também da idade em que tais eventos ocorrem (LUPIEN et al., 2009; MCEWEN; MORRISON, 2013).

A adolescência é um importante período para o sistema nervoso central. Durante esta fase, ocorrem mecanismos como poda neuronal e de sinapses, mielinização e remodelação de sistemas de neurotransmissores que preparam os indivíduos para a vida adulta e seus desafios (SPEAR, 2000). Durante este período de amadurecimento contínuo, os adolescentes são desafiados com experiências que dependeriam de um sistema nervoso central maduro, o que poderia resultar em má tomada de decisão e/ou aumento da tomada de risco (LO IACONO; CAROLA, 2018).

Apesar de existirem dados sobre os efeitos do estresse durante o desenvolvimento, não há um consenso nestas evidências de como as experiências durante a adolescência podem moldar as respostas comportamentais ao estresse. Por exemplo, o eixo-HPA de roedores adolescentes mostrou padrões de resposta a estímulos estressores diferentes do observado no eixo dos adultos. O eixo-HPA de adolescentes gera uma resposta mais lenta, levando a um aumento atrasado de CORT (MCCORMICK; MATHEWS, 2007), além de uma maior liberação do hormônio em comparação ao eixo de animais adultos (EILAND; ROMEO, 2013). Além disso, foi descrito que em roedores adolescentes há uma liberação de CORT sustentada por mais tempo após o estresse quando comparados a adultos (EILAND; ROMEO, 2013; MCCORMICK; MATHEWS, 2007), provavelmente devido ao mecanismo de *feedback* negativo imaturo. Evidências na literatura apontam para um período de suscetibilidade ou resiliência aos efeitos do estresse que poderiam ocorrer durante esta fase do desenvolvimento (JANKORD et al., 2011; MCCORMICK; GREEN, 2013; ROMEO, 2015, 2017), mas como o encéfalo adolescente organiza e executa as respostas ao estresse permanece pouco descrita.

O mPFC, uma região crítica associada ao controle do eixo HPA e à coordenação de respostas comportamentais a estressores, parece passar por

mudanças dinâmicas durante o desenvolvimento dos indivíduos. Dando suporte a esta ideia, um estudo usando traçadores neurais mostrou que a conexão entre mPFC e outras áreas límbicas ocorre de forma tempo dependente. Especificamente, a área PL do mPFC recebe projeções do BLA e do hipocampo ventral aproximadamente aos 30 dias de vida (PATTWELL et al., 2016) e este processo poderia estar subjacente a dificuldade descrita de adolescentes extinguirem memórias aversivas. Complementando esta ideia, as projeções do PFC para a amígdala basal passam por um processo de poda neuronal também durante a adolescência. A perturbação deste mecanismo poderia levar a uma maior regulação comportamental pela amígdala ao invés do controle *top-down* do córtex, que normalmente é observado durante a vida adulta (CRESSMAN et al., 2010). Outra evidência que dá suporte a ideia de uma fase sensível e de um papel importante do mPFC seria a supressão do comportamento de congelamento durante o condicionamento aversivo, como também a uma extinção facilitada do medo, através do antagonismo do $\alpha 7nAChR$ (um receptor nicotínico de acetilcolina) no PL durante a adolescência (MIGUELEZ FERNÁNDEZ et al., 2021). Esta supressão mediada por este receptor afetaria a atividade de interneurônios-PVs, alterando a excitabilidade da região. Este fenômeno, porém, é observado apenas durante a adolescência. Além disso, durante o seu amadurecimento no período da adolescência, o PFC passa por um processo de balanceamento de sinapses excitatórias e inibitórias (ARRUDA-CARVALHO et al., 2017). Neste período crítico, o desequilíbrio desse sistema pode se relacionar a prejuízos na função cortical e amigdalár durante a vida adulta (ARRUDA-CARVALHO et al., 2017; CABALLERO; OROZCO; TSENG, 2021), levando a psicopatologias.

Essa microcircuitaria local no PL é susceptível a efeitos do aumento de GCs, que parecem desempenhar um papel essencial na maturação do PFC. A exposição crônica ao estresse aumentou comportamentos tipo-ansioso e teve efeitos significativos nos interneurônios-PVs da área PL de camundongos adolescentes machos (PAGE; COUTELLIER, 2018) e esta regulação negativa destes interneurônios durante a adolescência leva ao aumento das respostas de medo na idade adulta, reforçando o seu papel em tais efeitos (CABALLERO; OROZCO; TSENG, 2021). Além disso, Yuen e colaboradores (2011) demonstraram que o estresse agudo na adolescência pode aumentar a função

glutamatérgica no PFC através dos receptores NMDA e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) (YUEN et al., 2011), o que poderia ser resultado do desbalanço inibitório resultante dos efeitos do estresse. No entanto, no córtex PL de camundongos não se encontraram alterações morfológicas nas espinhas dendríticas devido à administração crônica de CORT, sugerindo resistência dos NP à CORT aumentada (BARFIELD et al., 2020).

Complementando este raciocínio, nosso grupo observou que diferentemente de adultos, ratos adolescentes são resilientes aos efeitos tardios do estresse de restrição, e que a supressão do eixo-HPA com metirapona, especificamente aos 30 dias de idade, tem efeitos de longa duração. Dentre estes efeitos está uma exploração exacerbada da área aversiva na caixa claro-escuro 10 dias após o tratamento, juntamente a um aumento da resposta do eixo-HPA ao teste comportamental (CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação). Sabe-se que a CORT leva a hipertrofia dos neurônios de projeção do BLA (MITRA; SAPOLSKY, 2008) e que além disso, as projeções do BLA para o PL são estabelecidas durante a adolescência, aproximadamente aos 30 dias de vida (PATTWELL et al., 2016), como anteriormente descrito. Desta forma, poderia haver um mecanismo pelo qual a inibição da liberação de corticosterona afetaria a conexão funcional BLA-mPFC-PL, levando a menos comportamentos ansiosos, como observamos neste estudo.

Em conjunto, estes dados apontam para um papel regulador das respostas condicionadas de medo do sistema de sinalização serotoninérgico e de sistemas de sinalização neuroendócrinos, através dos GCs. Por outro lado, apesar dos efeitos já descritos com os ISRS, os efeitos da imipramina, que interage com o sistema de sinalização por GCs, regulando a expressão de receptores GR (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021) não está bem descrito. Além disso, sabe-se que o tratamento agudo com metirapona gera efeitos imediatos e duradouros no eixo-HPA em adultos (ROTLLANT; ARMARIO, 2005) e adolescentes (CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação), porém seus efeitos no protocolo de condicionamento de medo ao contexto em ratos adolescentes não estão descritos. Desta forma, nossa hipótese é que o tratamento com imipramina e consequente aumento da disponibilidade de serotonina ou com metirapona e consequente supressão da resposta do eixo-HPA levaria a alterações das respostas comportamentais em ratos adolescentes

e adultos. Mais especificamente, antes do condicionamento, a imipramina teria um papel de modular os processos de memorização (Bauer, 2015) e a metirapona de afetar a aquisição da memória de medo. Por outro lado, após o condicionamento, a imipramina levaria a uma atenuação do comportamento de medo e a metirapona a déficits na extinção do medo condicionado. Além disso, os efeitos de longo prazo do tratamento com imipramina levariam a uma alteração dos receptores GR e consequente modulação das respostas ao condicionamento de medo ao contexto (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021) e com metirapona, pelo menos em adolescentes, afetaria a atividade do eixo-HPA em maturação (CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação), o que poderia afetar a via BLA-mPFC-PL, alterando as respostas de medo.

2 Objetivos

O objetivo desta tese foi investigar os efeitos agudos decorrentes da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina pela imipramina e da inibição da síntese de corticosterona pela metirapona nas respostas condicionadas de medo ao contexto em diferentes fases do desenvolvimento: adolescência e vida adulta. Além disso, observando os dados obtidos previamente pelo nosso grupo (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021; CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação), objetivamos verificar os efeitos de longo prazo decorrentes do tratamento com a imipramina e a metirapona durante a vida adulta e a adolescência.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos do tratamento com imipramina, um bloqueador de recaptação de serotonina e/ou noradrenalina, ou metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, em ratos adultos ou jovens na aquisição de medo condicionado, bem como na expressão e extinção destas respostas;
2. Avaliar os efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona em ratos adultos ou jovens na consolidação de medo condicionado, bem como na expressão e extinção destas respostas;
3. Avaliar os efeitos de longo prazo dos tratamentos com imipramina ou metirapona nas respostas condicionadas de medo em adultos e adolescentes;
4. Comparar a ativação de neurônios do mPFC e BLA em resposta aos tratamentos realizados e em decorrência da extinção do comportamento condicionado de medo em ratos jovens e adultos.

3 Material e métodos

3.1 Animais de experimentação

Durante a realização dos experimentos foram utilizados ratos da linhagem *Wistar Hannover* (N= 560). Foram adquiridas ratas prenhes primigestas provenientes do Biotério Central do *campus* Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As ratas foram mantidas aos pares até o nascimento das ninhadas em caixas micro isoladoras em *racks* ventiladas (medidas 41x34x16 cm), com livre acesso à ração comercial (Nuvital®) e à bebida. Após o nascimento, as ninhadas com a fêmea adulta e seus filhotes foram separadas em outro microisolador, permanecendo juntos até o desmame (21 dias de vida). Após o desmame, os animais foram alojados aos pares, mantendo-se nos microisoladores pares de machos ou de fêmeas, até o início dos protocolos experimentais aos 29 dias de vida. As fêmeas provenientes de cada ninhada foram utilizadas em outros projetos do laboratório. Os ratos foram acondicionados, de forma aleatória e de acordo com a idade. O biotério foi mantido em ciclo claro-escuro de 12h, com início do período claro às 6:30h e temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) controlada.

Os animais de cada caixa passaram sempre pelo mesmo protocolo experimental, ou seja, pertenciam ao mesmo grupo de experimentação.

O projeto foi ainda submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do *campus* Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, obtendo aprovação, sob protocolo nº: 2019.1.1451.59.6.

3.2 Delineamento experimental

Os experimentos comportamentais foram realizados em três diferentes frentes de trabalho executadas de forma independente e conduzidas paralelamente. Os procedimentos foram divididos em sessão de habituação, condicionamento, teste e quatro reexposições subsequentes ao contexto para avaliar a extinção da memória de medo condicionada e serão descritos detalhadamente adiante.

No *Estudo 1 (Fig. 1)* o objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona entre as sessões de habituação e condicionamento da memória de medo contextual em duas fases do desenvolvimento: durante a

adolescência (início dos procedimentos aos 29 dias de idade) e durante a vida adulta (início dos procedimentos aos 59 dias de idade). Os tratamentos seguiram o seguinte esquema: primeira injeção imediatamente após a habituação, segunda injeção 19 h antes do condicionamento e a terceira injeção 1 h antes do condicionamento para os animais tratados com imipramina ou 30 min antes do condicionamento para animais tratados com metirapona. O grupo controle recebeu 3 injeções de veículo em intervalo de tempo de acordo com o grupo imipramina. Em cada uma das idades, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: controle, imipramina ou metirapona. Uma parte dos animais, em cada um dos grupos foi eutanasiada 90 min após a sessão teste ou então 90 min após a última sessão de extinção. Os procedimentos para eutanásia e coleta de material para análise serão descritos adiante.

Figura 1 – Delineamento experimental do Estudo 1

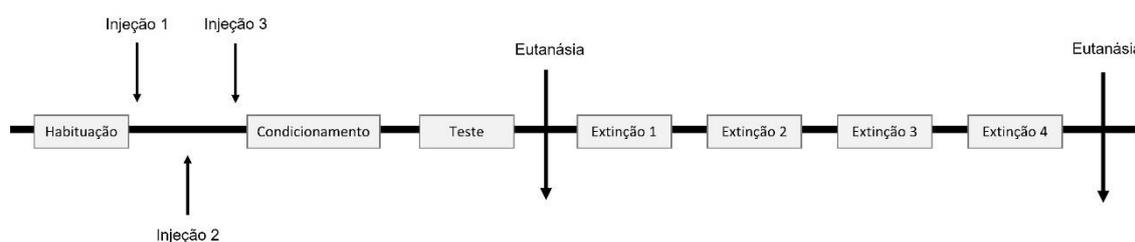


Figura 1 – Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Estudo 1. Fonte: autor.

No *Estudo 2* (Fig. 2) o objetivo foi avaliar os efeitos dos tratamentos com imipramina e metirapona entre o condicionamento e o teste, novamente em ambos os períodos do desenvolvimento já descritos. Foram administradas três doses dos fármacos no seguinte esquema: primeira injeção imediatamente após o condicionamento, segunda injeção 19 h antes do teste e a terceira injeção 1 h antes do teste para os animais tratados com imipramina ou 30 min antes do teste para animais tratados com metirapona. O grupo controle recebeu 3 injeções de veículo em intervalo de tempo de acordo com o grupo imipramina. Uma vez mais os animais foram divididos em três grupos experimentais em cada uma das idades: controle, imipramina ou metirapona. Uma parte dos animais, em cada um dos grupos foi eutanasiada 90 min após a sessão teste ou então 90 min após

a última sessão de extinção. Os procedimentos para eutanásia e coleta de material para análise serão descritos adiante.

Figura 2 – Delineamento experimental do Estudo 2

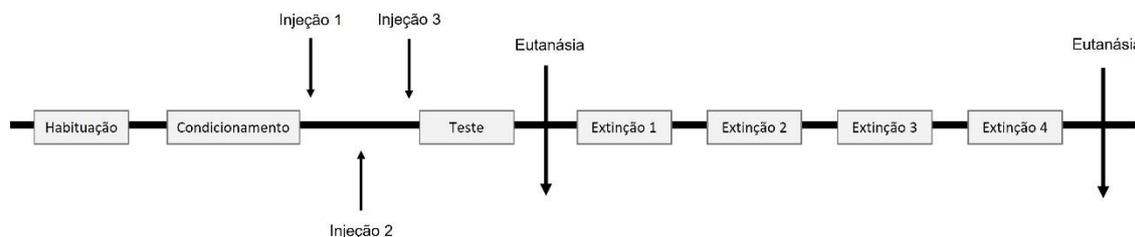


Figura 2 – Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Estudo 2. Fonte: autor.

No *Estudo 3* (**Fig. 3**) o objetivo foi avaliar os efeitos de longo prazo dos tratamentos com imipramina ou metirapona. Os tratamentos foram realizados durante a adolescência e a vida adulta. Para tanto, foram administradas três doses dos fármacos: a primeira injeção às 8 h da manhã, a segunda injeção às 13 h, e a terceira injeção às 8 h do dia seguinte. O grupo controle recebeu 3 injeções de veículo. Animais adolescentes iniciaram o tratamento farmacológico aos 29 dias de vida, animais adultos iniciaram o tratamento aos 59 dias de vida. Após o tratamento, os animais foram mantidos sem nenhuma manipulação no biotério do laboratório durante 20 dias, quando então iniciaram-se as sessões experimentais: habituação, condicionamento, teste e quatro extinções subsequentes. Todos os animais passaram pelo condicionamento 21 dias após a última injeção do esquema de tratamento. Assim como nos demais estudos, uma parte dos animais de cada grupo foi eutanasiada 90 min após a sessão teste ou 90 min após a última sessão de extinção.

Figura 3 – Delineamento experimental do Estudo 3

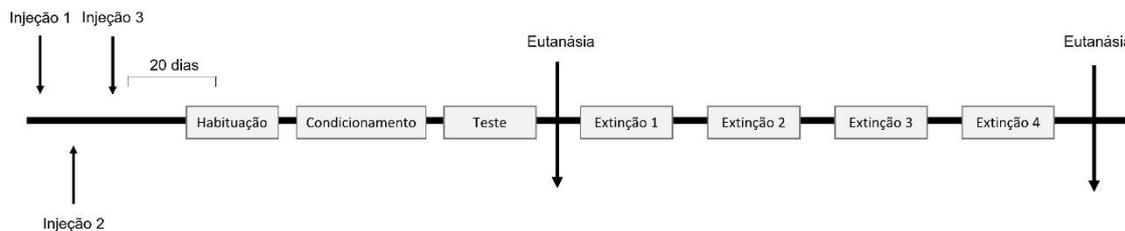


Figura 3 – Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Estudo 3. Fonte: autor.

3.3 Equipamentos, materiais, procedimentos e fármacos

3.3.1 Habituação, condicionamento, teste e extinção do medo condicionado ao contexto

Para as sessões de habituação, condicionamento, teste e extinção foi utilizada uma caixa de vai-e-vem (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, modelo EP-111). A caixa possui dois compartimentos de 48 x 27 x 30 cm, cujo piso é confeccionado em barras de aço inox, onde foram liberados choques com intensidade de 1 mA e frequência variáveis, de acordo com o programa determinado pelo experimentador em software próprio. A parede frontal é confeccionada em acrílico transparente, assim como a tampa. As paredes laterais são feitas de acrílico branco. A caixa é acoplada ao software Esquiva Ativa 3.8.9.1 (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto) e colocada dentro de uma caixa de isolamento acústico (Bonther Equipamentos, Ribeirão Preto), com sistema de exaustão próprio.

Em todas as sessões, os animais foram colocados individualmente na caixa de vai-e-vem. Após a realização de cada sessão, a caixa foi limpa com etanol 70% para evitar a presença de pistas olfatórias. O intervalo entre cada uma das sessões foi de 24h.

Na sessão de habituação os animais foram colocados na caixa experimental e puderam explorar livremente por 10 min, sem a apresentação de nenhum estímulo.

Para o condicionamento os animais foram colocados na caixa experimental, passaram por um novo período de habituação de 2 min de

duração. Após este período, foram iniciados os EI (choque nas patas). Os animais receberam um total de seis choques de intensidade de 1,0 mA e duração de 3 s com intervalos aleatórios, variando entre 30 e 90 s entre cada um. Ao final do último estímulo, os animais foram removidos da caixa experimental e retornaram ao biotério do laboratório por um período de 24 h.

Para a sessão teste e as sessões de extinção da memória de medo os animais foram reexpostos ao mesmo contexto do condicionamento, porém sem a apresentação do EI. A sessão teste e cada uma das sessões de extinção tiveram duração de 10 min cada uma.

Todos os procedimentos de habituação, condicionamento, teste e extinções foram registrados com uma câmera portátil GoPro Hero+® que foi acoplada ao teto de acrílico transparente da caixa. O registro do comportamento foi realizado durante o condicionamento (150 s antes do choque e os 30 s após cada um dos choques) e por 10 min nas sessões teste e extinções. A medida de análise do comportamento de medo foi o congelamento, definido com ausência total de movimentos, inclusive das vibrissas (FANSELOW, 1980). Em cada um dos grupos, metade dos animais foi eutanasiada após o teste e a outra metade após a última sessão de extinção.

3.3.2 Inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina por imipramina e da síntese de corticosterona por metirapona

Para a inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina os animais receberam três injeções de imipramina 15 mg/kg (dissolvida em salina 0,9%/etanol 5%, Sigma Aldrich), administrada por via intraperitoneal (i.p.; CAMPOS-CARDOSO et al., 2021).

Para a inibição da síntese de CORT, os animais receberam uma única injeção i.p. de metirapona 50 mg/kg (dissolvida em salina 0,9%/etanol 5%, Sigma Aldrich; CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação).

3.3.3 Procedimento de eutanásia e coleta dos tecidos

Noventa minutos após a sessão teste ou a última sessão de extinção, os animais foram profundamente anestesiados com Uretana 1,25 g/kg (dissolvida em água destilada, Sigma Aldrich) e perfundidos transcardialmente, utilizando-

se uma bomba peristáltica (Coler Parmer) com 200 mL de tampão fosfato de sódio (PBS; 0,1M, pH=7,4) seguida por 200 mL de solução paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB; 0,1M, pH=7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram delicadamente removidos da calota craniana e imersos em solução de paraformaldeído 4% a 4° C por 24 h. Após este período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PBS (0,01M) por 48h. Após o período de crioproteção, os encéfalos foram rapidamente congelados em isopentana a -78°C e armazenados a -20°C até o processamento histológico das amostras.

3.3.4 Processamento dos tecidos, imunoistoquímica e quantificação das células imunopositivas para c-Fos

Os encéfalos foram seccionados a -20°C em criostato (Leica Cryocut 1800, Leica Biosystems) em plano coronal a uma espessura de 40µm e armazenados em solução anticongelante (50% de PB 0,2 M, 30% de etilenoglicol e 20% de glicerol) a -20° C. Foram utilizadas as seguintes coordenadas: mPFC (3,72 a 2,52 mm) e BLA (-1,72 a -3,36 mm); de acordo com o atlas (PAXINOS; WATSON, 2007).

Para a visualização da proteína c-Fos no mPFC e no BLA foi realizado o seguinte procedimento de imunoistoquímica: os cortes foram lavados em PBS e incubados com solução de bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ 1% em PBS), seguido de solução bloqueio (solução PBS 0,1 M contendo albumina bovina a 1%) seguido de incubação do anticorpo primário anti-c-Fos obtido em coelho na diluição 1:1500 (sc-52, Santa Cruz Biotechnology) ou 1:3000 (ABE457, Sigma Aldrich) em solução de bloqueio contendo Triton X-100 (0,2%) por 16h. Após, os cortes passaram por três lavagens em PBS e novamente incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho na concentração 1:1000 (BA-1000, anticorpo biotilado, Vector) em solução de bloqueio contendo Triton X-100 (0,2%), durante 1 hora. As secções foram novamente lavadas e incubadas por 1 hora com o complexo de peroxidase avidina-biotina (reagentes A e B; Kit ABC Elite, Vectastain) em PBS 0,1 M, na concentração de 1:1000 cada, para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase biotilada. Após, os cortes foram novamente lavados em PBS 0,1 M e finalmente revelada por DAB-

níquel (Sigma Aldrich) acrescido de peróxido de hidrogênio 0,002% em PBS 0,1 M. As secções histológicas foram então distendidas em lâminas gelatinizadas, secas por 48 h à temperatura ambiente, desidratadas, diafanizadas com Xilol (Labsynth Produtos para Laboratório, Diadema) e cobertas com Permout (Merck, Alemanha) e lamínula. A presença de células imunopositivas para c-Fos foi identificada por um depósito preto (DAB-níquel). As fotomicrografias foram obtidas em um microscópio (DM5500B, Leica Microsystems ou BX61VS, Olympus) com uma câmera colorida acoplada com o auxílio de um *software* (LAS ou VS-ASW FL) com uma ampliação de 10X. Com o auxílio do *software* ImageJ as estruturas foram delimitadas e as células com marcação imunopositiva foram contadas manualmente. Foram fotografadas e quantificadas 5 secções bilaterais por animal, totalizando 10 replicatas e a foi utilizada a média de todas as replicatas como valor de comparação entre os animais.

3.3.5 Análise estatística

Para os efeitos do tempo e dos tratamentos realizamos uma ANOVA de medidas repetidas comparando os tempos de congelamento entre a habituação e o condicionamento, sendo os fatores *tempo* (habituação X condicionamento) e *tratamento* (veículo X imipramina X metirapona). Para a sessão teste, foi realizada uma ANOVA de uma via comparando-se os efeitos dos tratamentos. Para as sessões de extinção, foi realizada novamente uma ANOVA de medidas repetidas, sendo os fatores analisados *tempo* (extinção 1 X extinção 2 X extinção 3 X extinção 4) e *tratamento* (veículo X imipramina X metirapona). Para a análise de ativação neuronal foi realizada ANOVA de uma via. Tanto a ANOVA de uma via quanto a de medidas repetidas foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. O *software* GraphPad Prism 8.0® foi utilizado para as análises estatísticas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 Resultados

4.1 Efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona antes do condicionamento em ratos adolescentes e adultos

No *Estudo 1*, buscamos avaliar os efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona nas respostas condicionadas e na extinção do medo ao contexto em ratos adultos e adolescentes. Para tanto, realizamos o protocolo de tratamento entre a habituação e o condicionamento, conforme descrito no item 3.2 (**Fig. 1**). Os resultados *Estudo 1* estão representados na Figuras 4 a 8.

4.1.1 Em ratos adultos a metirapona diminui o congelamento durante o condicionamento e durante o teste e facilita a extinção da memória de medo, a imipramina diminui o congelamento apenas no teste

Ao analisarmos os resultados do *Estudo 1* em ratos adultos, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos (**Fig. 4A**) ao se comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 84) = 217$; $p < 0,05$]. Além disso, foram observados efeitos do *tratamento* [$F(2, 84) = 21,02$; $p < 0,05$] na habituação como também no condicionamento além de uma interação *tempo x tratamento* [$F(2, 84) = 20,71$; $p < 0,05$]. Ao analisarmos os resultados do teste (**Fig. 4B**), a ANOVA de um fator revelou que ambos os tratamentos com imipramina e metirapona reduziram o tempo de congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 114) = 14,39$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante o protocolo de extinção da memória condicionada (**Fig. 4C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos nos fatores *tempo* [*tempo* $F(2,291, 123,7) = 153,5$; $p < 0,05$] e *tratamento* [*tratamento* $F(2, 54) = 14,51$; $p < 0,05$], sem interação significativa entre os fatores [*tempo x tratamento* $F(6, 162) = 1,234$; $p = 0,2914$].

Figura 4 – A metirapona reduz os níveis de congelamento no condicionamento, no teste e na extinção da memória de medo contextual

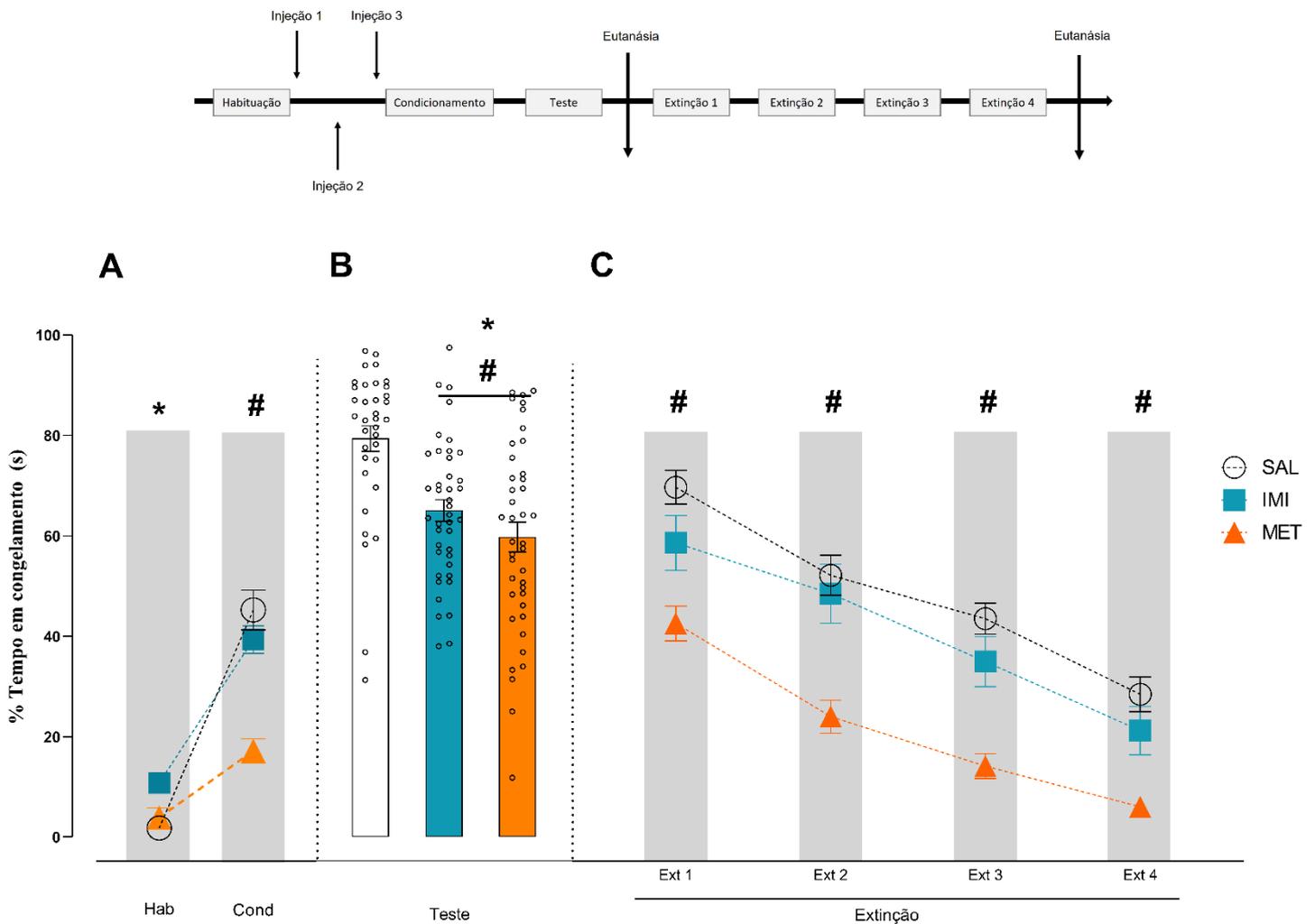


Figura 4 – O tratamento com imipramina aumenta o tempo de congelamento durante a habituação e com metirapona diminui durante o condicionamento (A). Durante o teste (B), ambos os tratamentos são capazes de diminuir o congelamento dos animais. Durante a extinção (C), o tratamento com metirapona diminui o congelamento, facilitando a extinção da memória de medo contextual. As barras e os símbolos nos gráficos representam a média (\pm EPM) da porcentagem de tempo em congelamento. Hab= habituação, Cond= condicionamento, SAL= tratamento veículo, IMI= tratamento com imipramina, MET= tratamento com metirapona. Os dados representados nos painéis A e C foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, enquanto para os dados representados no painel B utilizou-se a ANOVA de um fator, ambos seguidos pelo teste de Tukey. Foi considerado como significativo os valores de $p < 0,05$. Painel A, $n = 36-33$ por grupo; painel B, $n = 35-41$; painel C, $n = 18-20$ por grupo. * diferença significativa no grupo IMI quando comparado ao controle, # diferença significativa no grupo MET quando comparado ao controle. Fonte: autor.

4.1.2 *Os tratamentos com imipramina e metirapona afetam a expressão da proteína c-Fos em neurônios do mPFC e do BLA*

Em seguida ao procedimento experimental, averiguarmos a ativação de neurônios após o teste (**Fig. 5**) através da imunomarcação da proteína c-Fos. A ANOVA de um fator revelou efeitos da imipramina diminuindo a ativação de neurônios do córtex na área PL (Fig 3A) [$F(2,3) = 21,44$; $p < 0,05$], na área IL (**Fig. 5B**) [$F(2,3) = 35,65$; $p < 0,05$] e da metirapona diminuindo esta ativação de neurônios no BLA (**Fig. 5C**) [$F(2,3) = 12,14$; $p < 0,05$].

Figura 5 – Efeitos dos tratamentos com imipramina ou metirapona na ativação de neurônios do mPFC e do BLA durante o teste da memória condicionada

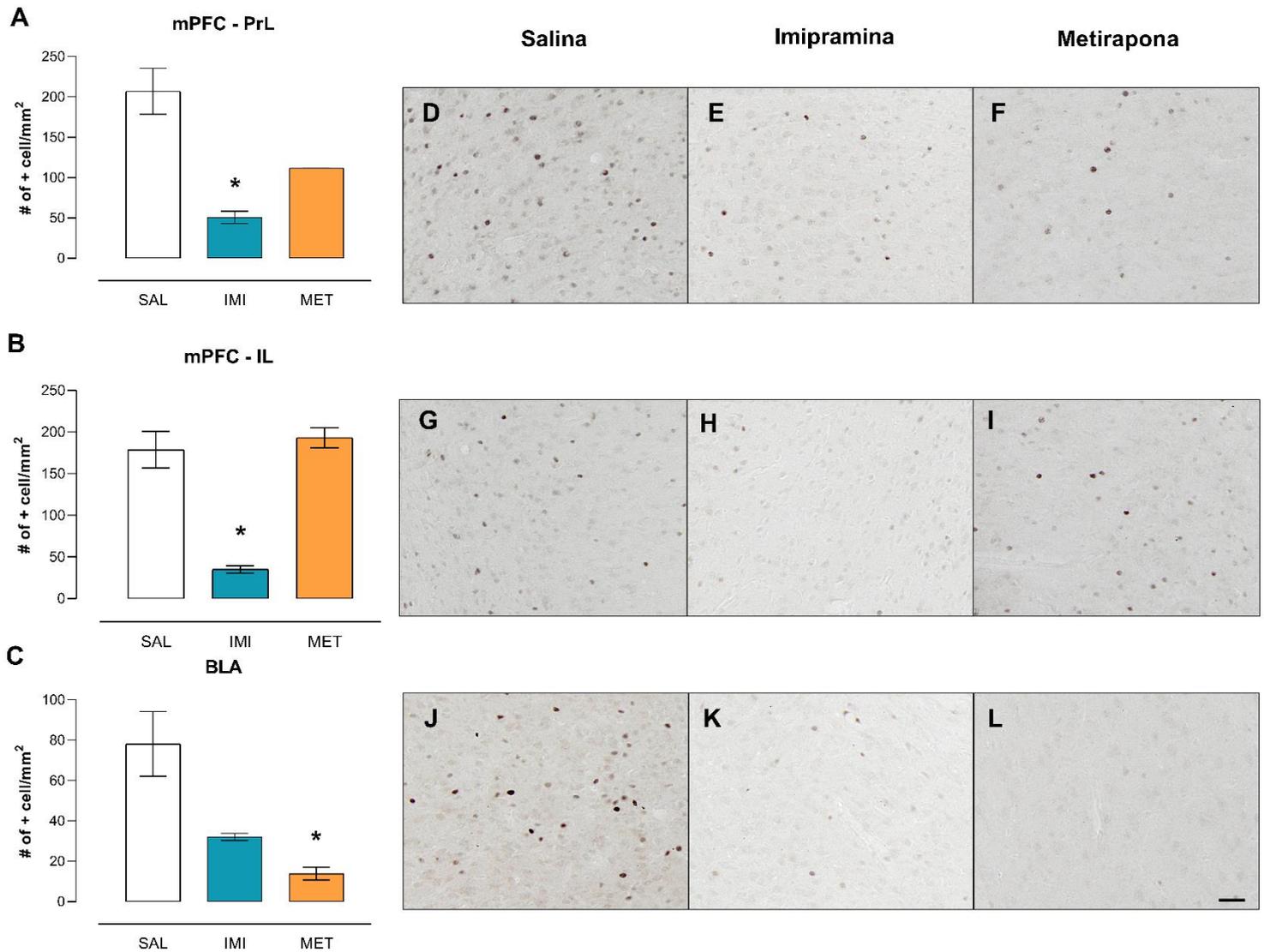


Figura 5 – O tratamento com imipramina diminuiu o número de células positivas para a c-Fos durante o teste da memória condicionada na área PL (A) e IL (B). Também durante o teste, o tratamento com a metirapona diminuiu a ativação de neurônios do BLA (C). Fotomicrografias representativas do mPFC PL (D-F), do mPFC IL (G-I) e do BLA (J-L). As barras nos gráficos representam a média (\pm EPM) de células positivas para a imunomarcagem da proteína c-Fos. SAL= tratamento veículo, IMI= tratamento com imipramina, MET= tratamento com metirapona. A barra de escala em L representa o valor de 100 μ m. Foi realizado o teste ANOVA de um fator, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. n= 2 por grupo. * diferença significativa quando comparado ao controle. Fonte: autor.

4.1.3 Em ratos adolescentes a imipramina aumenta o congelamento afetando a extinção da memória de medo contextual

Ao analisarmos os resultados obtidos com os animais adolescentes (**Fig. 6**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos similares aos obtidos em adultos durante o condicionamento (**Fig. 6A**). Observamos efeitos ao se comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 91) = 69,09$; $p < 0,05$]. Além disso, foram observados efeitos do *tratamento* [$F(2, 91) = 5,612$; $p < 0,05$] na habituação como também no condicionamento, sem interação *tempo x tratamento* [$F(2, 91) = 2,406$; $p = 0,0959$]. Diferentemente de adultos, ao analisarmos os resultados do teste (**Fig. 6B**), a ANOVA de um fator revelou que apenas o tratamento com metirapona reduziu o tempo de congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 109) = 17,55$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante extinção da memória condicionada (**Fig. 6C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos nos fatores tempo [*tempo* $F(2,202, 118,9) = 68,04$; $p < 0,05$] e tratamento [*tratamento* $F(2, 54) = 17,29$; $p < 0,05$], sem interação entre os fatores [*tempo x tratamento* $F(6, 162) = 0,8178$; $p = 0,5576$].

Figura 6 – Apenas a metirapona diminui o congelamento durante o teste, a imipramina aumenta o tempo de congelamento durante a extinção

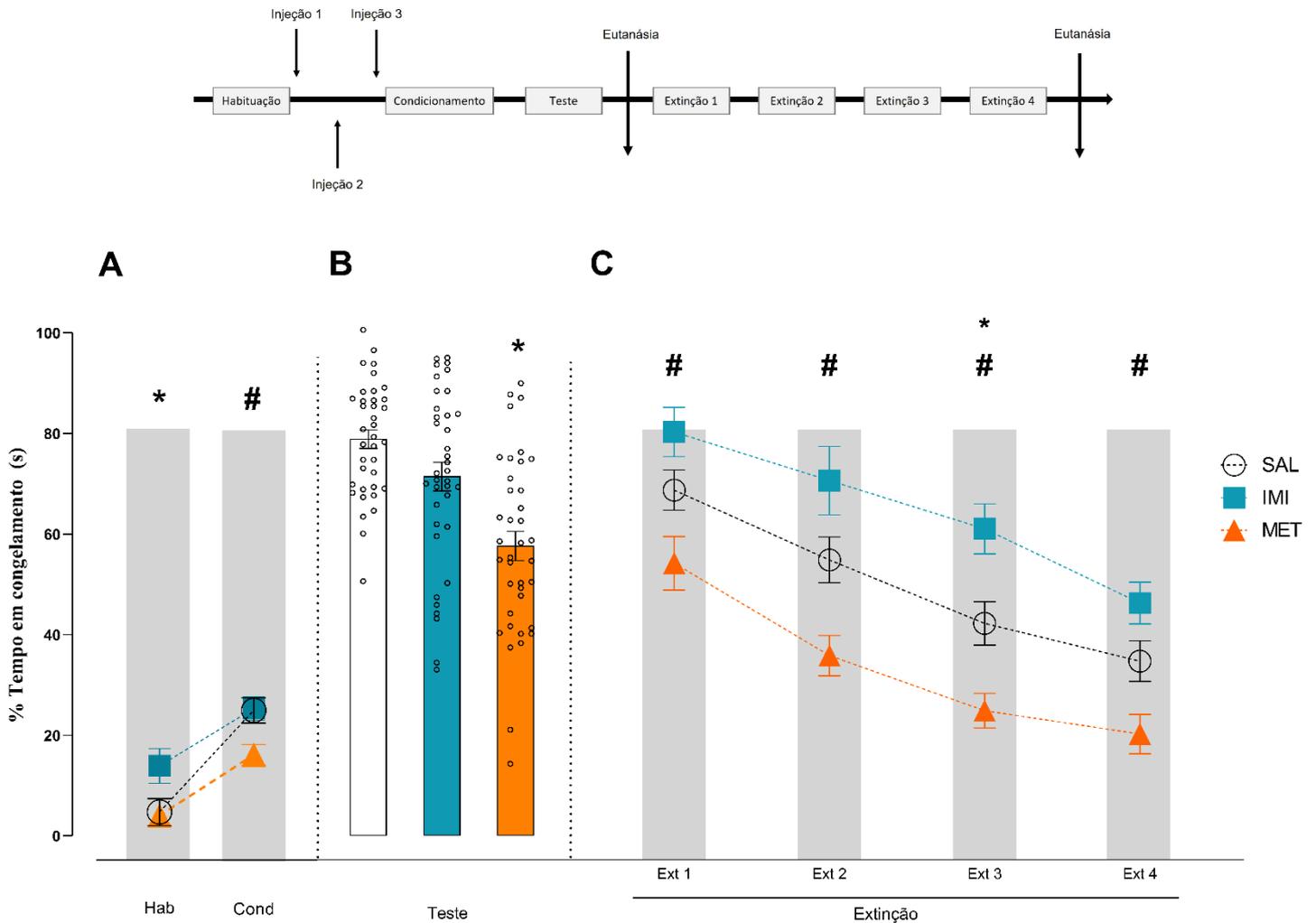


Figura 6 – O tratamento com imipramina aumenta o tempo de congelamento durante a habituação e com metirapona diminui durante o condicionamento (A). Durante o teste, a metirapona diminui o tempo em congelamento dos animais (B). Durante a extinção (C), a metirapona diminui o congelamento, facilitando a extinção da memória de medo contextual, a imipramina aumenta o tempo de congelamento. Demais especificações conforme a Figura 4. Painel A, n= 31-32 por grupo; painel B, n= 35-41; painel C, n= 17-21 por grupo. Fonte: autor.

4.1.4 *Em adolescentes, o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL durante o teste e a extinção da memória condicionada*

Assim como para os adultos, em seguida ao protocolo experimental, averiguarmos a ativação de neurônios após o teste (**Fig. 7**) através da expressão da proteína c-Fos. A ANOVA de um fator revelou efeitos da metirapona aumentando a ativação de neurônios do córtex na área PL (**Fig. 7A**) [$F(2, 3) = 11,26$; $p < 0,05$] em comparação aos animais tratados com imipramina, sem diferença com o controle. Na área IL, a metirapona aumentou a ativação dos neurônios em comparação ao controle (**Fig. 7B**) [$F(2, 3) = 29,32$; $p < 0,05$]. Já no BLA, não foram encontradas diferenças na ANOVA (**Fig. 7C**) [$F(2, 3) = 1,065$; $p = 0,4473$].

Figura 7 – Em adolescentes, a imipramina não afeta a ativação de neurônios do mPFC, a metirapona aumenta a ativação nesta mesma região apresentar efeitos no BLA

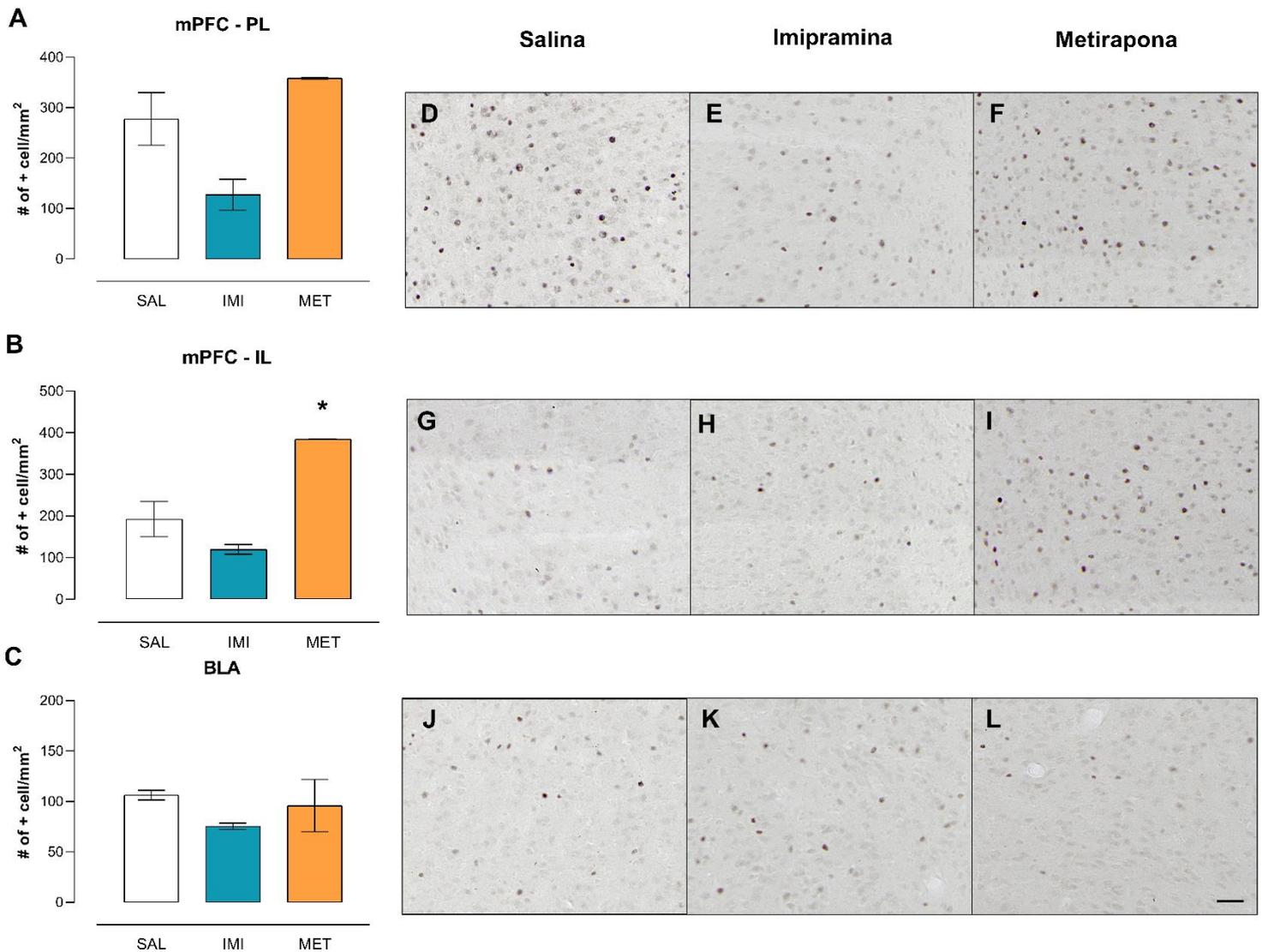


Figura 7 – O tratamento com imipramina ou metirapona não alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL em comparação ao controle (A). No mPFC IL a metirapona aumentou a ativação dos neurônios durante o teste da memória condicionada (B). Não há diferenças na ativação de neurônios do BLA em resposta aos tratamentos com imipramina ou metirapona (C). Demais especificações conforme a Figura 5. n= 2 por grupo. Fonte: autor.

Após o teste, parte dos animais passaram pelo protocolo de extinção da memória condicionada. Nesta situação observamos mais uma vez que o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios no mPFC IL (**Fig. 8B**) [$F(2, 3) = 21,61$; $p < 0,05$]. Não foram observadas diferenças devido ao tratamento na área PL (**Fig. 8A**) [$F(2, 3) = 4,041$; $p = 0,1408$] ou no BLA (**Fig. 8C**) [$F(2, 3) = 3,205$; $p = 0,18$].

Figura 8 – Durante a extinção da memória condicionada, a metirapona aumenta a ativação de neurônios no mPFC IL

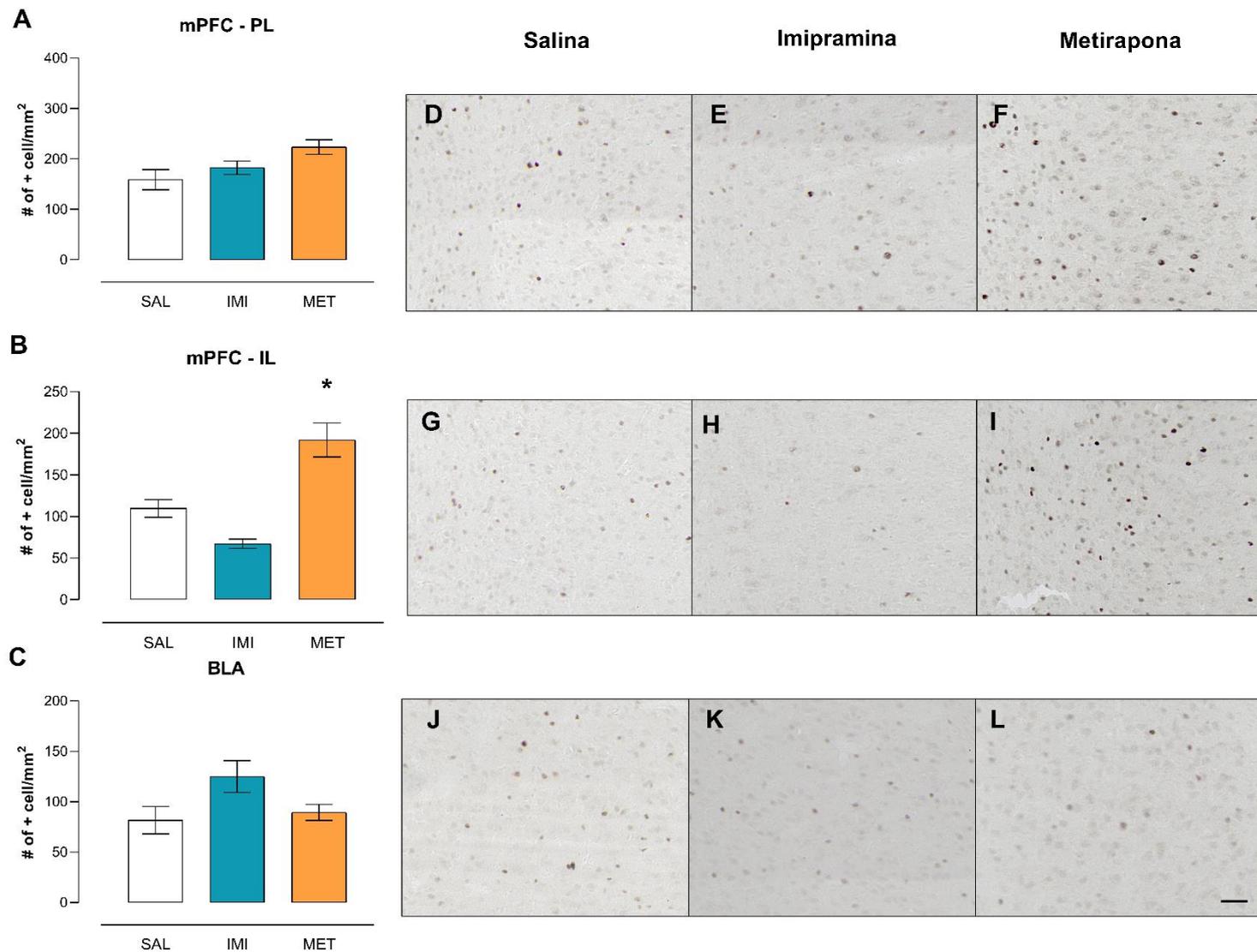


Figura 8 – O tratamento com imipramina ou metirapona não alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL em comparação ao controle (A). No mPFC IL a metirapona aumentou a ativação dos neurônios durante o teste da memória condicionada (B). Não há diferenças na ativação de neurônios do BLA em resposta aos tratamentos com imipramina ou metirapona (C). Demais especificações conforme a Figura 5. n= 2 por grupo. Fonte: autor.

4.2 Efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona após o condicionamento em ratos adolescentes e adultos

No *Estudo 2*, buscamos avaliar os efeitos do tratamento com imipramina ou metirapona nas respostas condicionadas e na extinção do medo ao contexto em ratos adultos e adolescentes. Diferentemente do *Estudo 1*, neste estudo o protocolo de tratamento com imipramina ou metirapona foi realizado após o condicionamento e antes do teste, conforme descrição no item 3.2 (**Fig. 2**). Os resultados do *Estudo 2* estão representados nas Figuras 9 a 14.

4.2.1 Metirapona e imipramina não têm efeito na extinção da memória de medo contextual em ratos adultos

Ao analisarmos os resultados obtidos de acordo com o delineamento do *Estudo 2*, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos (**Fig. 9A**) apenas na comparação entre o tempo de congelamento durante a habituação e o condicionamento [*tempo* $F(1, 86) = 426,8$; $p < 0,05$]. Não foram observados efeitos do *tratamento* [$F(2, 86) = 1,241$; $p = 0,2941$] e nem na interação *tempo x tratamento* [$F(2, 86) = 1,027$; $p = 0,3624$]. Ao analisarmos os resultados do teste (**Fig. 9B**), a ANOVA de um fator revelou que apenas o tratamento com metirapona reduziu o tempo de congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 91) = 33,02$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante o protocolo de extinção (**Fig. 9C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito apenas no fator tempo [*tempo* $F(2, 235, 80,44) = 68,17$; $p < 0,05$]. Para os fatores *tratamento* [*tratamento* $F(2, 36) = 0,05065$; $p = 0,9507$] e a interação entre os fatores *tempo x tratamento* [$F(6, 108) = 2,106$; $p = 0,0583$] não foram encontradas diferenças significativas.

Figura 9 – A metirapona diminui o congelamento durante o teste e ambos os tratamentos com imipramina ou metirapona não têm efeito durante a extinção

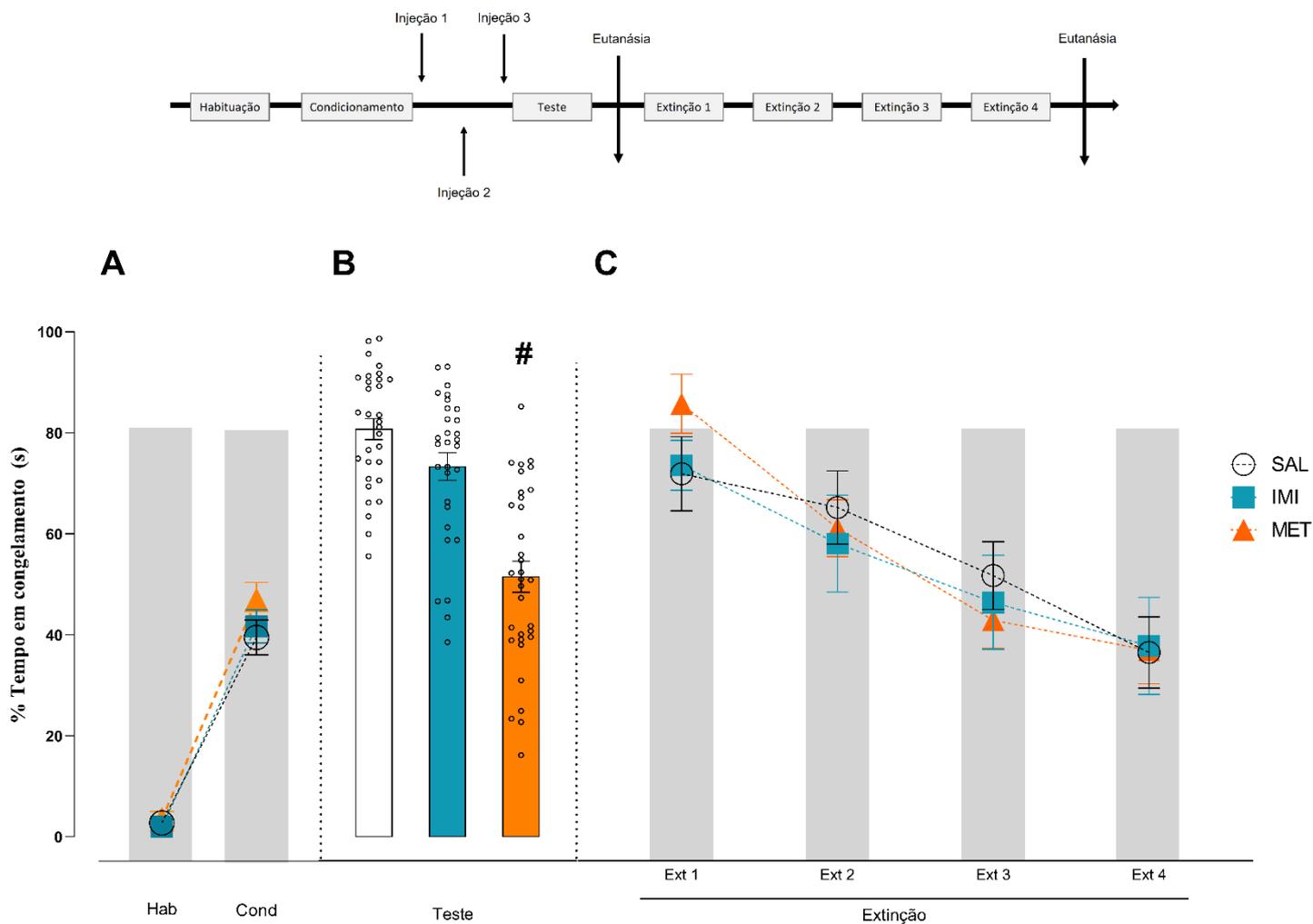


Figura 9 – Tempo de congelamento durante a habituação e o condicionamento (A). Durante o teste, a metirapona diminui o tempo em congelamento dos animais (B). Durante a extinção a imipramina e a metirapona não afetam o tempo de congelamento em comparação ao controle (C). Demais especificações conforme a Figura 4. Painel A, n= 29-31 por grupo; painel B, n= 30-33; painel C, n= 12-14 por grupo. Fonte: autor.

4.2.2 *Efeitos dos tratamentos com imipramina ou metirapona após o condicionamento na ativação de neurônios do mPFC e BLA*

Para verificar o efeito dos tratamentos na ativação neuronal, foi realizada a quantificação das imunomarcações da proteína c-Fos em resposta ao protocolo experimental. A ANOVA não revelou efeitos dos tratamentos em nenhuma das regiões analisadas: PL (**Fig. 10A**) [$F(2, 3) = 2,068$; $p = 0,2726$], IL (**Fig. 10B**) [$F(2, 3) = 1,063$; $p = 0,4477$] e BLA (**Fig. 10C**) [$F(2, 3) = 2,084$; $p = 0,2708$].

Figura 10 – Não há diferenças na ativação de neurônios no mPFC e no BLA durante o teste em resposta aos tratamentos com imipramina ou metirapona

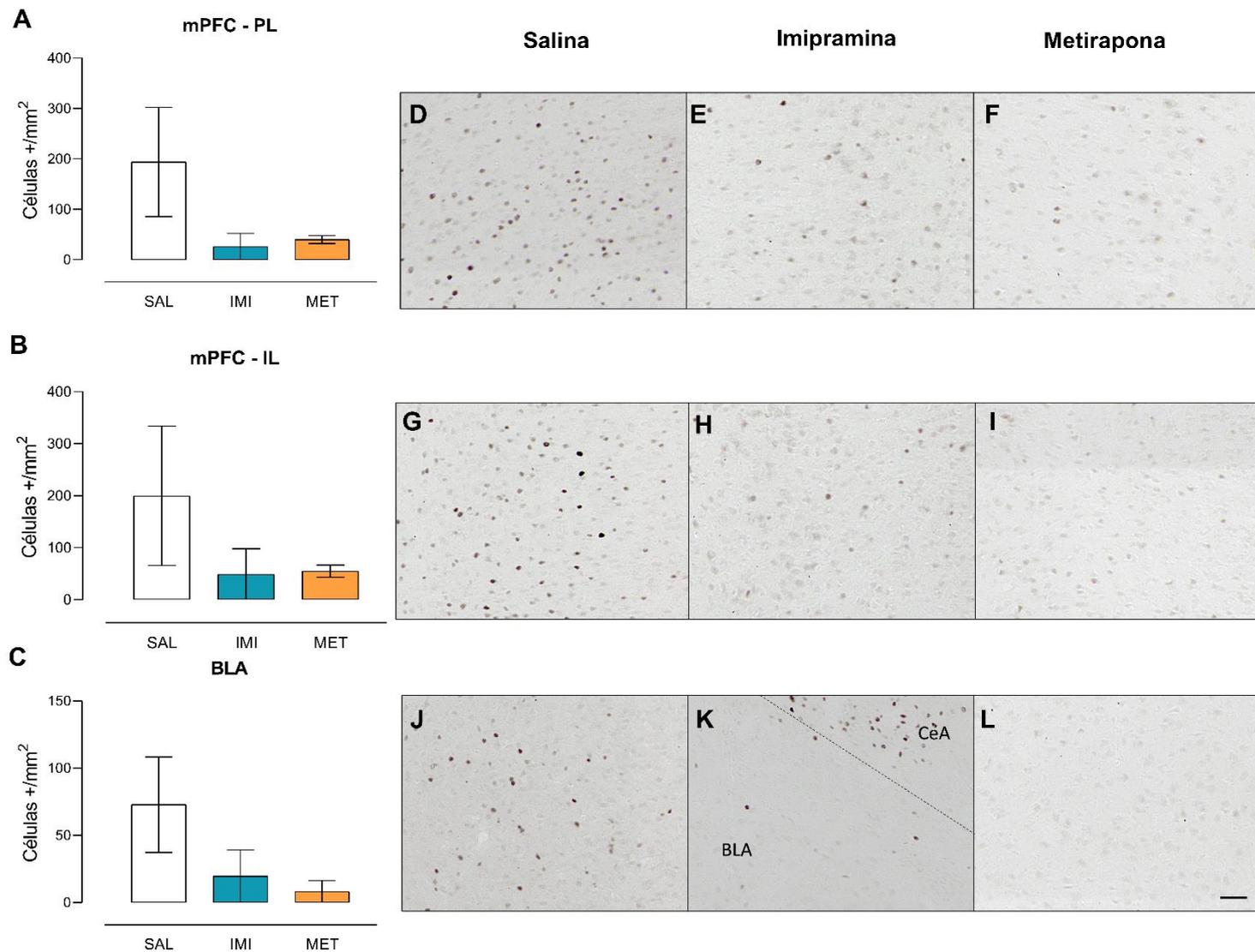


Figura 10 – Não há diferença na média de células imunopositivas para a c-Fos no mPFC PL (A) e IL (B), e BLA (C). Demais especificações conforme a Figura 5. n= 2 por grupo. Fonte: autor.

Após o teste e o protocolo de extinção, mais uma vez foi verificada a ativação neuronal através da imunomarcação da proteína c-Fos. Diferentemente do que observamos no teste, após a extinção do medo condicionado, o tratamento com a metirapona aumentou a expressão de c-Fos no mPFC IL (**Fig. 11B**) [$F(2, 9) = 12,55; p < 0,05$]. Não foram observadas diferenças devido aos tratamentos em comparação ao controle na ativação dos neurônios da área PL (**Fig. 11A**) [$F(2, 9) = 1,565; p = 0,2611$] ou no BLA (**Fig. 11C**) [$F(2, 9) = 0,6782; p = 0,5317$].

Figura 11 – Durante a extinção do medo ao contexto, o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL

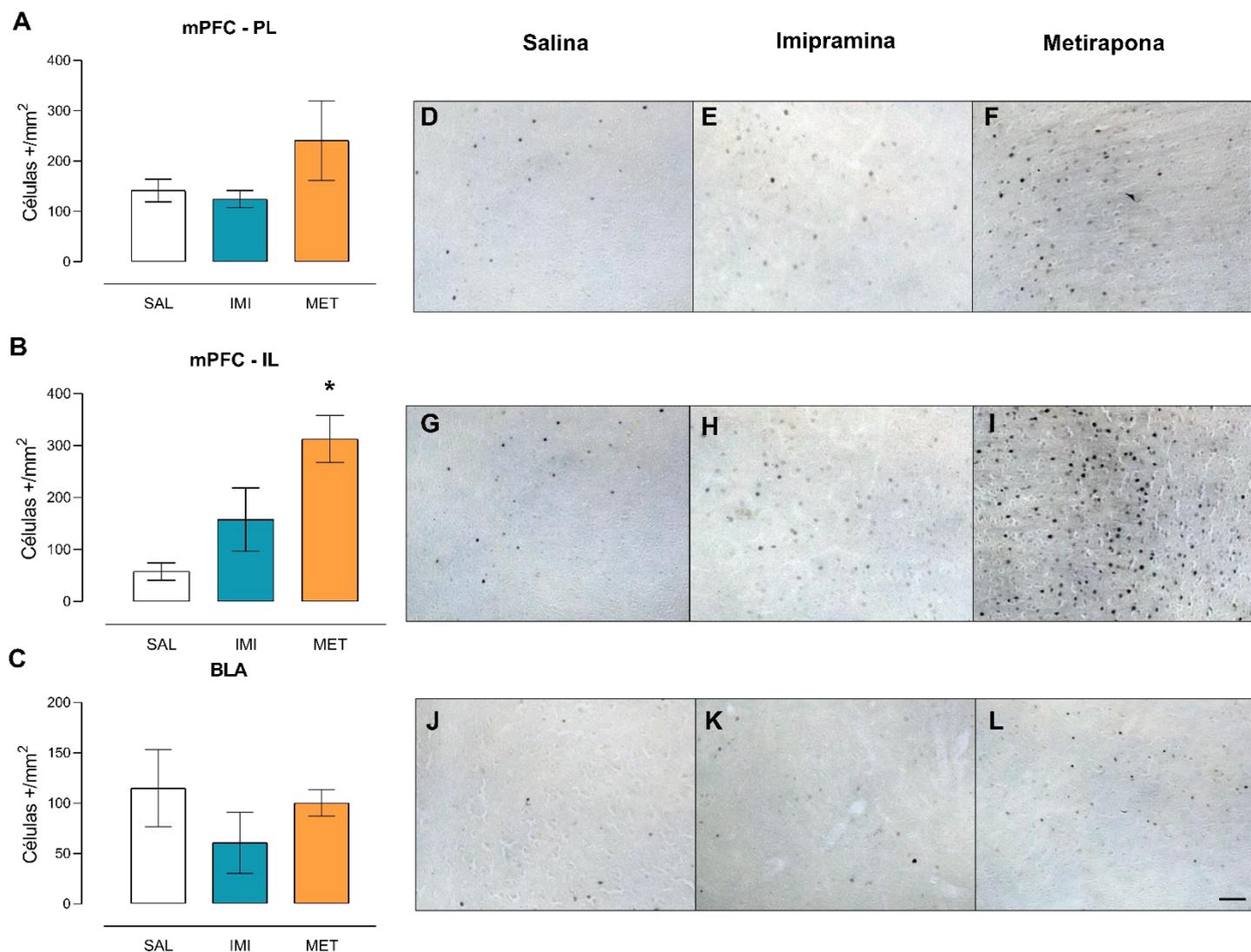


Figura 11 – Média de células imunopositivas para c-Fos na área PL (A), IL (B) e no BLA (C). O tratamento com metirapona aumenta a ativação da área IL durante a extinção da memória condicionada. Demais especificações conforme a Figura 5. A barra de escala em L representa o valor de 200μm. n= 3-5 por grupo.

* diferença significativa quando comparado ao controle. Fonte: autor.

4.2.3 *Em ratos adolescentes a imipramina e a metirapona diminuem o congelamento durante o teste, porém apenas a imipramina facilita a extinção da memória condicionada*

Ao analisarmos os resultados obtidos em adolescentes no *Estudo 2*, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos ao se comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 68) = 138,3$; $p < 0,05$] (**Fig. 12A**). Por outro lado, assim como para adultos, não foram observados efeitos do *tratamento* [$F(2, 68) = 1,574$; $p = 0,2147$] assim como na interação *tempo x tratamento* [$F(2, 68) = 0,3689$; $p = 0,6829$]. Em relação aos resultados obtidos com os dados do teste (**Fig. 12B**), a ANOVA revelou que os tratamentos com imipramina ou metirapona foram capazes de reduzir o tempo de congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 73) = 23,18$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante o procedimento de extinção da memória de medo contextual (**Fig. 12C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos nos fatores *tempo* [$F(2,517, 88,10) = 37,44$; $p < 0,05$] e *tratamento* [$F(2, 35) = 12,83$; $p < 0,05$], sem interação entre os fatores *tempo x tratamento* [$F(6, 105) = 0,7791$; $p = 0,5882$].

Figura 12 – De forma diferente do que ocorre em adultos, a imipramina facilita a extinção da memória condicionada em animais adolescentes

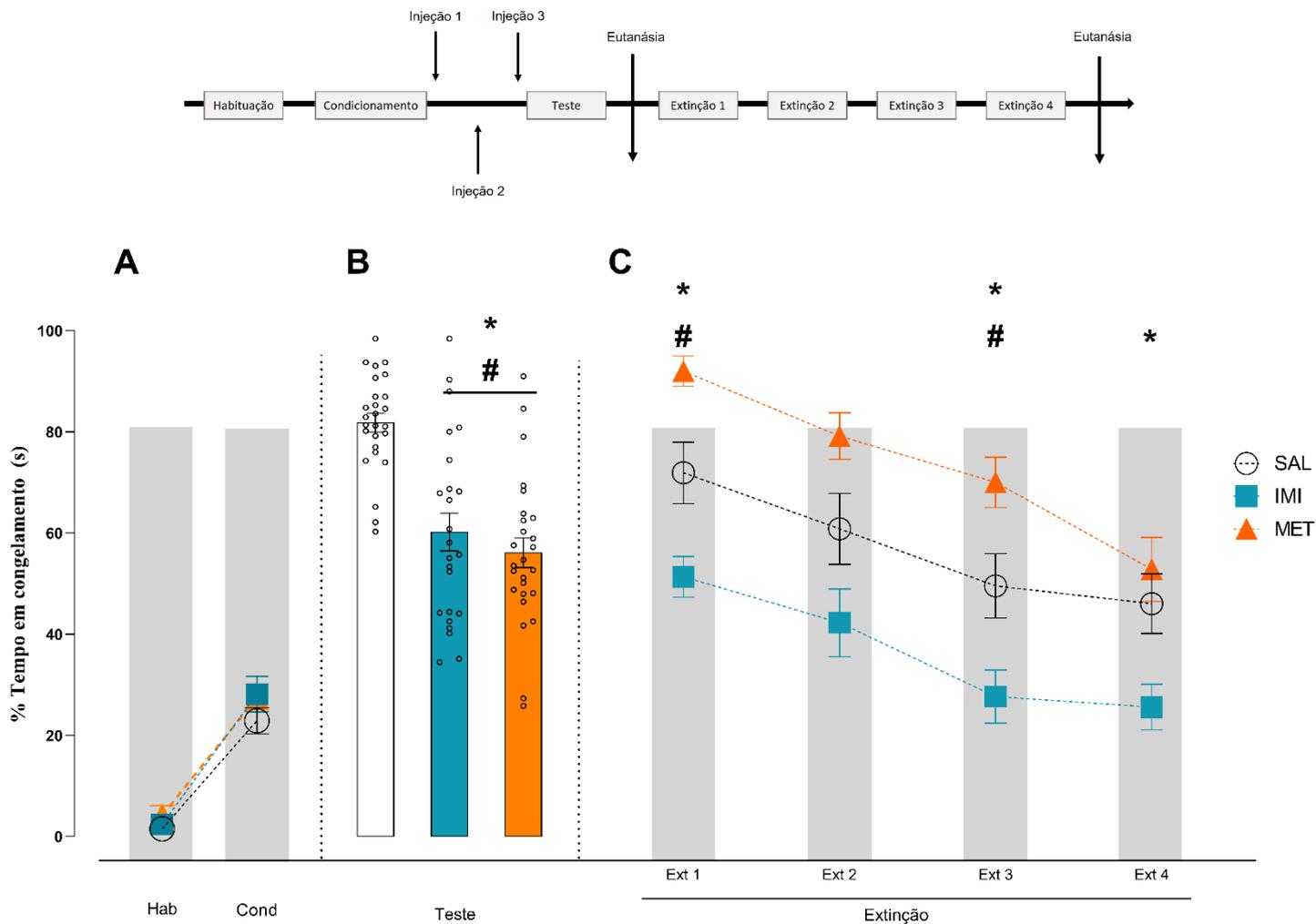


Figura 12 – Tempo de congelamento durante a habituação e o condicionamento (A). Durante o teste, a imipramina e a metirapona diminuem o tempo em congelamento dos animais (B). Durante a extinção a metirapona não afeta o tempo de congelamento em comparação ao controle, a imipramina diminui o tempo de congelamento, facilitando a extinção da memória de medo (C). Demais especificações conforme a Figura 4. Painel A, n= 29-31 por grupo; painel B, n= 30-33; painel C, n= 12-14 por grupo. Fonte: autor.

4.2.4 *Em adolescentes, o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL durante o teste e do mPFC PL e IL durante a extinção da memória condicionada*

Novamente, após o teste, verificamos a ativação de neurônios através da expressão da proteína c-Fos. A ANOVA de um fator não encontrou efeitos da imipramina ou da metirapona na ativação de neurônios do córtex na área PL (**Fig. 13A**) [$F(2, 3) = 3,062$; $p=0,1885$]. Na área IL, a metirapona aumentou a ativação dos neurônios em comparação ao controle (**Fig. 13B**) [$F(2, 3) = 50,86$; $p<0,05$]. Já no BLA assim como no PL, não foram encontradas diferenças na ANOVA (**Fig. 13C**) [$F(2, 3) = 5,297$; $p=0,1037$].

Figura 13 – A metirapona aumenta a ativação de neurônios do mPFC IL durante o teste

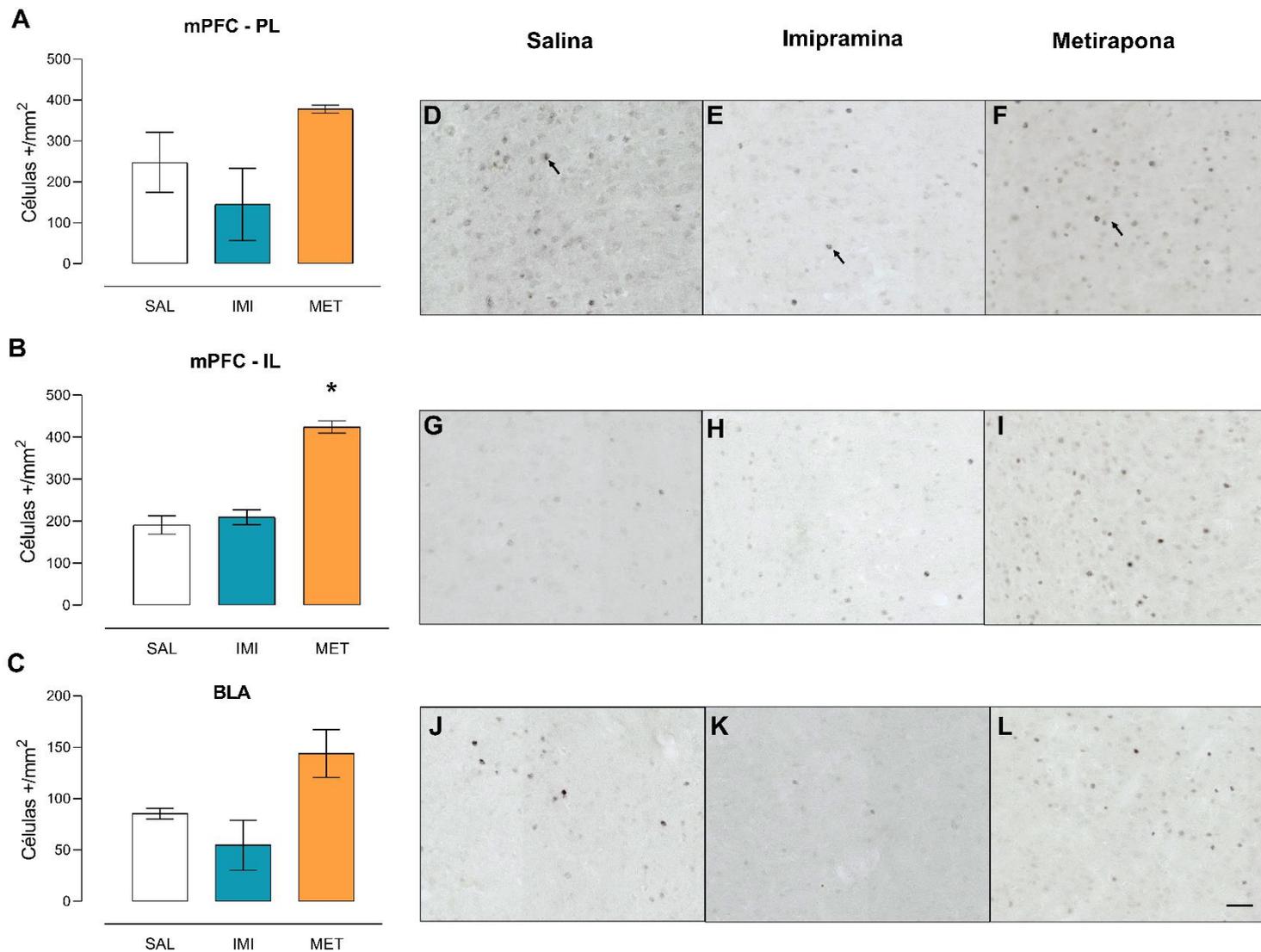


Figura 13 – O tratamento com imipramina ou metirapona não alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL em comparação ao controle (A). No mPFC IL a metirapona aumentou a ativação dos neurônios durante o teste da memória condicionada (B). Não há diferenças na ativação de neurônios do BLA em resposta aos tratamentos com imipramina ou metirapona (C). Demais especificações conforme a Figura 5. n= 2 por grupo. Fonte: autor.

Assim como ocorreu para os animais adultos, após o teste parte dos animais passaram pelo protocolo de extinção da memória condicionada. Nesta situação observamos mais uma vez que o tratamento com metirapona aumenta a ativação de neurônios no mPFC IL (**Fig. 14B**) [$F(2, 3) = 317,2; p < 0,05$], assim como também na área PL (**Fig. 14A**) [$F(2, 3) = 10,0; p < 0,05$]. Não foram observadas diferenças na ativação dos neurônios no BLA (**Fig. 14C**) [$F(2, 3) = 1,332; p = 0,3874$].

Figura 14 – Durante a extinção da memória condicionada, a metirapona aumenta a ativação de neurônios no mPFC PL e IL

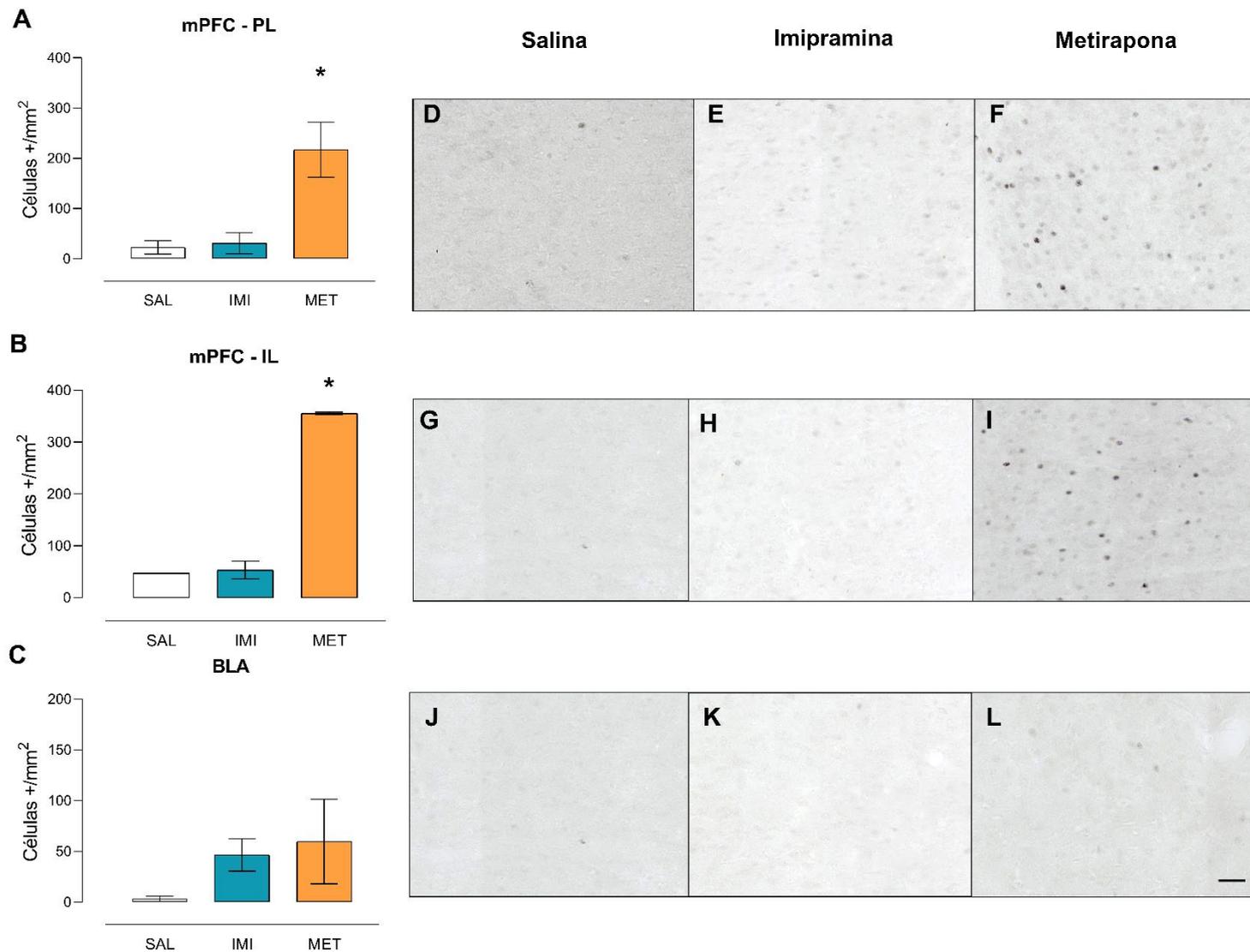


Figura 14 – O tratamento metirapona alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL e IL em comparação ao controle (A-B). Não há diferenças na ativação de neurônios do BLA em resposta aos tratamentos com imipramina ou metirapona (C). Demais especificações conforme a Figura 5. n= 2 por grupo. Fonte: autor.

4.3 Efeitos de longo prazo do tratamento com imipramina ou metirapona em ratos adolescentes e adultos

No *Estudo 3*, buscamos avaliar os efeitos de longa duração após o protocolo de tratamento com imipramina ou metirapona nas respostas condicionadas e na extinção do medo ao contexto em ratos adultos e adolescentes. Neste caso, conforme descrito no item 3.2 (**Fig. 3**) os animais receberam os tratamentos e após 20 dias, passaram pelo procedimento de habituação, para que assim, todos passassem pelo condicionamento 21 dias após a última injeção do esquema. Os resultados do *Estudo 3* estão representados na Figuras 15 a 18.

4.3.1 O tratamento com imipramina apresenta efeitos de longa duração em adultos, diminuindo o congelamento no condicionamento e no teste, a metirapona não afeta as respostas comportamentais

Ao analisarmos os resultados obtidos de acordo com o delineamento do *Estudo 3*, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos (**Fig. 15A**) ao se comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 64) = 555$; $p < 0,05$]. Além disso, foram observados efeitos do *tratamento* [$F(2, 64) = 11,23$; $p < 0,05$] na habituação como também no condicionamento além de uma interação *tempo x tratamento* [$F(2, 64) = 10,91$; $p < 0,05$]. Ao analisarmos os resultados do teste (**Fig. 15B**), a ANOVA de um fator revelou que o tratamento com imipramina reduziu o tempo de congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 65) = 6,28$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante o protocolo de extinção (**Fig. 15C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos apenas no fator tempo [*tempo* $F(2, 18, 65, 4) = 92,29$; $p < 0,05$]. Não houve diferença observada no fator tratamento [*tratamento* $F(2, 30) = 0,9514$; $p = 0,3975$] e na interação entre os fatores [*tempo x tratamento* $F(6, 90) = 1,465$; $p = 0,1991$].

Figura 15 – O tratamento com imipramina diminui o congelamento no condicionamento e no teste, sem afetar a extinção

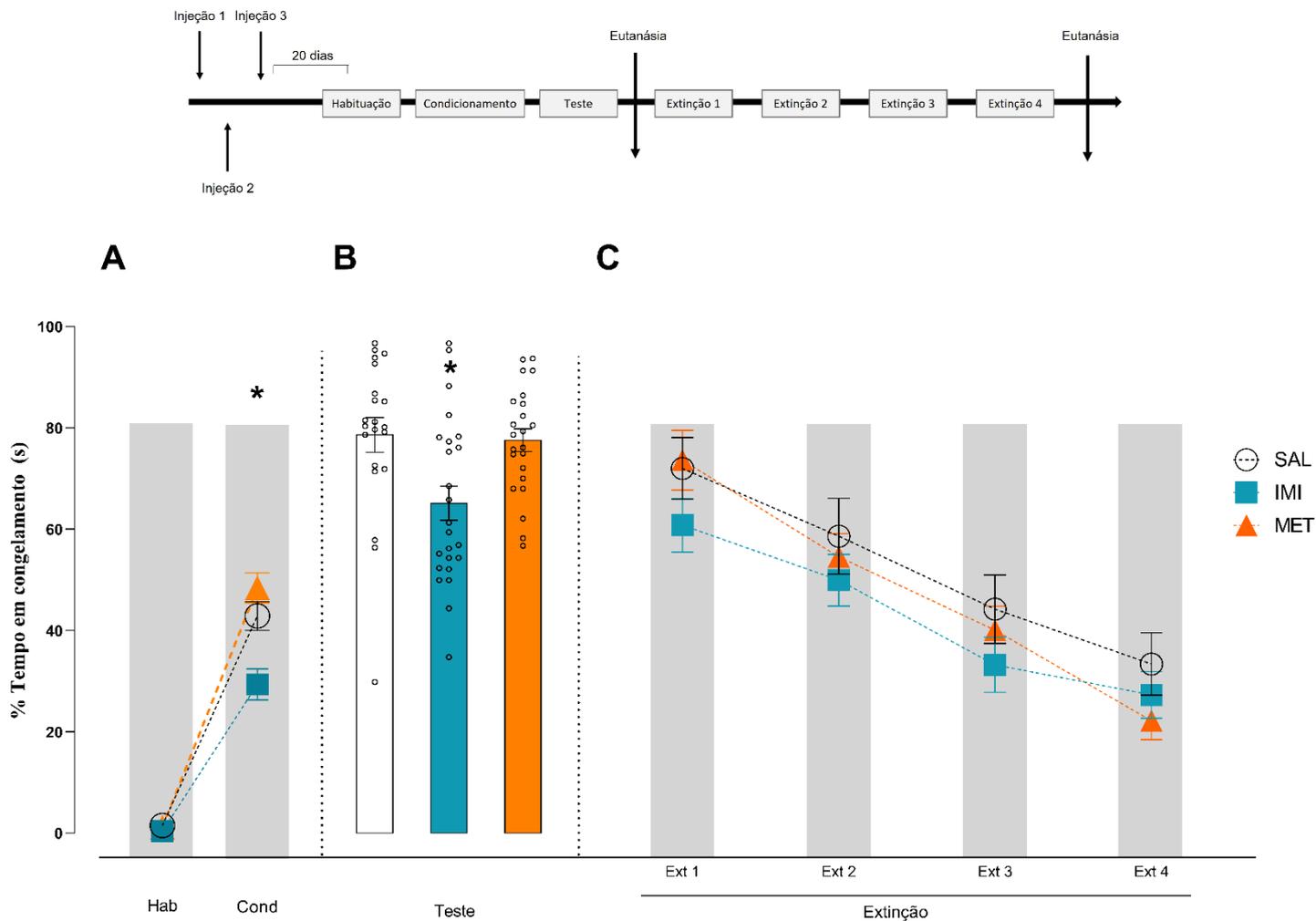


Figura 15 – Tempo de congelamento durante a habituação e o condicionamento (A). O tratamento prévio com o imipramina foi capaz de diminuir o tempo de congelamento durante o condicionamento. Durante o teste, apenas a imipramina diminui o tempo de congelamento (B). Durante a extinção os tratamentos não alteram o tempo de congelamento, em comparação aos animais controle (C). Demais especificações conforme a Figura 4. Painel A, n= 21-24 por grupo; painel B, n= 21-24; painel C, n= 10-12 por grupo. Fonte: autor.

4.3.2 *Em ratos adolescentes, o tratamento com metirapona apresenta efeitos de longo prazo, diminuindo o congelamento durante o teste e facilitando a extinção da memória de medo contextual*

De forma diferente do que foi observado em adultos, em adolescentes os efeitos de longo prazo foram observados apenas nos animais tratados com metirapona. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos ao se comparar a habituação com o condicionamento [*tempo* $F(1, 69) = 325,8$; $p < 0,05$]. Não foram observados, porém, efeitos do *tratamento* [$F(2, 69) = 0,4237$; $p = 0,6563$] como também não observamos interação *tempo x tratamento* [$F(2, 69) = 0,6730$; $p = 0,5135$], (**Fig. 16A**). Ao analisarmos os resultados do teste (**Fig. 16B**), a ANOVA de um fator revelou efeito da metirapona reduzindo o tempo em congelamento dispendido pelos animais [$F(2, 79) = 18,37$; $p < 0,05$]. Analisando os dados de congelamento durante o protocolo de extinção (**Fig. 16C**), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos nos fatores tempo [*tempo* $F(2,764, 99,51) = 68,7$; $p < 0,05$] e tratamento [*tratamento* $F(2, 36) = 5,112$; $p < 0,05$], sem nenhuma interação entre os fatores [*tempo x tratamento* $F(6, 108) = 0,7149$; $p = 0,6383$].

Figura 16 – O tratamento prévio como metirapona apresenta efeitos de longa duração, reduzindo o tempo de congelamento no teste e facilitando a extinção da memória de medo

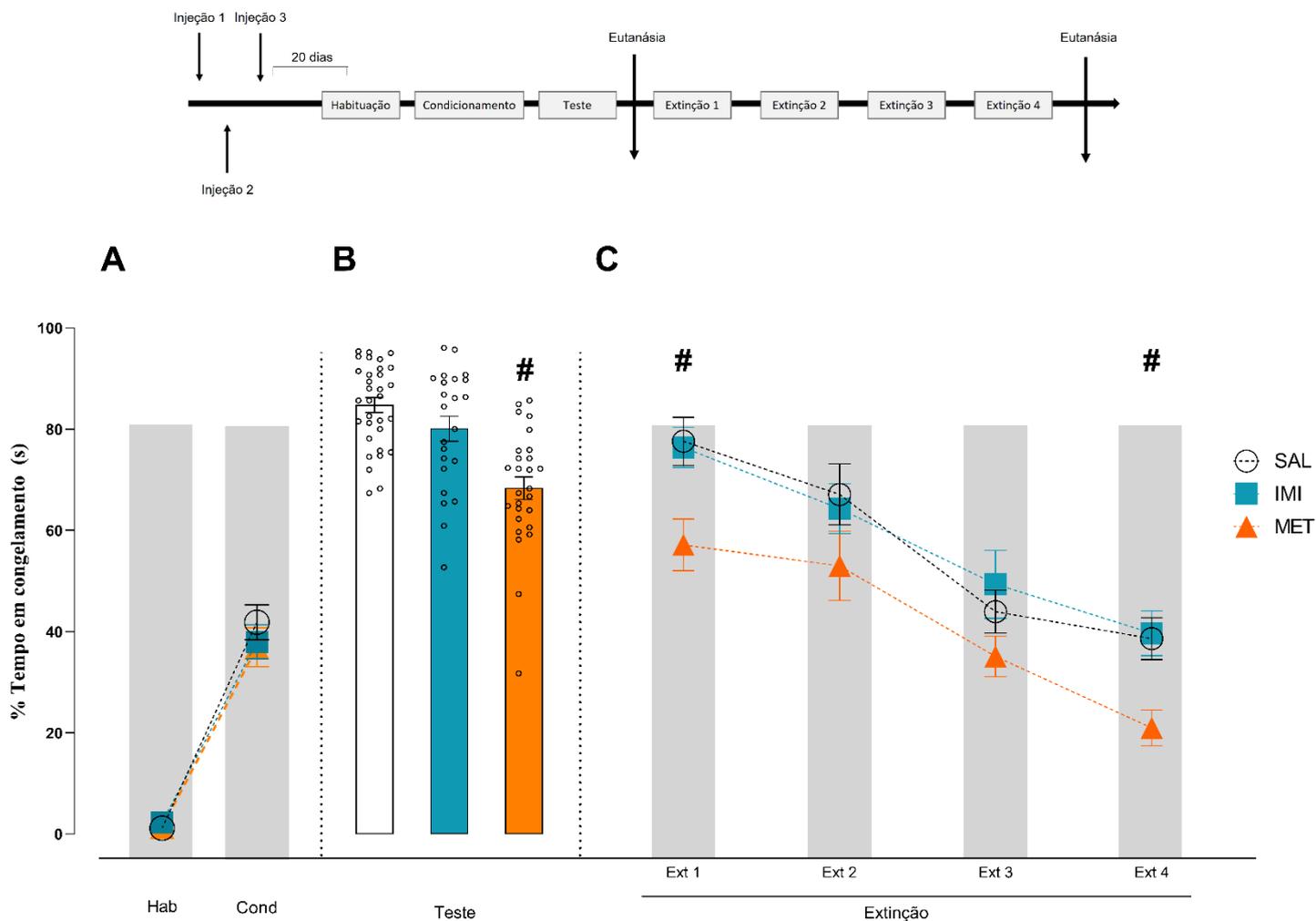


Figura 16 – Tempo de congelamento durante a habituação e o condicionamento (A). Durante o teste, apenas a metirapona diminuiu o tempo de congelamento (B). Durante a extinção, o tratamento com a metirapona diminuiu o tempo de congelamento, facilitando a extinção da memória de medo (C). Demais especificações conforme a Figura 4. Painel A, n= 21-24 por grupo; painel B, n= 21-24; painel C, n= 11-15 por grupo. Fonte: autor.

4.3.3 *Não são observadas alterações da ativação neuronal no mPFC e no BLA durante o teste*

Ao se verificar a ativação neuronal no mPFC PL e IL, e no BLA durante o teste, a ANOVA não encontrou diferenças significativas: PL (**Fig. 17A**) [$F(2, 9) = 1,68$; $p = 0,24$], IL (**Fig. 17B**) [$F(2, 9) = 1,768$; $p = 0,2251$] e BLA (**Fig. 17C**) [$F(2, 9) = 0,5702$; $p = 0,5846$].

Figura 17 – Efeito do tratamento prévio com imipramina e metirapona na ativação de neurônios do mPFC e do BLA durante o teste de medo condicionado

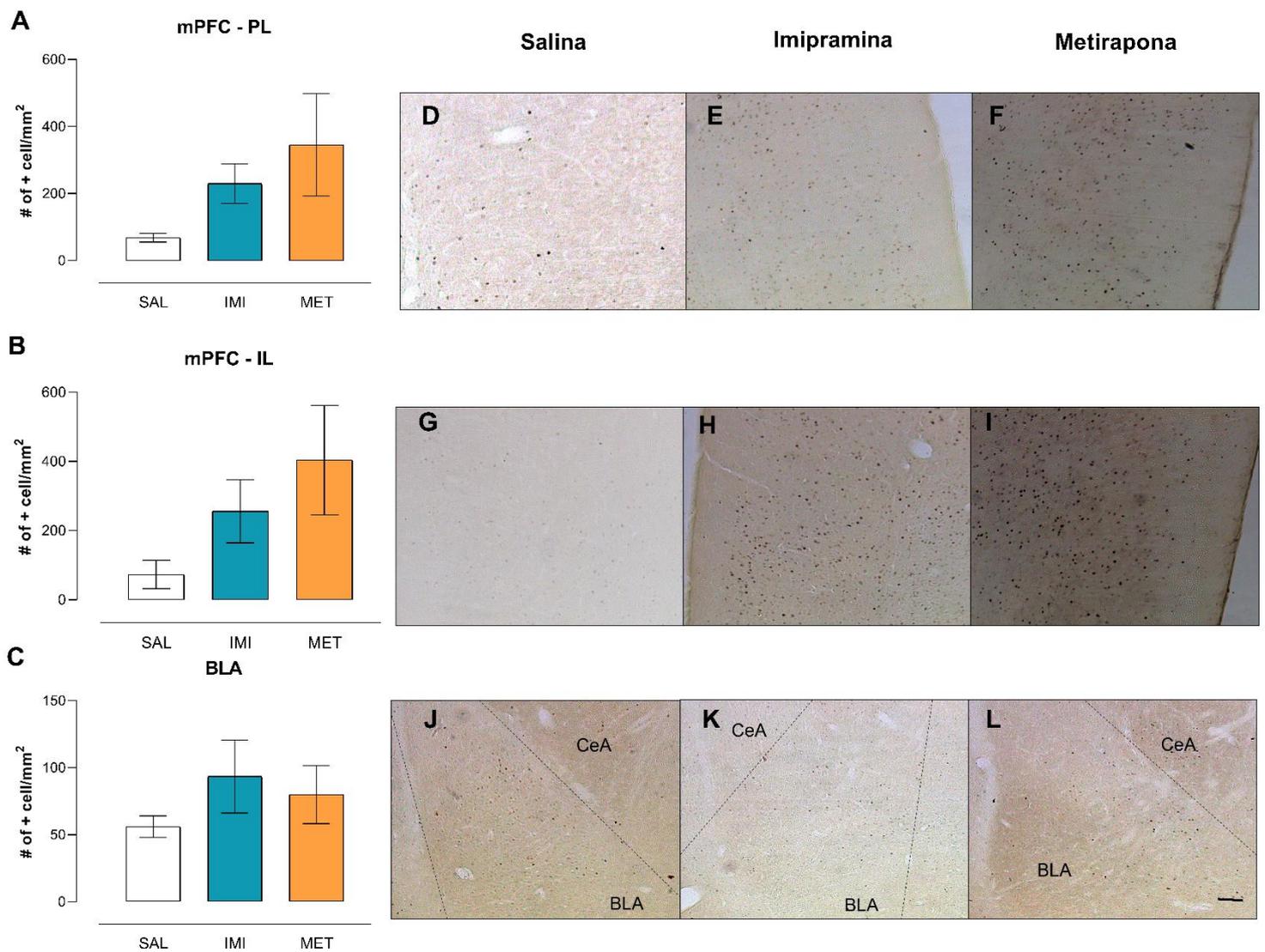


Figura 17 – O tratamento com imipramina ou metirapona não alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL (A) e IL (B) como também no BLA (C). Demais especificações conforme a Figura 5. A barra de escala em L representa o valor de 200 μ m. n= 3-5 por grupo. Fonte: autor.

De forma semelhante ao que observamos durante o teste, não foram encontradas diferenças significativas na ativação neuronal em animais submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado. A ANOVA não encontrou diferenças na área PL (**Fig. 18A**) [$F(2, 9) = 0,1202$; $p = 0,8881$], assim como na área IL (**Fig. 18B**) [$F(2, 9) = 2,713$; $p = 0,1196$] e no BLA (**Fig. 18C**) [$F(2, 9) = 1,038$; $p = 0,3931$].

Figura 18 – Ativação de neurônios do mPFC e BLA em animais submetidos à extinção do medo condicionado

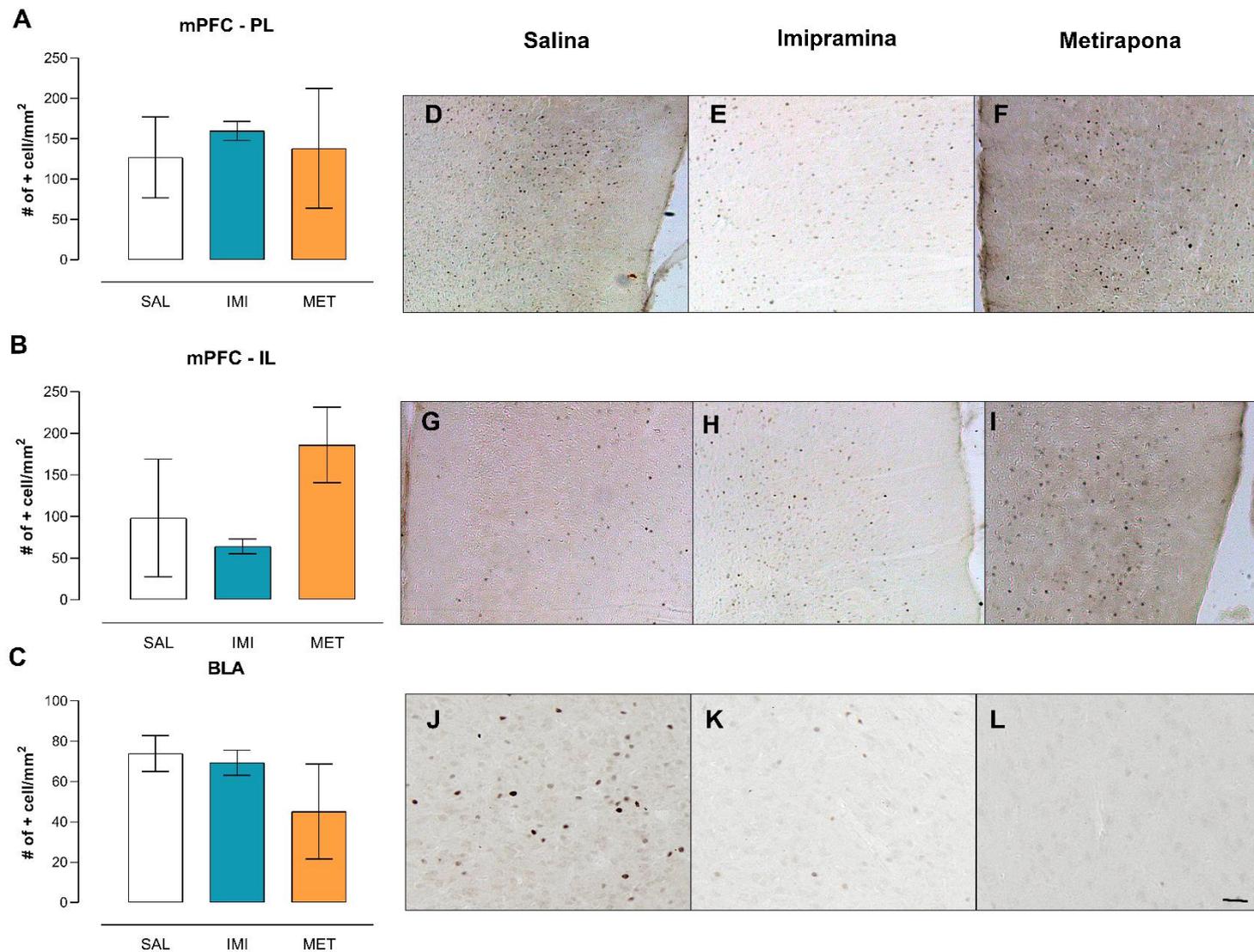


Figura 18 – O tratamento com imipramina ou metirapona não alterou o número de células positivas para a c-Fos do mPFC PL (A) e IL (B) como também no BLA (C). Especificações conforme a Figura 5. n= 3-5 por grupo. Fonte: autor.

5 Discussão

Utilizando um modelo de condicionamento de medo ao contexto, verificamos as alterações comportamentais e de atividade neuronal ao tratar os animais com imipramina ou metirapona em três diferentes situações: entre a habituação e o condicionamento (*Estudo 1*), entre o condicionamento e o teste (*Estudo 2*), e uma terceira situação com o tratamento sendo feito 21 dias antes do condicionamento (*Estudo 3*).

Um primeiro dado importante a ser ressaltado é o funcionamento do modelo experimental empregado. Modelos animais vêm sendo amplamente empregados em estudos de transtornos psiquiátricos, nesta tese utilizamos o medo condicionado ao contexto como modelo para o TEPT. Nossos resultados mostram que em todos os grupos houve influência do fator *tempo* na comparação entre a habituação e o condicionamento, assim como durante as extinções. Isso demonstra a efetividade do protocolo em aumentar o congelamento após o esquema de choques no condicionamento, como também a diminuição deste comportamento após as sucessivas exposições ao mesmo contexto no procedimento de extinção.

Estímulos estressores traumáticos, como o estresse de restrição, o choque nas patas ou a exposição ao predador têm sido amplamente empregados uma vez que apresentam um correlato translacional com a clínica psiquiátrica. Após a exposição a tais estímulos, pode ocorrer a persistência das consequências comportamentais e alterações nos substratos neuronais envolvidos, como observado em transtornos de ansiedade, sobretudo o TEPT. Dentre estes substratos, destacamos neste estudo o mPFC e o BLA.

Muito embora os estudos tenham se debruçado nas alterações nestes substratos ocorrendo na vida adulta, durante a fase da adolescência processos plásticos pujantes ocorrem nas áreas correlatas aos efeitos do estresse. De modo geral, nossos resultados sugerem que o papel modulatório da serotonina e da CORT nas respostas ao condicionamento de medo são diferentes em adolescentes e adultos e que a ativação dos neurônios do mPFC e BLA são fenômenos associados as respostas comportamentais observadas, mas não determinantes.

Em relação aos achados comportamentais, nossos resultados no *Estudo 1* demonstram efeitos dos tratamentos com imipramina e metirapona nas respostas condicionadas de medo. O tratamento com imipramina atenuou a

aquisição da memória de medo, diminuindo, portanto, a expressão do comportamento de congelamento no teste em adultos. Estes dados confirmam achados anteriores da literatura em que antidepressivos, no caso os ISRS atenuam o medo condicionado (BAUER, 2015; BURGHARDT; BAUER, 2013; HASHIMOTO; INOUE; KOYAMA, 1996; INOUE; KITAICHI; KOYAMA, 2011; INOUE; TSUCHIYA; KOYAMA, 1996), e trazem um primeiro dado mostrando efeitos da imipramina neste protocolo. Em adolescentes, no entanto, a imipramina não atenuou a expressão da memória de medo durante o teste como também afetou a sua extinção aumentando o congelamento. Este dado demonstra que os efeitos da imipramina, neste esquema de tratamento, são dependentes da idade.

Uma possível explicação para este resultado seria a maior população de interneurônios PVs em relação aos SSTs no mPFC-PL. Estes neurônios PVs, especificamente durante o início da adolescência (PND=28-35), teriam uma maior densidade de receptores do tipo 5-HT_{1A}, cujo resultado do aumento de serotonina causado pela imipramina seria a sua inibição (para revisão, ver KLUNE et al., 2021). Por outro lado, foi demonstrado que a inibição da atividade de interneurônios PVs no mPFC-PL por optogenética, pelo menos em animais adultos, levaria a um aumento da atividade de neurônios de projeção da área PL, levando ao comportamento de congelamento aumentado (COURTIN et al., 2014). Este efeito poderia, pelo menos em parte, explicar estes resultados observados em que há maior tempo de congelamento durante a habituação nos animais adolescentes e adultos tratados com imipramina. No mPFC-IL, área correlata a extinção da memória de medo, os interneurônios SSTs estão já desenvolvidos em função e densidade de forma semelhante a adultos, enquanto os PVs passam por um processo prolongado de maturação durante a adolescência. Estes interneurônios SSTs têm propriedades de membrana e resposta ao glutamato ou ao GABA alterados após a exposição ao condicionamento de medo. Estas alterações na transmissão GABAérgica seriam irreversíveis em adolescentes, mesmo após o protocolo de extinção. Os autores sugerem, portanto, que este efeito irreversível levaria a uma inibição dos neurônios de projeção do mPFC-IL, que estaria relacionado aos déficits de extinção de memória que ocorrem durante a adolescência (KOPPENSTEINER et al., 2019).

Por outro lado, tanto em adultos como em adolescentes, a metirapona foi capaz de atenuar a expressão do medo durante o condicionamento, facilitando a diminuição do congelamento em resposta aos EI. De encontro a esse achado, Careaga et al. (2015) não encontram efeitos da metirapona atenuando a expressão do medo em animais adultos durante a apresentação de um tom sonoro aversivo, um protocolo de resposta de medo imediata. No entanto, outros trabalhos mostram que a liberação de CORT é diretamente proporcional a intensidade do estímulo aversivo (CORDERO; MERINO; SANDI, 1998; DOS SANTOS CORRÊA et al., 2019). Neste sentido, o choque causaria um aumento maior da CORT em comparação ao tom sonoro aversivo. Em suporte a esta ideia, foi observado que a metirapona na dose de 50 mg/kg usada neste estudo foi capaz de inibir o aumento de CORT em resposta ao choque de 1 mA de intensidade, mas não o de 0,4 mA (CORDERO et al., 2002). Assim, nosso estímulo causaria um aumento de CORT, que seria suprimido pelo tratamento com metirapona, diminuindo assim a expressão do medo durante o condicionamento. Corroborando outros achados de que a inibição da liberação de CORT ou o antagonismo de GR afetam a aquisição do medo condicionado (BÁEZ; SIRICZMAN; VOLOSIN, 1996; CORDERO et al., 2002; CUCCOVIA V REIS et al., 2022; ROOZENDAALL; BOHUS; MCGAUGH, 1996), vimos uma diminuição do congelamento dos animais tratados com metirapona também durante o teste e a extinção. Assim, nossos dados reforçam o papel da CORT como moduladora de processos de resposta imediata ao estresse, assim como em processos mnemônicos associados ao condicionamento aversivo em adolescentes e adultos.

Em relação a ativação neuronal durante o teste e a última sessão de extinção, resultados ainda preliminares mostram efeitos dos tratamentos, dependentes da idade dos animais. De modo geral, a imipramina diminuiu a ativação cortical em adultos, confirmando achados anteriores em que o aumento de serotonina inibe neurônios de projeção do mPFC (ZHONG; YAN, 2011). Não observamos esta diminuição de ativação do mPFC durante a adolescência, o que pode estar relacionado a ausência de efeitos da imipramina observada no tempo de congelamento durante o teste.

A metirapona, por sua vez, diminuiu a ativação neuronal na amígdala de adultos e aumentou o número de células imunopositivas para a c-Fos no mPFC-

IL, durante o teste e durante a extinção do medo em adolescentes. Sabe-se que a CORT na amígdala leva a alterações funcionais dos neurônios de projeção (HETZEL; ROSENKRANZ, 2014; ZHANG; ROSENKRANZ, 2012) aumentando sua excitabilidade, um efeito que seria mediado por GR (DUVARCI; PARÉ, 2007). Esta diminuição da atividade destes neurônios observada em animais tratados com metirapona poderia em parte estar relacionada com esta supressão do eixo-HPA pela metirapona. Neste sentido, a inibição da sinalização por GR na amígdala, com o seu antagonista (RU-38486), afeta a formação da memória de medo contextual relacionada a presença do predador, que é dependente de síntese proteica (CUCCOVIA V REIS et al., 2022). Estes dados reforçam as evidências em suporte da importância da sinalização de CORT durante um evento aversivo para a aquisição do medo condicionado.

Dando suporte a ideia da importância do papel tempo dependente dos glicocorticoides, ao realizarmos os tratamentos após o condicionamento (*Estudo 2*), observamos um efeito diferente ao observado no *Estudo 1*. Corroborando a literatura, vimos que a metirapona diminuiu o comportamento de congelamento durante o teste em adolescentes e adultos, sem afetar o tempo de congelamento de adultos durante a extinção. Em adolescentes, porém, a metirapona aumentou o congelamento dos animais adolescentes durante a extinção, levando a um déficit na extinção da memória de medo. Este achado corrobora a literatura que sugere que a supressão de GC's na primeira reexposição ao contexto após o condicionamento afetaria o aprendizado da extinção (BARRETT; GONZALEZ-LIMA, 2004; BLUNDELL et al., 2011; CAREAGA et al., 2015), ampliando este mesmo entendimento para adolescentes.

Ainda em relação aos achados no *Estudo 2*, enquanto em ratos adultos o tratamento com a imipramina não afetou as respostas durante o teste e a extinção, em adolescentes observamos diminuição do congelamento durante o teste e a extinção do medo condicionado. Esta resposta de adolescentes pode parecer contraditória ao resultado encontrado no *Estudo 1*. No entanto, durante a evocação da memória adquirida durante o condicionamento, o aumento da serotonina poderia estar relacionado a uma inibição dos neurônios de projeção do mPFC-PL mediada também por receptores 5-HT1A pós-sinápticos, como também a inibição dos neurônios do BLA, através de mecanismo semelhante. Nesta situação, todavia, o efeito local dos tratamentos pode ser diferente.

Interneurônios SSTs do mPFC-PL aumentam a corrente excitatória pós-sináptica após o EI (CUMMINGS; CLEM, 2020). Apesar da menor quantidade de interneurônios SSTs em comparação aos PVs em adolescentes, o condicionamento poderia alterar o funcionamento da microcircuitaria local do mPFC, o que pode estar relacionado com as diferenças aqui observadas. Desta forma, ao invés de uma exacerbação do medo, ocorreria uma diminuição da atividade dos neurônios de projeção, levando a um menor congelamento dos animais durante o teste e a extinção. Burghardt et al. (2007) observaram que o tratamento agudo com ISRS após o condicionamento, aumentou o congelamento de animais adultos. No entanto, os inibidores de recaptação de noradrenalina não alteraram as respostas dos animais tratados neste mesmo estudo (BURGHARDT et al., 2007). Nesta tese utilizamos a imipramina, que também atua sobre o sistema noradrenérgico, não podendo se descartar os papéis deste sistema sobre os efeitos comportamentais observados. Neste sentido, os dados na literatura mostram que diferentemente do que ocorre com o sistema serotoninérgico, pelo menos no mPFC, as projeções noradrenérgicas vindas do lócus cerúleos atingem um ponto de maturação parecido ao de adultos por volta do sexto dia de vida (KLUNE; JIN; DENARDO, 2021). Desta forma, as alterações vistas em adolescentes provavelmente estão relacionadas a esta fase de maturação e organização sináptica que ocorre durante este período, porém, no sistema serotoninérgico. Em adultos, no entanto, o efeito observado de diminuição do congelamento ocorre apenas no teste, em animais tratados antes do condicionamento, sem demais efeitos na extinção, e quando os animais são tratados após o condicionamento. Tal achado poderia estar atrelado a ausência de efeitos dos inibidores de recaptação de noradrenalina já descritos anteriormente (BURGHARDT et al., 2007; SANTOS; MARTINEZ; BRANDÃO, 2006) ou a intensidade do estímulo que empregamos em nossos experimentos (seis choques de 1,0 mA com duração de 3 segundos cada).

Nos animais incluídos neste estudo não observamos efeitos significativos da imipramina na ativação neuronal nas áreas estudadas em adolescentes ou adultos. Essa possível ausência de efeito em parte pode ser explicada pela grande variabilidade observada nos animais tratados com salina, grupo com o qual foi realizada a comparação. Especificamente, esperávamos observar uma diminuição da atividade cortical no mPFC. Por outro lado, o tratamento com

metirapona aumentou significativamente a atividade dos neurônios do mPFC-IL. Esta maior ativação poderia ser explicada pelo recrutamento tardio da área durante a extinção, uma vez que a supressão de CORT afeta o processo de extinção do medo condicionado como apontado anteriormente.

Em adolescentes, foi observado o aumento da ativação neuronal na área IL durante o teste e nas áreas PL e IL durante a extinção. Este efeito durante o teste em adolescentes pode estar relacionado a mudanças dinâmicas na conectividade entre o BLA e a área PL que ocorrem neste período (ARRUDA-CARVALHO et al., 2017; PATTWELL et al., 2016), uma vez que esta conectividade poderia explicar o déficit de extinção de memória de medo com pistas observado em adolescentes (PATTWELL et al., 2016). Uma vez que os animais passaram pelo protocolo de condicionamento e somente após foram tratados com metirapona, 30 min antes do teste, os efeitos do aumento de CORT após o condicionamento estariam presentes, levando a uma reverberação da via BLA-PL sugerida em outros estudos (PATTWELL et al., 2016). A ativação desta via explicaria, pelo menos em parte, a maior ativação dos neurônios da área PL, que estaria subjacente ao congelamento aumentado durante a extinção do medo em adolescentes. A supressão da liberação de CORT, por sua vez, explicaria a ausência do direcionamento comportamental pelo BLA durante o teste. Outra explicação já abordada nesta tese, seria a supressão da atividade de neurônios do IL mediada por interneurônios SSTs, causando déficits na extinção do medo (KOPPENSTEINER et al., 2019).

Finalmente, outro achado comportamental interessante desta tese fo a observação de efeitos de longo prazo dos tratamentos com imipramina e metirapona. A imipramina foi capaz de atenuar a expressão do medo apenas em adultos, sem afetar a extinção. Este dado corrobora nosso estudo anterior em que o tratamento agudo com imipramina 21 dias antes da pré-exposição ao nado forçado atenuou seus efeitos, levando a um menor tempo em imobilidade durante o teste, 24h depois (CAMPOS-CARDOSO et al., 2021). Este efeito seria mediado pela plasticidade de receptores GR no hipocampo, porém outras alterações que ainda não foram estudadas, podem ocorrer devido a este esquema de tratamento. Neste sentido, foram encontrados efeitos plásticos induzidos pela imipramina, em um esquema de tratamento crônico por 21 dias, sendo capaz de impedir alterações morfológicas amplamente descritas no mPFC

e no BLA causados por estresse crônico, o que atenuou comportamentos tipo-depressivos (LEEM; YOON; JO, 2020). Além disso, o tratamento com imipramina por sete dias, mas não o agudo, é capaz de impedir a metilação do DNA no hipocampo e no mPFC, atenuando o comportamento de desamparo aprendido de ratos (SALES e JOCA, 2018). De forma contrária, Kawai et al. (2018) observaram um efeito do tratamento agudo com imipramina no teste do nado forçado, e que este efeito é dependente da hora do dia em que a droga é administrada, com efeitos observados quando os animais são tratados pela manhã e não pela noite. Os autores não sugerem tal interação, mas a liberação de CORT flutua circadianamente, o que poderia estar subjacente a estas diferenças observadas neste estudo. Nosso tratamento agudo, no entanto, diminui parcialmente o congelamento em resposta ao choque nas patas, porém os mecanismos subjacentes a esta resposta imediata no caso do *Estudo 1*, e de longo prazo, no *Estudo 3* carecem de mais evidências. Uma possibilidade, seria que nosso esquema de tratamento em animais não estressados poderia desencadear processos plásticos de longa duração, não só no hipocampo, como observamos em trabalhos anteriores, mas também em outras áreas responsivas ao estresse. No BLA e no mPFC, estes processos plásticos poderiam afetar as respostas durante o desafio comportamental três semanas após o tratamento. Cabe ressaltar que os resultados desta tese mostram, portanto, que o efeito de longo prazo deste tratamento é também observado em outros tipos de estressores além do nado forçado.

A metirapona, no entanto, atenuou a expressão do medo no teste e facilitou a extinção da memória condicionada apenas em adolescentes, apontando que há uma especificidade destes efeitos em razão da fase do desenvolvimento. Além disso, estes dados corroboram achados anteriores em que a metirapona teria efeitos de longa duração no funcionamento do eixo-HPA (ROTLLANT; ARMARIO, 2005) e no comportamento (CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação). Em conjunto, estes dados demonstram alterações importantes no substrato neural para as respostas de medo ao se comparar adolescentes e adultos, sugerindo que importantes eventos plásticos de longa duração seriam desencadeados pelo tratamento prévio com estas drogas.

Em relação aos efeitos de longo prazo após os tratamentos, não observamos alterações da ativação neuronal no teste e na extinção de

adolescentes. Apesar dos efeitos comportamentais da metirapona diminuindo o congelamento no teste e na extinção, esperávamos que este procedimento alterasse a conectividade da via BLA-PL, diminuindo a atividade dos neurônios da área PL. O aumento de CORT leva a alterações morfológicas na amígdala (MITRA; SAPOLSKY, 2008), efeito também observado quando os animais são submetidos ao estresse (CHAKRABORTY et al., 2020; LAKSHMINARASIMHAN; CHATTARJI, 2012; MITRA et al., 2005; NOVAES et al., 2018; RAO et al., 2012). Neste sentido, o tratamento com metirapona aos 30 dias de vida, fase sensível ao estabelecimento de conexões desta via (ARRUDA-CARVALHO et al., 2017; PATTWELL et al., 2016), diminuiria a liberação de CORT, o que poderia afetar a plasticidade na amígdala, como surgimento de botões sinápticos e/ou novas ramificações e espinhas dendríticas nos neurônios de projeção do BLA em resposta ao condicionamento aversivo, afetando, desta forma, um possível mecanismo de conexão entre as áreas. Dando suporte a esta ideia, ratos adolescentes tratados com metirapona aos 30 dias de vida apresentam diminuição do comportamento tipo-ansioso 10 dias depois (CAMPOS-CARDOSO et al., submetido à publicação), um efeito que pode estar relacionado ao uma diminuição da atividade da área PL, ou uma menor influência do BLA no mPFC, devido a esta manipulação.

A conexão BLA-mPFC-IL parece se formar mais cedo durante o desenvolvimento. Ganella et al. (2018) mostraram que aos 17 dias de vida, ratos têm estas conexões parecidas às encontradas em adultos. Apesar de não observarmos diferenças na ativação neuronal, o protocolo empregado nem nosso estudo não nos permite confirmar estes achados, não sendo possível também refutar tal hipótese de alteração nesta via. Neste sentido, os efeitos comportamentais observados podem ter outros mecanismos subjacentes que não a ativação ou inibição das áreas que foram investigadas neste estudo. Uma possibilidade seria a população específica de neurônios que estaria sendo recrutada em resposta ao protocolo de condicionamento de medo e coordenando esta resposta comportamental. Muito provavelmente, como sugere a literatura, um desbalanço excitatório/inibitório na microcircuitaria do mPFC que ocorre durante o período da adolescência em resposta ao estresse e que poderia ter implicações na vida futura do indivíduo (ARRUDA-CARVALHO et al., 2017; BARFIELD et al., 2020; CABALLERO et al., 2020; CABALLERO; OROZCO;

TSENG, 2021; PAGE; COUTELLIER, 2018). Estresse e/ou CORT afetariam, portanto, este processo, levando a alterações subjacentes a susceptibilidade para comportamentos relacionados com a ansiedade e a depressão, que perdurariam ao longo da vida do indivíduo (BARFIELD et al., 2020). Neste sentido, é possível hipotetizar que por outro lado, a diminuição de CORT nesta mesma fase, poderia também levar a alterações de longo prazo na circuitaria ou na morfologia dos neurônios do mPFC. Outra possibilidade, já levantada, seria a atividade do eixo-HPA, que poderia estar alterada durante o desafio comportamental afetando as respostas. Ademais, apesar desta limitação, estes dados comportamentais consistentes e semelhantes com achados anteriores abrem uma frente fértil para novos estudos que possam investigar outros mecanismos, incluindo ou não a ativação de neurônios do mPFC e BLA para explicar estes efeitos de longo prazo observados.

Parece haver especificidade no recrutamento de vias e evidências apontam para diferenças nas populações de neurônios do BLA recrutadas em resposta a eventos diversos. A inibição do BLA com muscimol, um agonista de receptores GABA_A, antes do aprendizado da extinção leva a um prejuízo na extinção da memória de medo (SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011). De forma semelhante, o mesmo tratamento com muscimol após o aprendizado da extinção, novamente prejudicou a extinção da memória (LAURENT; WESTBROOK, 2008). Estes achados evidenciam a participação do BLA no aprendizado da extinção. No entanto, de forma contraditória, alguns trabalhos observaram que em animais previamente estressados, houve um déficit na extinção da memória de medo acompanhada de maior número de células positivas para a c-Fos (HOFFMAN et al., 2014) ou maior metabolismo energético na amígdala, utilizado no estudo como marcador de atividade neuronal (TOLEDO-RODRIGUEZ et al., 2012).

Utilizando uma abordagem bastante interessante, Kim et al. (2016) mostraram que os neurônios do BLA que inervam o mPFC-PL ou -IL possuem marcadores moleculares e genéticos distintos, apresentando localização rostro-caudal e fenótipos diferentes. Neurônios *Rspo2* e que inervam o PL, respondem a estímulos aversivos como choque nas patas, odor sintético do predador ou bebida não palatável. Já as células *Ppp1r1b* são responsivas a estímulos de valência positiva como o contato do macho com uma fêmea, alimento palatável

ou água com sacarose, e inervam o IL. Neste sentido, a ativação de células *Rspo2* por optogenética durante a apresentação de um estímulo positivo, atrapalhou o condicionamento apetitivo. Por outro lado, ativar células *Ppp1r1b* durante o condicionamento de medo, causa um prejuízo na evocação da memória aversiva. Estes dados mostram que a amígdala é um local de convergência de estímulos positivos e negativos através de duas populações geneticamente distintas (KIM et al., 2016).

Reforçando o papel distinto destas populações neuronais no BLA, outro trabalho apontou que a CORT poderia levar a uma maior ativação das células *Rspo2* e direcionar o animal a um comportamento tipo-ansioso em testes como o labirinto em cruz elevado e a caixa claro escuro. Estes comportamentos, no entanto, são atenuados por um inibidor seletivo da enzima ciclo-oxigenase 2, através da uma diminuição de correntes glutamatérgicas excitatórias induzidas pela CORT (MORGAN et al., 2019). Embora outros estudos sejam necessários para confirmar esta hipótese, o menor congelamento observado em nosso trabalho seria decorrente de uma diminuição na ativação de células *Rspo2* durante o condicionamento aversivo, resultante da inibição da liberação de CORT pelo tratamento com metirapona.

De forma similar ao BLA, no mPFC a literatura aponta que as diferenças nas respostas podem estar relacionadas a populações distintas de células. Em relação aos interneurônios de SST no mPFC, Cummings et al. (2021) mostraram que populações neuronais distintas do mPFC-PL respondem de acordo com a natureza do estímulo recebido. Assim, enquanto uma população específica responde a estímulos aversivos, mediando a expressão do congelamento defensivo, a outra população responde à estímulos apetitivos, como a morfina, exercendo um controle oposto sobre as respostas de medo (CUMMINGS et al., 2021). Neste sentido, há evidências que os neurônios SST do mPFC codificam a memória relacionada ao condicionamento de medo (CUMMINGS; CLEM, 2020), mas também teriam um papel no condicionamento a recompensas (CUMMINGS et al., 2021).

Reforçando a ideia de resposta seletiva destes neurônios, Joffe et al. (2022) mostraram que um outro tipo de estressor, o estresse de restrição, leva a ativação de neurônios SST na área PL e leva a um aumento da transmissão glutamatérgica pela ação do receptor mGlu5, facilitando a potenciação de longa

duração nas sinapses do BLA nestes neurônios SST do mPFC-PL (JOFFE et al., 2022). A ativação deste receptor mGlu5 então aumenta o recrutamento da via BLA-mPFC e promove uma inibição retroalimentada das informações do tálamo dorsal. Em última instância, esse recrutamento da via BLA-mPFC em detrimento da via tálamo dorsal-mPFC pelos neurônios SST estaria relacionado com a alteração da microcircuitaria local no mPFC em sentido a um comportamento alterado em consequência ao estresse (CUMMINGS; MAGUIRE, 2022). De fato, o estresse e a CORT afetam a atividade de neurônios SST, mas não os de projeção do mPFC (LIN; SIBILLE, 2015), mostrando que essa diferenciação e direcionamento do comportamento está relacionada ao funcionamento da inervação gabaérgica na região.

A análise da atividade neuronal do mPFC e do BLA como um todo, como empregamos neste estudo, pode dificultar a observação fenômenos que são mais localizados ou ocorrem em uma menor escala. O fato de não termos observado as alterações esperadas na atividade neuronal no BLA ou no mPFC, ou padrões de ativação similar do mPFC em animais mais ou menos responsivos ao condicionamento aversivo sugere que outros métodos devam ser empregados para a avaliação de populações neuronais distintas em uma mesma estrutura ou estruturas relacionadas, estruturas estas ativadas em resposta a um mesmo estímulo. Além disso, não está claro o papel dos interneurônios no mPFC, sob condições de estresse em adolescentes. A literatura aponta que o estresse pode levar a um desbalanço excitatório/inibitório durante este período que pode aumentar ou diminuir a susceptibilidade dos indivíduos nesta fase do desenvolvimento às consequências do estresse.

Nossos resultados mostram que a imipramina e a metirapona modulam as respostas de medo condicionado ao contexto, de forma diferenciada em adultos e adolescentes. A depender do momento em que o tratamento é realizado, observamos um efeito dual de ambas as drogas. Sendo um protocolo experimental em que observamos os efeitos imediatos e de longo prazo dos tratamentos em dois momentos diferentes durante o condicionamento de medo, os tratamentos provavelmente promovem alterações plásticas no mPFC e no BLA. Quais são estes processos são questões que devem ser respondidas por estudos futuros. Uma abordagem inicial interessante seria averiguar as alterações em receptores de serotonina e glicocorticóides nestas áreas, uma vez

que a interação entre os dois sistemas poderia estar subjacente em possíveis mudanças plásticas nestas populações. A resposta do eixo-HPA aos EI e EC poderia mostrar como os sistemas endócrinos de resposta ao estresse influenciam estes padrões comportamentais que observamos. Durante a adolescência especificamente, qual o papel da CORT nas alterações de longo prazo observadas por um único tratamento com metirapona mostra-se bastante promissor, uma vez que neurônios do BLA e do mPFC (que está em plena atividade de maturação nesta fase) são sensíveis a mudanças do hormônio. Por fim, discriminar as subpopulações específicas que são ativadas ou inibidas durante o condicionamento e a extinção pode nos dar uma melhor ideia de como são coordenadas as respostas de adultos e adolescentes a experiências aversivas traumáticas.

6 Conclusão

Concluimos que o protocolo proposto se mostrou válido para estudo das respostas de medo condicionado ao contexto e que os sistemas mediados por serotonina e/ou noradrenalina e glicocorticoides estão envolvidos na mediação destas respostas. De forma imediata, a imipramina modula as respostas de forma diferente em adolescentes em comparação a adultos, atenuando ou exacerbando a resposta de medo. A metirapona afeta o comportamento em adolescentes e adultos de forma similar, mas de maneira tempo dependente. Há efeitos de longa duração dos tratamentos. A imipramina atenua o medo em adultos e a metirapona em adolescentes. De modo geral, a imipramina diminui a ativação de neurônios no mPFC e BLA, a metirapona aumenta a ativação no mPFC e diminui no BLA.

7 Referências Bibliográficas

ADHIKARI, Avishek et al. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. **Nature**, [s. l.], v. 527, n. 7577, p. 179–185, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature15698>>

ALBERT, Paul R.; VAHID-ANSARI, Faranak; LUCKHART, Christine. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. JUNE, p. 1–13, 2014.

ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: Intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, [s. l.], v. 284, p. 988–997, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452214009397>>

ALMADA, Rafael C. et al. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus–dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 203, n. 2, p. 279–287, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432809003301>>

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-V**. [s.l: s.n.].

ANACKER, Christoph et al. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 415–425, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.03.007>>

ARNSTEN, Amy F. T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 410–422, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2648>>

ARNSTEN, Amy F. T. et al. The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 89–99, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.002>>

ARRUDA-CARVALHO, Maithe et al. Optogenetic examination of prefrontal-amygdala synaptic development. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 2976–2985, 2017.

BÁEZ, Marisel; SIRICZMAN, Irene; VOLOSIN, Marta. Corticosterone is involved in foot shock-induced inactivity in rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 795–801, 1996.

BARFIELD, Elizabeth T. et al. Morphological Responses of Excitatory Prelimbic and Orbitofrontal Cortical Neurons to Excess Corticosterone in Adolescence and Acute Stress in Adulthood. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 14, 2020.

BARRETT, Douglas; GONZALEZ-LIMA, F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 371, n. 2–3, p. 91–96, 2004.

BAUER, Elizabeth P. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 277, p. 68–77, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.028>>

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Carolin. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 351–362, 1971. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0023969071900166>>

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. **Crouching as an index of fear** *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1969.

BLUNDELL, Jacqueline et al. Block of glucocorticoid synthesis during reactivation inhibits extinction of an established fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 453–460, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742711000323>>

BOCCHIO, Marco et al. Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncir.2016.00024/abstract>>

BORELLI, Karina Genaro et al. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 387, n. 2, p. 105–110, 2005.

BROIZ, Ana Carolina; OLIVEIRA, Luciana Chrystine; BRANDÃO, Marcus Lira. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 76–84, 2008.

BUCCAFUSCO, Jerry J. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press**; [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204335>>

BUKALO, Olena et al. Effects of optogenetic photoexcitation of infralimbic cortex inputs to the basolateral amygdala on conditioned fear and extinction. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 396, n. August 2020, p. 112913, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112913>>

BURGHARDT, N. S.; BAUER, E. P. Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: Implications for underlying fear circuits. **Neuroscience**, [s. l.], v. 247, p. 253–272, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.050>>

BURGHARDT, Nesha S. et al. Acute Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Increase Conditioned Fear Expression: Blockade With a 5-HT_{2C} Receptor Antagonist. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 1111–1118, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322306015125>>

CABALLERO, Adriana et al. Downregulation of parvalbumin expression in the prefrontal cortex during adolescence causes enduring prefrontal disinhibition in adulthood. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 1527–1535, 2020.

CABALLERO, Adriana; OROZCO, Amanda; TSENG, Kuei Y. Developmental regulation of excitatory-inhibitory synaptic balance in the prefrontal cortex during adolescence. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], 2021.

CAMPOS-CARDOSO, Rodrigo et al. Imipramine attenuates anxiety- and depressive-like effects of acute and prolonged ethanol-abstinence in male rats by modulating SERT and GR expression in the dorsal hippocampus. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 408, n. November 2020, p. 113295, 2021. Disponible em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432821001832>>

CAREAGA, Mariella B. L. et al. Pre-test metyrapone impairs memory recall in fear conditioning tasks: lack of interaction with β -adrenergic activity. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. MAR, p. 1–11, 2015.

CHAAYA, Nicholas; BATTLE, Andrew R.; JOHNSON, Luke R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 92, n. March, p. 43–54, 2018. Disponible em: <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.013>>

CHAKRABORTY, Prabahan et al. Corticosterone after acute stress prevents the delayed effects on the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 45, n. 13, p. 2139–2146, 2020. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41386-020-0758-0>>

CHROUSOS, George P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 374–381, 2009. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>>

CONRAD, Cheryl D.; MAULDIN-JOURDAIN, Melissa L.; HOBBS, Rebecca J. Metyrapone Reveals That Previous Chronic Stress Differentially Impairs Hippocampal-dependent Memory. **Stress**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 305–318, 2001. Disponible em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890109014754>>

CORDERO, M. Isabe.; SANDI, Carmen. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. **Brain Research**, [s. l.], v. 786, n. 1–2, p. 11–17, 1998. Disponible em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899397014200>>

CORDERO, M. Isabel et al. Glucocorticoid Involvement in Memory Formation in a Rat Model for Traumatic Memory. **Stress**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 73–79, 2002. Disponible em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1025389029000124404>>

CORDERO, M. Isabel; MERINO, J. Joaquin; SANDI, Carmen. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 885–891, 1998.

- CORODIMAS, KEITH P. et al. Corticosterone Potentiation of Conditioned Fear in Rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 746, n. 1, p. 392–393, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1994.tb39264.x>>
- COURTIN, Julien et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. **Nature**, [s. l.], v. 505, n. 7481, p. 92–96, 2014.
- CRESSMAN, Victoria L. et al. Prefrontal cortical inputs to the basal amygdala undergo pruning during late adolescence in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 518, n. 14, p. 2693–2709, 2010.
- CUCCOVIA V REIS, Fernando Midea et al. Predator fear memory depends on glucocorticoid receptors and protein synthesis in the basolateral amygdala and ventral hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 141, n. March, p. 105757, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453022000981>>
- CUMMINGS, Kirstie A. et al. Ensemble encoding of conditioned fear by prefrontal somatostatin interneurons. **bioRxiv**, [s. l.], p. 2021.07.18.452791, 2021. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.18.452791v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.18.452791v1.abstract>>
- CUMMINGS, Kirstie A.; CLEM, Roger L. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 61–74, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0552-7>>
- CUMMINGS, Kirstie; MAGUIRE, Jamie. Interneurons direct circuit-specific flow of information to communicate stressful experiences. **Neuron**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 911–913, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.019>>
- DE KLOET, E. Ron; OITZL, Melly S.; JOËLS, Marian. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 422–426, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01438-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01438-1)>
- DE KLOET, E. Ronald et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease 1. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 269–301, 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv.19.3.0331>>
- DE QUERVAIN, Dominique J. F. et al. Glucocorticoids enhance extinction-based psychotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 16, p. 6621–6625, 2011. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1018214108>>
- DE QUERVAIN, Dominique; SCHWABE, Lars; ROOZENDAAL, Benno. Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 7–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.155>>

DEJEAN, Cyril et al. Neuronal Circuits for Fear Expression and Recovery: Recent Advances and Potential Therapeutic Strategies. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 298–306, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.017>>

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3839–3847, 1993.

DO-MONTE, Fabricio H. et al. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 3607–3615, 2015. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3137-14.2015>>

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

DOS SANTOS CORRÊA, Moisés et al. Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 110, n. May, p. 104447, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104447>>

DUVARCI, Sevil; PARÉ, Denis. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 16, p. 4482–4491, 2007.

EHLERT, Ulrike; GAAB, Jens; HEINRICHS, Markus. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: The role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Biological Psychology**, [s. l.], v. 57, n. 1–3, p. 141–152, 2001.

EILAND, L.; ROMEO, R. D. Stress and the developing adolescent brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 249, p. 162–171, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.048>>

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

FELIX-ORTIZ, A. C. et al. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, [s. l.], v. 321, p. 197–209, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.041>>

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.

FIGUEIREDO, Helmer F. et al. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 2357–2364, 2003.

GANELLA, Despina E. et al. Neurocircuitry of fear extinction in adult and juvenile rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 351, n. June, p. 161–167, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.001>>

GANON-ELAZAR, Eti; AKIRAV, Irit. Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 1675–1687, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.01.014>>

GEWIRTZ, Jonathan C.; MCNISH, Kenneth A.; DAVIS, Michael. Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 110, n. 1–2, p. 83–95, 2000.

GOETTER, Elizabeth M.; MARQUES, Luana. Cognitive behavioral therapy for posttraumatic stress disorder. **The Massachusetts General Hospital Handbook of Cognitive Behavioral Therapy**, [s. l.], v. 297, n. 8, p. 211–225, 2015.

GOMES, Felipe V. et al. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT 1A receptors. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 104–113, 2012.

GORE, Felicity et al. Neural Representations of Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. **Cell**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 134–145, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.027>>

GRÜNDEMANN, Jan; LÜTHI, Andreas. Ensemble coding in amygdala circuits for associative learning. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 35, p. 200–206, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438815001580>>

GULYAEVA, N. V. Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 564–576, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1134/S0022093021030091>>

HANDWERGER, Kathryn. Differential Patterns of HPA Activity and Reactivity in Adult Posttraumatic Stress Disorder and Major Depressive Disorder. **Harvard Review of Psychiatry**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 184–205, 2009. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00023727-200905000-00002>>

HASHIMOTO, Shinji; INOUE, Takeshi; KOYAMA, Tsukasa. Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 182–186, 1996.

HERRY, Cyril; JOHANSEN, Joshua P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1644–1654, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.3869>>

HETZEL, Andrea; ROSENKRANZ, J. Amiel. Distinct effects of repeated restraint stress on basolateral amygdala neuronal membrane properties in resilient adolescent and adult rats. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 2114–2130, 2014.

HOFFMAN, Ann N. et al. Chronic stress disrupts fear extinction and enhances amygdala and hippocampal Fos expression in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 112, p. 139–147, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.018>>

HOWLAND, John G. et al. The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 135, n. June 2021, p. 104569, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104569>>

INOUE, Takeshi; KITAICHI, Yuji; KOYAMA, Tsukasa. SSRIs and conditioned fear. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 1810–1819, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.09.002>>

INOUE, Takeshi; TSUCHIYA, Kiyoshi; KOYAMA, Tsukasa. Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 825–831, 1996.

JANKORD, Ryan et al. Stress vulnerability during adolescent development in rats. **Endocrinology**, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 629–638, 2011.

JOFFE, Max E. et al. Acute restraint stress redirects prefrontal cortex circuit function through mGlu5 receptor plasticity on somatostatin-expressing interneurons. **Neuron**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1068- 1083.e5, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.12.027>>

JOHANSEN, Joshua P. et al. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 28, p. 12692–12697, 2010.

JOHNSON, Philip L. et al. Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 138, p. 174–179, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.09.021>>

KAR, Nilamadhab. Cognitive behavioral therapy for the treatment of post-traumatic stress disorder: A review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 167–181, 2011.

KAWAI, Hiroshi et al. Time of administration of acute or chronic doses of imipramine affects its antidepressant action in rats. **Journal of Circadian Rhythms**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2018.

KIM, Joshua et al. Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1636–1646, 2016.

KLUNE, Cassandra B.; JIN, Benita; DENARDO, Laura A. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility. **eLife**, [s. l.], v. 10, p. 1–33, 2021. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/64567>>

KOPPENSTEINER, Peter et al. Diminished Fear Extinction in Adolescents Is Associated With an Altered Somatostatin Interneuron–Mediated Inhibition in the Infralimbic Cortex. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 86, n. 9, p. 682–692, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.035>>

KORTE, S. M. et al. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 385–394, 1995.

LAKSHMINARASIMHAN, Harini; CHATTARJI, Sumantra. Stress Leads to Contrasting Effects on the Levels of Brain Derived Neurotrophic Factor in the Hippocampus and Amygdala. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e30481, 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030481>>. Acesso em: 9 set. 2021.

LAPLANTE, Patricia; DIORIO, Josie; MEANEY, Michael J. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 199–203, 2002.

LAURENT, Vincent; WESTBROOK, R. Frederick. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. **Learning and Memory**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 657–666, 2008.

LEDOUX, J. E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 2517–2529, 1988.

LEDOUX, Joseph E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 191–197, 1992.

LEDOUX, Joseph E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>>

LEEM, Yea-Hyun; YOON, Sang-Sun; JO, Sangmee Ahn. Imipramine Ameliorates Depressive Symptoms by Blocking Differential Alteration of Dendritic Spine Structure in Amygdala and Prefrontal Cortex of Chronic Stress-Induced Mice. **Biomolecules & Therapeutics**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 230–239, 2020. Disponível em: <<http://www.biomolther.org/journal/DOIx.php?id=10.4062/biomolther.2019.152>>

LIKHTIK, Ekaterina et al. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 106–113, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.3582>>

LIN, L. C.; SIBILLE, E. Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 377–387, 2015.

LIN, Xiaoxiao et al. c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 8, n. February, p. 92–102, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.02.001>>

LO IACONO, Luisa; CAROLA, Valeria. The impact of adolescent stress experiences on neurobiological development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 77, p. 93–103, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.040>>

LOWERY-GIONTA, Emily G. et al. Chronic stress dysregulates amygdalar output to the prefrontal cortex. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 139, p. 68–75, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.032>>

LUPIEN, Sonia J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009.

MACEDO, Carlos Eduardo et al. 5-HT₂- and D₁-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 177, n. 1, p. 100–108, 2007.

MARCINKIEWCZ, Catherine A. et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. **Nature**, [s. l.], v. 537, n. 7618, p. 97–101, 2016.

MARCINKIEWCZ, Catherine A. et al. Sex-dependent modulation of anxiety and fear by 5-HT_{1A} receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 3154–3166, 2019.

MAREK, Roger; SUN, Yajie; SAH, Pankaj. Neural circuits for a top-down control of fear and extinction. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 236, n. 1, p. 313–320, 2019.

MAREN, Stephen; FANSELOW, Michael S. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 142–149, 1997.

MAREN, Stephen; HOLMES, Andrew. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 58–79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.180>>

MCCORMICK, C. M.; GREEN, M. R. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models. **Neuroscience**, [s. l.], v. 249, p. 242–257, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063>>

MCCORMICK, Cheryl M.; MATHEWS, Iva Z. HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 220–233, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009130570600222X>>

MCEWEN, Bruce S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. SUPPL.2, p. 17180–17185, 2012.

MCEWEN, Bruce S. et al. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 3–12, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.014>>

MCEWEN, Bruce S.; GRAY, Jason D.; NASCA, Carla. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.001>>

MCEWEN, Bruce S.; MORRISON, John H. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. **Neuron**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 16–29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.028>>

MCGAUGH, James L. THE AMYGDALA MODULATES THE CONSOLIDATION OF MEMORIES OF EMOTIONALLY AROUSING EXPERIENCES. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–28, 2004. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>>

MCKLVEEN, Jessica M. et al. Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 80, n. 10, p. 754–764, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2101>>

MCKLVEEN, Jessica M. et al. “Braking” the Prefrontal Cortex: The Role of Glucocorticoids and Interneurons in Stress Adaptation and Pathology **Biological Psychiatry** Elsevier USA, , 2019.

MEIR DREXLER, Shira; WOLF, Oliver T. The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 142, p. 126–134, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.11.008>>

MIGUELEZ FERNÁNDEZ, Anabel M. M. et al. Prefrontal $\alpha 7$ nAChR Signaling Differentially Modulates Afferent Drive and Trace Fear Conditioning Behavior in Adolescent and Adult Rats. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1908–1916, 2021. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1941-20.2020>>

MILLER, Earl K.; COHEN, Jonathan D. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 167–202, 2001. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>>

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 14, p. 5573–5578, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705615105>>

MITRA, Rupshi et al. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 26, p. 9371–9376, 2005.

MORGAN, Amanda et al. Cyclooxygenase-2 inhibition reduces anxiety-like behavior and normalizes enhanced amygdala glutamatergic transmission following chronic oral corticosterone treatment. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 11, n. August, p. 100190, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100190>>

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], 1995.

NOVAES, Leonardo Santana et al. Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 98, n. July, p. 6–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.031>>

PAGE, Chloe E.; COUTELLIER, Laurence. Adolescent Stress Disrupts the Maturation of Anxiety-related Behaviors and Alters the Developmental Trajectory of the Prefrontal Cortex in a Sex- and Age-specific Manner. **Neuroscience**, [s. l.], v. 390, p. 265–277, 2018.

PARÉ, Denis. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 409–420, 2003.

PARIANTE, Carmine M.; MILLER, Andrew H. Glucocorticoid receptors in major depression: Relevance to pathophysiology and treatment. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 391–404, 2001.

PATTWELL, Siobhan S. et al. Dynamic changes in neural circuitry during adolescence are associated with persistent attenuation of fear memories. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, n. May, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11475>>

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates (6th ed.). **Academic Press**, [s. l.], 2007.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 274–285, 1992. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.106.2.274>>

PITMAN, Roger K. et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 769–787, 2012.

POPA, Daniela et al. Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 14, p. 6516–6519, 2010. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0913016107>>

RAINNIE, Donald G. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 69–85, 1999.

RAO, Rajnish P. et al. Glucocorticoids protect against the delayed behavioral and cellular effects of acute stress on the amygdala. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 466–475, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.008>>

RAUCH, Sheila A. M. et al. Cortisol awakening response in PTSD treatment: Predictor or mechanism of change. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 118, n. July 2019, p. 104714, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104714>>

REN, Jing et al. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. **Cell**, [s. l.], v. 175, n. 2, p. 472- 487.e20, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>>

RESSLER, Reed L.; MAREN, Stephen. Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 54, p. 54–59, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.012>>

REUL, J. M. H. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 2505–2511, 1985.

ROMEO, Russell D. Perspectives on stress resilience and adolescent neurobehavioral function. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 128–133, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.001>>

ROMEO, Russell D. The impact of stress on the structure of the adolescent brain: Implications for adolescent mental health. **Brain Research**, [s. l.], v. 1654, p. 185–191, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.021>>

ROOZENDAAL, Benno; MCEWEN, Bruce S.; CHATTARJI, Sumantra. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 423–433, 2009.

ROOZENDAALL, Benno; BOHUS, Béla; MCGAUGH, James L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 681–693, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453096000285>>

ROTLLANT, D.; ARMARIO, A. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Neuroscience**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 427–434, 2005.

RUIZ MARTINEZ, Raquel Chacon; RIBEIRO DE OLIVEIRA, Amanda; BRANDÃO, Marcus Lira. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 58–65, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107474270500078X>>

SALES, Amanda J.; JOCA, Sâmia R. L. Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 343, n. October 2017, p. 8–15, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.022>>

SANTINI, Edwin; QUIRK, Gregory J.; PORTER, James T. Fear Conditioning and Extinction Differentially Modify the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 28, n. 15, p. 4028–4036, 2008. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2623-07.2008>>

SANTOS, Julia M.; MARTINEZ, Raquel C. R.; BRANDÃO, Marcus L. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 542, n. 1–3, p. 121–128, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299906006352>>

SAZMA, Matthew A.; SHIELDS, Grant S.; YONELINAS, Andrew P. The effects of post-encoding stress and glucocorticoids on episodic memory in humans and rodents. **Brain and Cognition**, [s. l.], v. 133, n. August 2018, p. 12–23, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2018.10.005>>

SEIDENBECHER, Thomas et al. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science**, [s. l.], v. 301, n. 5634, p. 846–850, 2003.

SENGUPTA, Ayesha; HOLMES, Andrew. A Discrete Dorsal Raphe to Basal Amygdala 5-HT Circuit Calibrates Aversive Memory. **Neuron**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 489–505.e7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.029>>

SIERRA-MERCADO, Demetrio; PADILLA-COREANO, Nancy; QUIRK, Gregory J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 529–538, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.184>>

SILVA, Bianca A.; GROSS, Cornelius T.; GRÄFF, Johannes. The neural circuits of innate fear: Detection, integration, action, and memorization. **Learning and Memory**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 544–555, 2016.

SKÓRZEWSKA, Anna et al. The effects of acute corticosterone administration on anxiety, endogenous corticosterone, and c-Fos expression in the rat brain. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 317–325, 2007.

SOLER-CEDEÑO, Omar et al. Contextual fear conditioning depresses infralimbic excitability. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 130, p. 77–82, 2016.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763400000142>>

STEIN, Cornelia; DAVIDOWA, Helga; ALBRECHT, Doris. 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT2 as well as 5-HT3 receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. **Synapse**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 328–337, 2000.

SULLIVAN, G. M. et al. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. **Neuroscience**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 7–14, 2004.

TOLEDO-RODRIGUEZ, Maria et al. Stress during puberty boosts metabolic activation associated with fear-extinction learning in hippocampus, basal amygdala and cingulate cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 93–101, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2012.05.006>>

TOVOTE, Philip; FADOK, Jonathan Paul; LÜTHI, Andreas. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn3945>>

VERBITSKY, Alexander; DOPFEL, David; ZHANG, Nanyin. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41398-020-0806-x>>

VIDAL-GONZALEZ, Ivan et al. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 728–733, 2006. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.306106>>

VINCENT, Melanie Y. et al. Dorsal raphe nucleus glucocorticoid receptors inhibit tph2 gene expression in male C57BL/6J mice. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 665, n. November 2017, p. 48–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.041>>

VINCENT, Melanie Y.; JACOBSON, Lauren. Glucocorticoid receptor deletion from the dorsal raphe nucleus of mice reduces dysphoria-like behavior and impairs hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis feedback inhibition. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1671–1681, 2014.

WAIDER, Jonas et al. Serotonin Deficiency Increases Context-Dependent Fear Learning Through Modulation of Hippocampal Activity. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. April, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00245/full>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, [s. l.], p. 1–24, 2017.

XU, Chun et al. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 961–972.e16, 2016.

YANG, Yi Ling; CHAO, Po Kuan; LU, Kwok Tung. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 912–924, 2006.

YEHUDA, Rachel et al. Alterations in cortisol negative feedback inhibition as examined using the ACTH response to cortisol administration in PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 447–451, 2006.

YEHUDA, Rachel et al. Cortisol augmentation of a psychological treatment for warfighters with posttraumatic stress disorder: Randomized trial showing improved treatment retention and outcome. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 51, p. 589–597, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.08.004>>

YUEN, E. Y. et al. Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 156–170, 2011.

ZHANG, W.; ROSENKRANZ, J. A. Repeated restraint stress increases basolateral amygdala neuronal activity in an age-dependent manner. **Neuroscience**, [s. l.], v. 226, p. 459–474, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.051>>

ZHONG, Ping; YAN, Zhen. Differential Regulation of the Excitability of Prefrontal Cortical Fast-Spiking Interneurons and Pyramidal Neurons by Serotonin and Fluoxetine. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e16970, 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016970>>

ANEXO I – Submissão de manuscrito para publicação

Neuropharmacology

The resilience of adolescent male rats to acute stress-induced delayed anxiety is age-related and glucocorticoid release-dependent
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	elevated plus maze; light-dark box; metyrapone; HPA-axis; restraint stress
Corresponding Author:	Carolina Demarchi Munhoz, PhD University of São Paulo Institute of Biomedical Sciences Sao Paulo, BRAZIL
First Author:	Carolina Demarchi Munhoz, PhD
Order of Authors:	Carolina Demarchi Munhoz, PhD Authors and affiliations Rodrigo Campos-Cardoso Leonardo Santana Novaes Lívea Domela Godoy Nilton Barreto dos Santos Juliano Genaro Perfetti Willian Lazarini-Lopes Norberto Garcia-Cairasco Cláudia Maria Padovan
Abstract:	Recent studies have addressed how stressful experiences modulate physiological and behavioral responses. Adolescence is crucial to brain maturation, and several processes occur, leading individuals to increased susceptibility or resilience to aversive situations. Despite the well-described effects of stress in adult rodents, there is a lack of information about adolescents' response to acute stress. This work's goal was to understand how the development period affects the responses to acute stress. To this end, male adolescent rats (30 days old) were restrained for 2 hours, and anxiety-like behaviors were measured in the elevated plus-maze (EPM) and the light-dark box (LDB) tests. In the first experiment, adolescent rats were restrained and tested immediately or ten days later in the EPM. Another group of rats was treated with metyrapone before the stress session and tested immediately after. In the second experiment, adolescent male rats, in two different periods - early (30 days old) and mid-adolescence (40 days old), were treated with metyrapone before the stress session and tested immediately or ten days later in the LDB test. We found that only early adolescent male rats are resilient to delayed anxiety-like behavior in EPM and LDB tests. Metyrapone treatment increased the rats' exploration immediately and ten days after stress. These data suggest a specific age at which adolescent rats are resilient to the delayed effects of acute restraint stress and that the metyrapone treatment has long-term behavioral consequences.
Suggested Reviewers:	Russell Romeo, PhD Professor, Columbia University rromeo@bamard.edu Professor Romeo's research laboratory studies the impact of stress on the development of neural circuits important in emotional reactivity. Iliia Karatsoreos, PhD Associate Professor, University of Massachusetts Amherst ikaratsoreos@umass.edu Dr. Karatsoreos Lab investigate how the body's internal circadian clock, and stress response systems help maintain mental and physical health.