



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DO CICLO ESTRAL NO REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO EM RATOS *WISTAR*

MARINA GALLEAZZO MARTINS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

BOTUCATU – SP

2016



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DO CICLO ESTRAL NO
REFLEXO AUDITIVO DE SOBRESSALTO EM RATOS
WISTAR

MARINA GALLEAZZO MARTINS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Profª. Drª. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Martins, Marina Galleazzo.

Influência do gênero e do ciclo estral no reflexo auditivo de sobressalto em ratos *Wistar* / Marina Galleazzo Martins.
- Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Coorientador: Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Capes: 20702019

1. Reflexo de Sobressalto. 2. Proteínas Proto-Oncogênicas c-fos. 3. Estradiol. 4. Progesterona. 5. Tronco encefálico. 6. Ciclo estral. 7. Fêmea. 8. Macho. 9. Ratos *Wistar*. 10. Integração percepto-motora.

Palavras-chave: habituação intra-sessão; hormônios ovarianos; inibição por estímulo prévio; integração sensório-motora; proteína Fos.

MARINA GALLEAZZO MARTINS

INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DO CICLO ESTRAL NO REFLEXO AUDITIVO DE
SOBRESSALTO EM RATOS *Wistar*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Comissão examinadora:

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes
Faculdade de Odontologia – UNICAMP/Piracicaba

Dr^a. Yuri Karen Sinzato
Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu

Botucatu, 03 de março de 2016.

Ào vô Lilo.

Agradecimentos

Aos meus pais, Telma e Henrique, meus exemplos de amor, dedicação, perseverança, carinho e atenção. Não existem palavras para descrever a minha gratidão a vocês, por comemorarem ao meu lado cada conquista, mas por também serem a minha fortaleza nos dias mais difíceis. Obrigada por sempre incentivarem a paixão pelos livros, pela Arte, e a busca de novos caminhos. Um agradecimento especial ao meu pai, pela criação da macro sem a qual não conseguiria realizar todas as análises apresentadas.

À minha querida vó Eva, que, mesmo sem saber, me ensinou sobre a força que cada um tem dentro de si, que momentos difíceis são apenas pequenos intervalos entre bons momentos, e que a caminhada fica mais leve e prazerosa quando temos ao nosso lado pessoas pelas quais vale a pena lutar.

Ao meu orientador, Professor Doutor José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, por ter me ensinado que só alcançamos o sucesso porque amamos o que fazemos. Obrigada por mais um capítulo da minha vida científica, que me tornou mais profissional, mais consciente das nossas responsabilidades perante os outros, e mais feliz. Obrigada pela dedicação, atenção e por apostar tanto em nós, sem nunca nos desanimar.

À minha co-orientadora, a Professora Doutora Camila Contin Diniz de Almeida Francia, sempre presente para me auxiliar nas dificuldades, esclarecendo minhas dúvidas e com palavras de incentivo durante cada etapa conquistada.

À Carla, pelo no sinergismo dentro e fora do laboratório, pelas dificuldades do dia a dia que superamos juntas, e ainda mais por compartilhar todas as alegrias.

À Lari, minha irmã postiça, que esteve ao meu lado em momentos que definiram nossas escolhas futuras e se manteve por perto mesmo quando seguimos caminhos diferentes.

Aos meus presentes de Botucatu, Amanda, André, Cris e Juliana, pelos almoços, pelas risadas, por se tornarem minha família na Terra do Nunca, e por receberem sempre tão bem os meus pais.

À querida Pâmela, que me auxiliou na coleta dos dados comportamentais, mesmo aos fins de semana, no inverno. Foram muitos dias de trabalho intenso mas sempre com dedicação, risadas e muitas conversas e troca de experiências.

Aos colegas pós-graduandos do Departamento de Anatomia, pelos momentos de descontração, mas também frustração. À Veridiana pelos cafés, pães e reuniões no meio do corredor, um pequeno descanso da rotina sempre corrida.

À Secretária do Departamento de Anatomia, Cristiane Abe, pelas conversas, risadas e pelo apoio em momentos tão corridos. Obrigada por ser uma segunda mãe para os alunos.

Aos professores do Departamento de Anatomia que sempre estiveram dispostos a compartilhar seus conhecimentos, suas trajetórias e seu amor à Anatomia: Professora Doutora Cintia

Yuri Matsumura, Professora Doutora Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Professora Doutora Raquel Fantin Domeniconi, Professor Doutor Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Professor Doutor Renato Ferretti.

À Professora Doutora Ana Carolina Inhasz Kiss e ao Professor Doutor Rodrigo Egydio Barreto por suas contribuições e discussões durante o Exame de Qualificação.

À Professora Doutora Débora Damasceno e à Doutora Yuri Karen Sinzato, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela troca de experiências, discussões e auxílio na execução do protocolo de ELISA.

Ao Professor Titular Carlos Roberto Padovani, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, e ao Professor Doutor Sérgio Augusto Rodrigues, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos profissionais da Área de Fotografia do Câmpus de Botucatu, Silvio e Silvinho, pela atenção e cuidado na aquisição de tratamento das fotos das peças anatômicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2008/02771-6 e 2014/03890-0) pelo auxílio financeiro.

*“A descoberta consiste não em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
OBJETIVO.....	19
DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Animais de experimentação e seu manuseio	21
Estadiamento do ciclo estral	21
Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e da inibição por estímulo prévio.....	22
Dosagem plasmática de estradiol e progesterona.....	24
Imuno-histoquímica para a proteína Fos	24
Avaliação dos órgãos genitais internos das fêmeas	27
ANÁLISE DOS DADOS.....	28
Estadiamento do ciclo estral	28
Relação entre ciclo estral e ASR.....	29
Imuno-histoquímica para a proteína Fos	29
Análises estatísticas.....	30
Apresentação das ilustrações científicas	30
RESULTADOS	32
Estadiamento do ciclo estral e análise do peso dos órgãos genitais internos.....	32
Dosagem plasmática de estradiol e progesterona.....	33
Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e sua inibição por estímulo prévio.....	34
Imunorreatividade à proteína Fos nos gêneros e ao longo do ciclo estral	41
DISCUSSÃO	47
Estadiamento do ciclo estral	47
Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e sua inibição por estímulo prévio.....	47
Imunorreatividade à proteína Fos nos gêneros e ao longo do ciclo estral	52
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE LAVADOS VAGINAIS	62
APÊNDICE B – PROTOCOLO DE MENSURAÇÃO DO ASR E PPI	63
APÊNDICE C – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS FOS-IR	65
APÊNDICE D – PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS.....	66
APÊNDICE E – PROTOCOLO DE CONTAGEM DE NEURÔNIOS FOS-IR	68
APÊNDICE F – ESTATÍSTICA DESCRITIVA.....	69
ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS.....	85

RESUMO

O reflexo auditivo de sobressalto (ASR) é uma contração rápida e intensa da musculatura estriada esquelética da face e do corpo frente a um estímulo sonoro inesperado e de alta intensidade. O ASR pode ser modificado em diversas condições, como na inibição por estímulo prévio (PPI), que se caracteriza pela diminuição da amplitude do ASR quando o estímulo sonoro de alta intensidade é precedido por um estímulo de menor intensidade. As respostas de ASR e PPI são avaliadas de forma não invasiva no homem e em roedores com grande homologia e têm sido utilizadas na pesquisa básica e clínica. Além disso, se encontram alteradas em diversas afecções neurológicas e psiquiátricas que apresentam déficits no processamento sensorio-motor. No homem, existem diferenças na PPI relacionadas ao gênero, que refletem as variações hormonais ao longo do ciclo menstrual. Entretanto, estudos em roedores se mostram conflitantes em relação às diferenças no ASR e na PPI entre machos e fêmeas, raramente mencionando as possíveis variações ao longo do ciclo estral, o que dificulta a interpretação de resultados experimentais em fêmeas e a sua translação para os resultados obtidos no homem. Para avaliar a influência do gênero e das fases do ciclo estral no ASR, foram estudados 10 machos e 28 fêmeas de ratos *Wistar* adultos. O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado diariamente e todos os animais foram submetidos a sessões de avaliação do ASR e PPI. Nas fêmeas, as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona foram dosadas. Os encéfalos de 3 machos e 3 fêmeas em cada fase do ciclo estral foram processados para detecção da proteína Fos por imuno-histoquímica. Não houve influência do gênero ou fase do ciclo estral sobre a amplitude normalizada e latência do pico máximo do ASR. Os machos não diferem das fêmeas quanto à %PPI; contudo, as fêmeas em proestro apresentaram menor %PPI do que fêmeas em diestro quando o pré-pulso utilizado foi maior ou igual a 70 dB, observando-se associação direta entre os níveis de progesterona e o conjunto de %PPI. A habituação intrassessão do ASR foi observada em machos e fêmeas em metaestro e na transição proestro-estro, embora também houvesse diminuição significativa da amplitude do ASR no Bloco Final da sessão nas fêmeas em diestro. O número de neurônios imunorreativos à proteína Fos (FOS-ir) não sofre alterações no núcleo coclear dorsal, no locus coeruleus e no núcleo central do colículo inferior entre os gêneros e fases do ciclo estral. Nos núcleos ventral e medial do corpo trapezoide, pedunculopontino tegmental, cuneiforme, A5 e no córtex externo do colículo inferior, as fêmeas em proestro têm mais neurônios FOS-ir. Assim, em trabalhos que pretendam avaliar a %PPI entre machos e fêmeas, é importante estadiar o ciclo estral para que a análise dos dados seja realizada levando-se em consideração o seu estadiamento. O tamanho ideal da sessão de avaliação do ASR/PPI e a configuração dos blocos Inicial e Final também variam em função do ciclo estral. Os resultados desse trabalho são importantes para o delineamento de estudos que utilizem o ASR e a PPI como ferramentas na avaliação de déficits na integração sensorio-motora em ratos *Wistar* machos e fêmeas, a fim de aprimorar estudos translacionais.

Palavras-chave: integração sensorio-motora, inibição por estímulo prévio, habituação intrassessão, proteína Fos, hormônios ovarianos

ABSTRACT

Influence of gender and estrous cycle in the acoustic startle reflex in *Wistar* rats

The acoustic startle reflex (ASR) is a fast and intense motor reaction that promotes skeletal striated muscles contraction of face and body, in response to an unexpected and high-intensity sound stimulus. The ASR has many modulations such as prepulse inhibition (PPI) which is characterized by reduced amplitude of ASR when the triggering sound stimulus is preceded by a lower-intensity stimulus. The ASR and PPI responses can be measured non-invasively in humans and rodents with high homology and have been used for basic and clinical research. Additionally, they are disrupted in many neurological and psychiatric conditions that show deficits in sensorimotor processing. In humans, it is known that there are gender-related differences in PPI, which reflect hormonal changes that occur during the menstrual cycle. However, studies in rodents are conflicting regarding the differences in ASR and PPI between males and females, rarely mentioning the possible variations during the estrous cycle. This fact makes it difficult to interpret experimental results in females and their translation to results obtained in humans. To assess the influence of gender and estrous cycle in ASR, 10 males and 28 females adult *Wistar* rats were studied. Females' estrous cycle was monitored daily and all animals were subjected to sessions of ASR and PPI evaluation. In females, estradiol and progesterone plasmatic concentrations were determined. The brains of 3 males and 3 females in each phase of the estrous cycle were processed for Fos protein immunohistochemistry. There was no influence of gender or estrous cycle phases on the ASR normalized amplitude and latency to maximum peak. Males do not differ from females in relation to %PPI. However, females in proestrus show lower %PPI than females in diestrus when the prepulse is greater than or equal to 70dB. Furthermore, we could observe direct association between progesterone levels and %PPI as a set. ASR short-term habituation has been observed in males and females in metestrus and transition proestrus-estrus, although there was also a significant amplitude decrease at the session's Final Block in females in diestrus. The number of Fos immunoreactive neurons (FOS-ir) in the dorsal cochlear nucleus, locus coeruleus and central nucleus of inferior colliculus does not change between gender and estrous cycle. In the ventral and medial nucleus of the trapezoid body, pedunculo-pontine tegmental, cuneiform nucleus, A5 and external cortex of inferior colliculus, females in proestrus have the largest number of FOS-ir neurons. Therefore, studies interested in assessing %PPI between males and females should take into account the stage the estrous cycle for data analysis. The ideal size of the ASR/PPI evaluation session and the Initial and Final blocks set also vary depending on the estrous cycle. Our findings are important to design studies using ASR and PPI in males and females *Wistar* rats as tools for assessing deficits in sensorimotor integration and to improve of translational studies.

Keywords: sensorimotor integration, prepulse inhibition, short-term habituation, Fos protein, ovarian hormones

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do reflexo auditivo de sobressalto no rato.....	14
Figura 2. Esquema do circuito elementar do ASR em um corte sagital mediano do encéfalo do rato.....	15
Figura 3. Registro da amplitude do reflexo auditivo de sobressalto (ASR) e da amplitude de sobressalto após inibição por estímulo prévio (PPI).....	16
Figura 4. Esquema do desenho experimental indicando o fluxo de desenvolvimento do projeto de pesquisa e seus principais procedimentos (indicados nas caixas).....	20
Figura 5. Neurônios imunorreativos à proteína Fos no núcleo coclear dorsal em diferentes intervalos entre a avaliação do ASR e a eutanásia.....	26
Figura 6. Fotomicrografias do lavado vaginal nas diferentes fases do ciclo estral e suas transições.....	28
Figura 7. Gráfico do peso médio dos órgãos genitais internos das fêmeas nas fases do ciclo estral.....	32
Figura 8. Fotos dos órgãos genitais internos em diferentes fases do ciclo estral.....	33
Figura 9. Gráfico da concentração plasmática de estradiol (pg/ml) nas fêmeas ao longo do ciclo estral.....	34
Figura 10. Gráfico da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) nas fêmeas ao longo do ciclo estral e suas transições.....	34
Figura 11. Gráfico do peso corporal de machos e fêmeas.....	35
Figura 12. Gráficos da amplitude normalizada do ASR entre os blocos de tentativas apresentados em uma sessão de avaliação comportamental, fixando-se o gênero ou as fases do ciclo estral.....	36
Figura 13. Gráficos da amplitude normalizada de ASR entre gêneros e fases do ciclo estral fixando-se os blocos da sessão (Inicial, Avaliação ASR/PPI e Final).....	38
Figura 14. Gráficos da porcentagem de PPI com pré-estímulos de 65, 70 e 75dB em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.....	39
Figura 15. Neurônios FOS-ir nos núcleos da via auditiva e regiões sabidamente relacionadas às vias de ASR/PPI.....	43
Figura 16. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no VNTB. O número de neurônios nas fêmeas em proestro é maior do que nas fêmeas em estro e diestro.....	44
Figura 17. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no PPTg.....	45
Figura 18. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no CnF.....	45
Figura 19. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no A5.....	46
Figura 20. Proposta de configuração do tamanho dos blocos da sessão de avaliação do ASR para machos e fêmeas em cada fase do ciclo estral.....	52

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Características da sessão de avaliação do ASR, PPI e habituação intrassessão.	23
Quadro 2. Distribuição qualitativa dos neurônios FOS-ir no tronco encefálico de machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.	41
Quadro 3. Diferenças quanto ao número de neurônios e densidade neuronal encontradas nos núcleos selecionados para contagem de neurônios FOS-ir.	44
Tabela 1. Tabela descritiva da porcentagem de PPI em cada grupo experimental com os três pré-pulsos utilizados.	37
Tabela 2. Tabela das correlações entre os níveis plasmáticos de estradiol e as variáveis comportamentais.	40
Tabela 3. Tabela das correlações entre os níveis plasmáticos de progesterona e as variáveis comportamentais.	40
Tabela 4. Cargas canônicas e cargas canônicas cruzadas da associação entre as variáveis hormonais e as %PPI em fêmeas.	40
Tabela 5. Densidade de neurônios FOS-ir encontradas nos núcleos selecionados para contagem.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

A5 – grupamento noradrenérgico A5	M-D – transição metaestro-diestro
ASR – reflexo auditivo de sobressalto	MiTg – núcleo tegmental microcelular
BIC – núcleo do braço do colículo inferior	MnR – núcleo mediano da rafe
CG – área cinzenta central	MNTB – núcleo medial do corpo trapezoide
CGA – parte alfa da área cinzenta central	MPL – núcleo paralemniscal
CGO – núcleo O da área cinzenta central	mRT – formação reticular mesencefálica
CGPn – área cinzenta central da ponte	MVe – núcleo vestibular medial
CIC – núcleo central do colículo inferior	P – proestro
CnF – núcleo cuneiforme	P-E – transição proestro-estro
Com – núcleo comissural	Pa5 – núcleo paratrigeminal
CRN – neurônios da raiz coclear	PAG – substância cinzenta periaquedutal
Cu – núcleo cuneado	PCRt – núcleo reticular parvicelular
D - diestro	PDTg – núcleo tegmental posterodorsal
DCIC – córtex dorsal do colículo inferior	Pn – núcleos pontinos
DCN – núcleo coclear dorsal	PnC – núcleo reticular caudal da ponte
DLL – núcleo dorsal do lemnisco lateral	PnO – núcleo reticular oral da ponte
DMTg – área tegmental dorsomedial	PPI – inibição por estímulo prévio
DPO – área periolivar dorsal	PPTg – núcleo pedunculo pontino tegmental
DpSC – camada profunda do colículo superior	PPy – núcleo parapiramidal
DR – núcleo dorsal da rafe	Pr5VL – núcleo sensitivo principal do trigêmeo
DTg – núcleo tegmental dorsal	RMg – núcleo magno da rafe
E – estro	ROb – núcleo obscuro da rafe
E-M – transição estro-metaestro	RPa – núcleo pálido da rafe
ECIC – córtex externo do colículo inferior	RtTg – núcleo reticulotegmental da ponte
ECu – núcleo cuneado externo	RVL – núcleo reticular rostroventrolateral
FOS-ir – neurônios imunorreativos à proteína Fos	SC – colículo superior
GrCb – camada granular do cerebelo	SGe – núcleo supragenua
GrDC – camada granular do núcleo coclear dorsal	Sol – núcleo do trato solitário
ILL – núcleo intermediário do lemnisco lateral	Sp5 – núcleo espinal do nervo trigêmeo
IO – oliva inferior	SPL – <i>sound pressure level</i>
IRt – núcleo reticular intermediário	SPON – núcleo paraolivar superior
KF – núcleo Kölliker-Fuse	SpVe – núcleo vestibular espinal
LC – locus ceruleus	SubB – núcleo sub-braquial
LDTg – núcleo tegmental laterodorsal	SubCV – núcleo subceruleus ventral
LNTB – núcleo lateral do corpo trapezoide	TrLL – núcleo triangular do lemnisco lateral
LPBC – núcleo parabraquial lateral	VCP – núcleo coclear ventral
LPGi – núcleo paragigantocelular lateral	VLL – núcleo ventral do lemnisco lateral
LRT – núcleo reticular lateral	VNTB – núcleo ventral do corpo trapezoide
LSO – núcleo lateral da oliva superior	X – núcleo X
M – metaestro	

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O reflexo auditivo de sobressalto (ASR) é uma reação motora rápida e intensa que resulta na contração da musculatura estriada esquelética da face e do corpo frente a um estímulo sonoro inesperado e de alta intensidade (KOCH, 1999). O ASR é um reflexo acústico-motor desencadeado por estruturas do tronco encefálico, que está presente em diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem.

Em roedores, esse reflexo promove o encurtamento do comprimento total do animal e aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, mediadas pelo sistema nervoso autônomo (BAUDRIE et al., 1997; KOCH, 1999). No homem, o sobressalto é descrito como uma contração generalizada dos músculos da face, pescoço e parte proximal do membro superior.

Ele possui um caráter defensivo frente a uma provável agressão ou de alerta perante acontecimentos inesperados. Em conjunto, as contrações musculares levam o animal a adotar uma postura de defesa, protegendo partes vitais do corpo como face, pescoço e abdome (Figura 1).

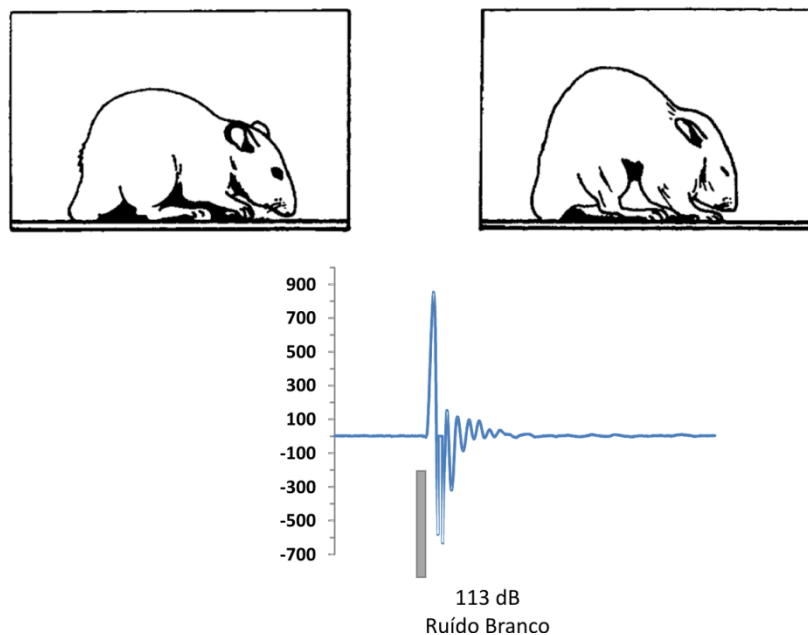


Figura 1. Esquema do reflexo auditivo de sobressalto no rato. Após ser estimulado por um som inesperado e de alta intensidade, o animal contrai a musculatura da face, pescoço e corpo para assumir uma postura defensiva (acima). Abaixo, gráfico da amplitude de resposta frente à apresentação de um estímulo sonoro de alta intensidade (113 dB). Modificado de Koch (1999).

No rato, o circuito elementar do ASR é constituído pelos neurônios do gânglio espiral, os neurônios da raiz coclear (CRN), o núcleo reticular caudal da ponte (PnC) e motoneurônios da medula espinal ou do tronco encefálico (LEE et al., 1996; KOCH, 1999) (Figura 2).

A latência do ASR é muito curta, entre 5 e 10ms no homem (KOCH, 1999) e aproximadamente 8ms no rato (ISON et al., 1973; DAVIS et al., 1982), quando medida por eletromiografia. O ASR é desencadeado por estímulos de alta intensidade (acima de 80 dB SPL) e em um amplo espectro de frequências, como o ruído branco, o principal estímulo acústico utilizado para desencadeá-lo experimentalmente (PILZ et al., 1987; KOCH, 1999).

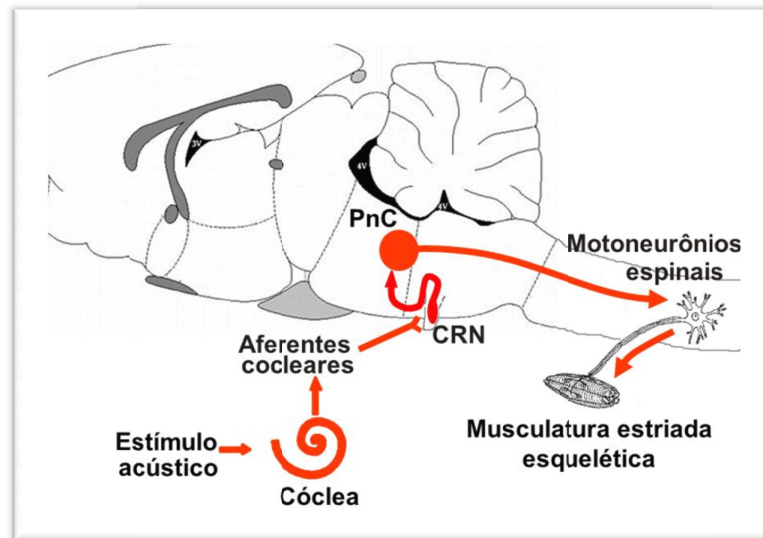


Figura 2. Esquema do circuito elementar do ASR em um corte sagital mediano do encéfalo do rato. Modificado de Barioni (2015).

Além do valor adaptativo dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência do indivíduo, o ASR e suas modulações dependem de processos de integração sensório-motora que são de grande interesse para a pesquisa básica e clínica (HOFFMAN e ISON, 1980; WILKINS et al., 1986).

O ASR pode ser modificado, qualitativamente e quantitativamente, por diversas condições fisiológicas, patológicas e experimentais (SWERDLOW et al., 2000; BELL et al., 2003), revelando a sua plasticidade. Ele é uma ferramenta experimental amplamente utilizada por ser um comportamento mensurável sem a utilização de técnicas invasivas. Geralmente, as modulações do sobressalto são mais sensíveis a alterações do que o próprio reflexo (HOFFMAN e ISON, 1980).

A amplitude de ASR pode diminuir por habituação ao estímulo (GONZALEZ-LIMA et al., 1989; PILZ e SCHNITZLER, 1996), por um estímulo prévio de menor intensidade (HOFFMAN e FLESHLER, 1963; BRAFF et al., 2001; FENDT et al., 2001), e pela administração de substâncias químicas (SWERDLOW e GEYER, 1993a). Em contrapartida, o reflexo pode ser intensificado em condições de potenciação por medo (ANISMAN et al., 2000; DAVIS, 2006; WINSLOW et al., 2007) e ansiedade (KAVIANI et al., 2004).

A amplitude do ASR também é influenciada pelo ciclo estral em ratas em situações de potenciação por medo. Fêmeas *Sprague-Dawley* em diestro expostas ao contexto de medo têm mais respostas de sobressalto do que fêmeas controles em diestro, assim como o contexto aversivo também diminui a amplitude do ASR nas fêmeas em estro (BECK et al., 2008).

Na clínica neurológica e psiquiátrica, por exemplo, são registradas alterações nas modulações do ASR na esquizofrenia (BRAFF et al., 2001), depressão (KAVIANI et al., 2004; GRILLON et al., 2005), estágios avançados da doença de Parkinson (PERRIOL et al., 2005), doença de Huntington (SWERDLOW et al., 1995), transtorno do estresse pós-traumático (GRILLON et al., 1996), transtorno do pânico (LUDEWIG et al., 2002), e estados de dependência de drogas, como opiáceos (MANSBACH et al., 1992; BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1994) e álcool (GRILLON et al., 1994).

Entre as principais modulações do ASR, destaca-se a inibição por estímulo prévio (PPI), que se caracteriza pela diminuição ou abolição do reflexo quando o estímulo sonoro desencadeante é precedido por um estímulo sensorial (sonoro, visual ou tátil) de baixa intensidade, que, isoladamente, não desencadearia o reflexo (Figura 3).

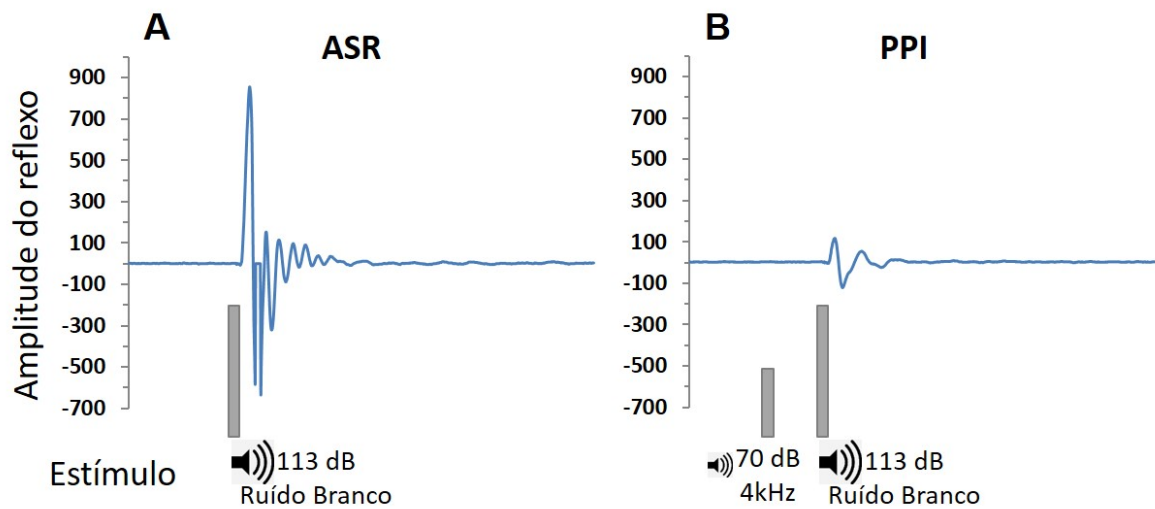


Figura 3. Registro da amplitude do reflexo auditivo de sobressalto (ASR) e da amplitude de sobressalto após inibição por estímulo prévio (PPI). Em A, a apresentação de um estímulo sonoro de alta intensidade (113 dB) desencadeia uma resposta de sobressalto no animal com grande amplitude. Em B, a amplitude do reflexo diminui após o estímulo sonoro desencadeante ser precedido por um estímulo sonoro de menor intensidade (70 dB).

Os circuitos neurais que medeiam a PPI ainda não foram totalmente esclarecidos, mas envolvem estruturas do tronco encefálico, com importante participação do colículo inferior (DAVIS e GENDELMAN, 1977; LI et al., 1998) e da projeção colinérgica inibitória do núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg) ao PnC (FENDT et al., 2001). Até o momento, entretanto, nenhum dos circuitos propostos explica adequadamente todos os fenômenos associados à PPI (FENDT et al., 2001; SWERDLOW et al., 2001; YEOMANS et al., 2006), sobretudo em curtos intervalos entre os estímulos, como 25ms (GOMEZ-NIETO et al., 2013).

No homem, existem diferenças na PPI relacionadas ao gênero, que refletem as variações hormonais ao longo do ciclo menstrual. Assim, mulheres apresentam maior %PPI durante a fase folicular em relação à fase lútea (SWERDLOW et al., 1997; JOVANOVIC et al., 2004), isto é, durante o período de maior concentração plasmática de estradiol.

A avaliação da PPI apresenta um alto grau de homologia filogenética entre roedores e o homem, sendo utilizada como variável para medir a integração sensorio-motora em estudos básicos e clínicos, nos quais há especial ênfase em estudos relacionados à esquizofrenia, já que a avaliação da PPI pode ser utilizada para o estadiamento clínico da doença, pois cursa com evidente diminuição ao longo de sua progressão, tanto em pacientes quanto em modelos experimentais (BRAFF et al., 2001).

Assim como a PPI, as flutuações hormonais também estão relacionadas à progressão dessa doença, sugerindo-se que os hormônios ovarianos confirmam maior proteção às mulheres (BRAFF et al., 2005) e sejam responsáveis pela grande incidência da doença entre os 45 e 49 anos, que corresponde ao início da menopausa, bem como pelo aparecimento tardio de sintomas psicóticos (ANGERMEYER e KUHN, 1988; HAFNER et al., 1993; SEEMAN, 1997). As baixas concentrações de

estradiol também condizem com o agravamento de sintomas nos períodos pré-menstrual e do pós-parto (HAFNER et al., 1993; RIECHER-ROSSLER et al., 1994)

Além da esquizofrenia, o ASR e a PPI são ferramentas utilizadas no estudo de outras enfermidades com déficits na integração sensório-motora, como os distúrbios de ansiedade, que também apresentam incidência e sintomas variáveis em relação ao gênero, sendo mais frequentes em mulheres (SEEMAN, 1997). Pacientes que sofrem de Transtorno Disfórico Pré-menstrual, por exemplo, apresentam maior amplitude do ASR em todas as fases do ciclo menstrual, se comparadas ao grupo controle, assim como menor %PPI na fase lútea, mas não na fase folicular (KASK et al., 2008).

Assim como diversos fatores biológicos e patológicos podem afetar as respostas de ASR e PPI no homem, o modelo experimental mais utilizado em estudos de integração sensório-motora, o rato albino (KOCH, 1999), também pode ser suscetível a essas variações durante o ciclo estral, já que a concentração de estradiol é de 45 pg/ml na manhã do proestro e 88 pg/ml na noite do proestro, enquanto que a de progesterona está entre 46 e 55 ng/ml na noite do proestro (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975).

Entretanto, estudos em roedores são contraditórios em relação à influência do gênero e das fases do ciclo estral na resposta comportamental do ASR e da PPI. Assim, alguns estudos não revelaram diferenças na PPI entre machos e fêmeas adultos de ratos *Sprague-Dawley* (SWERDLOW et al., 1993; ADAMS et al., 2008) e *Wistar* (PALENICEK et al., 2010).

Por outro lado, outros estudos mostraram maior %PPI em ratos machos *Long-Evans* e *Sprague-Dawley* púberes (FARADAY et al., 1999) e ratos *Wistar* adultos (LEHMANN et al., 1999). Contudo, esses trabalhos não levaram em consideração a possível variação das respostas comportamentais durante o ciclo estral das fêmeas. Análises da PPI entre machos e fêmeas adultos, com observação de algumas fases do ciclo estral, mostram que as fêmeas apresentaram diminuição da %PPI na fase de proestro em ratos *Sprague-Dawley* (KOCH, 1998) ou diestro no caso de ratos *Long-Evans* (KINKEAD et al., 2008).

Ratas *Sprague-Dawley* ovariectomizadas têm maior amplitude do ASR e aumento da %PPI após o tratamento agudo com estradiol (VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001), enquanto que o tratamento crônico não provoca alterações (VAILLANCOURT et al., 2002). Em ratos machos *Wistar* controles, a administração de progesterona diminui a amplitude do ASR, sem afetar a PPI (RUPPRECHT et al., 1999). A administração de estradiol em machos *Sprague-Dawley* orquiectomizados também diminui a amplitude do ASR (TURVIN et al., 2007).

Ainda que o sobressalto e suas modulações possam ser alterados em diversas condições experimentais, as fêmeas são geralmente excluídas dos estudos fisiológicos, farmacológicos e comportamentais (ADAMS et al., 2008; SIMPSON e KELLY, 2012), no intuito de eliminar o efeito das flutuações hormonais, o que dificulta a utilização dessa ferramenta experimental em modelos animais voltados ao estudo de condições humanas.

Entretanto, a existência de diferenças sexuais em transtornos psiquiátricos, para os quais o ASR e a PPI são utilizados como comportamentos preditivos, indica que essas influências devam ser investigadas tanto na pesquisa clínica quanto na básica (CAHILL, 2006). Ressaltam-se, também, as

indicações do *Institute of Medicine* (EUA) para elaboração de estudos que levem em consideração o gênero como uma variável inerente, humana e animal (INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.). COMMITTEE ON UNDERSTANDING THE BIOLOGY OF SEX AND GENDER DIFFERENCES, 2001).

Além do estudo das diferenças na amplitude de ASR e %PPI entre machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, seria interessante correlacionar as variáveis comportamentais aos níveis plasmáticos dos hormônios ovarianos no momento da avaliação comportamental e à ativação de centros neurais que subsidiam a integração sensório-motora. Nesse sentido, a imunorreatividade à proteína Fos tem sido utilizada como marcador da atividade neuronal em estudos sobre o ciclo estral (JENNES et al., 1992; CONDE et al., 1995) e núcleos dos circuitos do ASR e PPI (TAKAHASHI et al., 2007).

A proteína Fos é produto do proto-oncogene *c-fos*, expresso nos núcleos de neurônios após diferentes estímulos. Estudos indicaram que ela é um fator de transcrição que converte estímulos externos de curta duração em eventos genéticos intracelulares prolongados (HOFFMAN et al., 1993b; CHEN et al., 2000; HOFFMAN e LYO, 2002; KOVACS, 2008). Acreditamos que a detecção da proteína Fos é importante para verificar possíveis diferenças na atividade neuronal em núcleos relacionados ao ASR e PPI entre os gêneros e as fases do ciclo estral.

Portanto, é importante levar em considerações possíveis diferenças no ASR e na PPI em fêmeas devido à ampla utilização desse reflexo em estudos de déficits na integração sensório-motora, comuns em muitas doenças, a fim de aprimorar o delineamento de futuros estudos básicos e translacionais que utilizem o ASR como ferramenta experimental (FARADAY e GRUNBERG, 2000; BEERY e ZUCKER, 2011). Além disso, é fundamental aprimorar os protocolos com modelos animais que podem auxiliar no esclarecimento da etiologia de diversas enfermidades neuropsiquiátricas, bem como torná-los mais adequados a ensaios farmacológicos (MUELLER et al., 2014).

OBJETIVO

Avaliar, em ratos *Wistar*, a influência do gênero e das fases do ciclo estral das fêmeas na resposta do reflexo auditivo de sobressalto, incluindo algumas de suas modulações como a inibição por estímulo prévio e a habituação intrassessão, bem como a atividade de núcleos e regiões do tronco encefálico envolvidos nos circuitos neurais do ASR e da PPI.

DESENHO EXPERIMENTAL

Para avaliar a influência do gênero e das fases do ciclo estral no ASR em ratos *Wistar*, estudamos 10 machos e 28 fêmeas adultos, entre 100 e 150 dias de idade. Inicialmente, ambos os grupos passaram por um período de habituação ao experimentador, com as manipulações necessárias à avaliação do ASR e PPI e coleta do lavado vaginal, no caso das fêmeas.

Na fase experimental, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado diariamente e os animais submetidos a sessões repetidas de avaliação comportamental. Nas fêmeas, após cada mensuração comportamental, foi coletada uma amostra de sangue para dosagem plasmática de estradiol e progesterona (Figura 4).

Finalizada a etapa de avaliação comportamental, após um intervalo mínimo de 15 dias, 3 machos e 3 fêmeas em cada fase do ciclo estral passaram novamente por uma sessão de avaliação de ASR e PPI e foram perfundidos para detecção imuno-histoquímica proteína Fos em núcleos participantes dos circuitos neurais do ASR e da PPI (Figura 4).

Dessa forma, estudamos a relação entre o gênero e a fase do ciclo estral das fêmeas (estadiada pelo lavado vaginal), com a mensuração comportamental do ASR, PPI e habituação intrassessão, os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona e a ativação neuronal dos núcleos do tronco encefálico envolvidos com o ASR e PPI, por meio da proteína Fos.

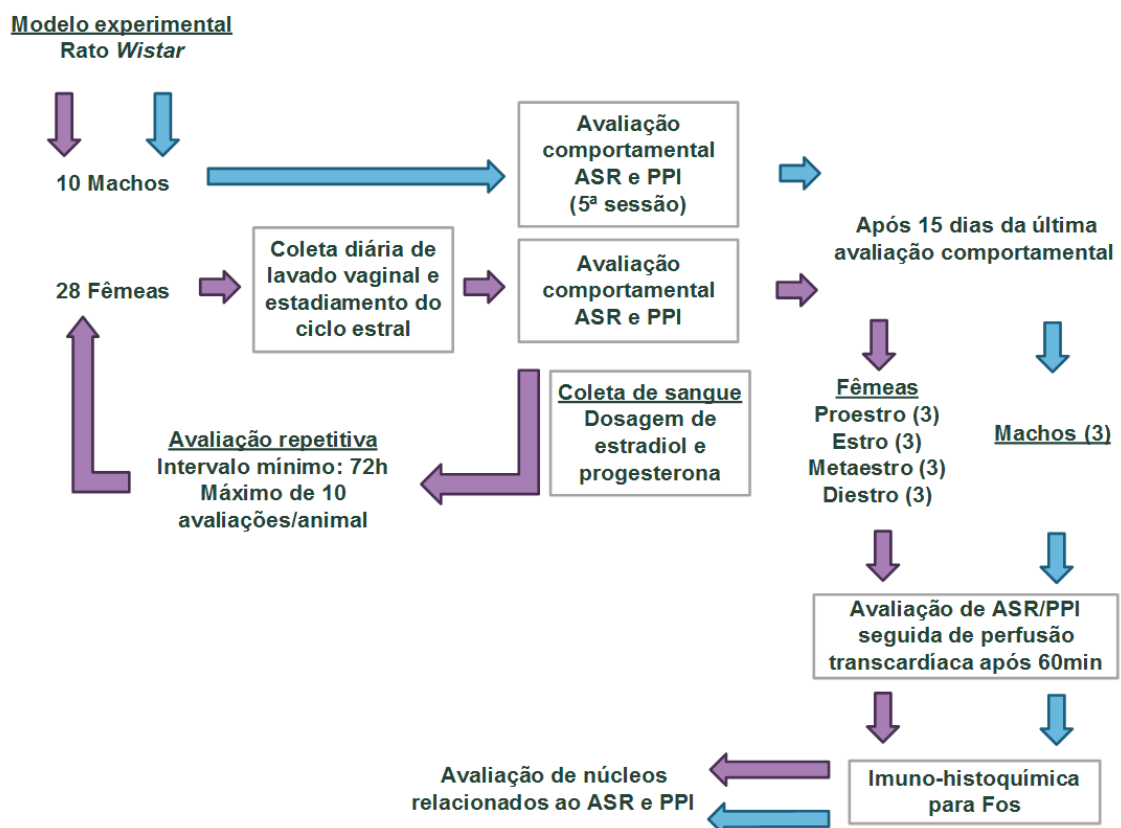


Figura 4. Esquema do desenho experimental indicando o fluxo de desenvolvimento do projeto de pesquisa e seus principais procedimentos (indicados nas caixas).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação e seu manuseio

Todos os experimentos necessitaram da utilização de animais, não existindo métodos alternativos. Assim, se tomou o maior cuidado possível no planejamento, preparo e execução dos experimentos a fim de se aumentarem ao máximo as possibilidades de êxito, o que pressupõe uma redução no número de animais utilizados. Esse preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP (Protocolo N° 584, Anexo A).

Foram utilizados como modelo experimental 38 ratos albinos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* (10 machos e 28 fêmeas), oriundos do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Essa espécie é representativa dos mamíferos roedores, que apresentam um ótimo funcionamento dos reflexos acústico-motores para a sobrevivência em um habitat terrestre, predominantemente noturno, e é amplamente utilizada no estudo do ASR (YEOMANS e FRANKLAND, 1995; KOCH, 1999).

Os animais foram alojados em gaiolas (41x34x17 cm) com livre acesso à ração e água, em biotério com temperatura controlada (21 a 25 °C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 07 h). Em cada gaiola, foram alocados sempre dois animais do mesmo gênero. Ao chegarem ao biotério setorial, os animais passaram por um período mínimo de 10 dias para adaptação ao novo ambiente até atingirem 90 dias de idade. Antes da fase experimental, todos os animais foram manipulados três dias consecutivos, colocados na gaiola de prova, dentro da câmara de avaliação do ASR, e expostos ao ruído de fundo (ruído branco, 60 dB) durante 5min.

No quarto dia de manipulação, os animais foram submetidos a uma prova de ASR basal que possibilitou a segregação daqueles que, inerentemente, não apresentavam o reflexo (VALSAMIS e SCHMID, 2011). Os animais foram submetidos a 22 estímulos sonoros isolados (ruído branco) em ordem crescente de intensidade. Os cinco primeiros estímulos (75 dB) foram utilizados para habituação do animal; sendo, os posteriores, estímulos de 75, 79, 84, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 e 113 dB. Durante todo o procedimento, o ruído de fundo se manteve constante em 60 dB.

Somente animais que responderam adequadamente à estimulação acústica foram utilizados na fase experimental. A seguir, 15 dias antes do início da fase experimental, todos os animais passaram a ser manipulados diariamente. Nessa fase, as fêmeas foram habituadas ao procedimento de coleta do lavado vaginal para estadiamento do ciclo estral (MARCONDES et al., 2002).

A manutenção das gaiolas e os procedimentos experimentais foram realizados sempre pelo mesmo experimentador, para que se diminuíssem as influências de fatores externos no ciclo estral, no reflexo de sobressalto e na expressão da proteína Fos (DRAGUNOW et al., 1990; KRUKOFF, 1993).

Estadiamento do ciclo estral

Para o estadiamento do ciclo estral, o lavado vaginal das fêmeas foi coletado diariamente no início do ciclo claro (7–8 h), com o auxílio de uma ponteira de 200 µl contendo solução fisiológica de

NaCl 0,9%, dispensada e sugada no vestíbulo da vagina para obtenção das células epiteliais descamadas e muco (MARCONDES et al., 2002). O lavado vaginal foi depositado em lâminas para imunofluorescência (Perfecta, 10 campos) e observado a fresco, em microscópio óptico com iluminação de campo escuro, para prognóstico do estadiamento do ciclo estral. Posteriormente, o lavado foi secado em estufa a 36 °C durante 12 h, seguido de imersão em álcool 100% para fixação do material e secagem por 12 h.

Após esse período, o material foi corado através de hidratação em concentrações decrescentes de álcool (etanol 100% a 70%), água destilada, coloração com solução de hematoxilina de Harris (CAS 517-28-2), lavagens em água destilada e água corrente, desidratação em álcool (etanol 70% a 100%), coloração com solução de Orange-G (álcool 99,5%, Orange-G a 5% [Sigma #O-1625], ácido fosfotúngico [Sigma #P-4006], em solução aquosa), passagem em álcool 100%, coloração com eosina amarela 0,25% (CAS 17372-87-1), nova passagem em álcool 100% e diafanização em xilol. Ao término, as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando Permount® como meio de montagem (Apêndice A).

A coleta de lavado vaginal foi iniciada quinze dias antes do início da avaliação comportamental para confirmação de que todas as fêmeas apresentavam ciclo estral regular. Somente os animais que apresentaram ciclo regular de 4 a 5 dias foram conduzidos ao protocolo de avaliação comportamental (JENNES et al., 1992; CONDE et al., 1995).

Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e da inibição por estímulo prévio

As avaliações do ASR se iniciaram quando os animais atingiram ao menos 100 dias de idade, estágio em que são sexualmente maduros (QUINN, 2005; ANDREOLLO et al., 2012), e melhor fase para se iniciar o estudo das diferenças sexuais (BECKER et al., 2005). No início de cada sessão de avaliação do ASR, os animais foram pesados para posterior ponderação das amplitudes de resposta.

Para a avaliação do ASR, se empregou um sistema de avaliação do sobressalto que integra tanto a parte de aquisição de movimento do animal quanto a de geração dos estímulos sonoros (Insight Ltda.). Ele é constituído por uma caixa com isolamento acústico, uma plataforma de medição a 9 cm dos alto-falantes e um sistema gerador de estímulos sonoros controlados por um *software*, conectados a um computador.

Os estímulos acústicos são calibrados previamente com um decibelímetro digital (medidor de nível de pressão sonora, modelo DEC-460, Instrutherm Ltda., calibração interna 94 dB) colocado sobre a plataforma de medição, na mesma posição na qual é afixada a gaiola de prova do animal. A quantificação do ASR é realizada por um sensor, abaixo da gaiola de prova, que registra a variação do peso do animal antes, durante e após a estimulação sonora, visto que a resposta pode ser caracterizada por um movimento balístico resultante da contração da musculatura estriada esquelética.

Para evitar a influência do ciclo circadiano na mensuração do reflexo (CHABOT e TAYLOR, 1992; KINKEAD et al., 2008), todas as avaliações foram realizadas no início do ciclo claro (entre 7 e 10 h). Para mensuração do ASR, PPI e habituação intrassessão foi empregada uma sessão com seis tipos de apresentação de estímulos, descritos no Quadro 1 e padronizados previamente (MARTINS, 2013).

Durante toda a sessão, as câmaras foram mantidas com ventilação e ruído de fundo (ruído branco, 60 dB) constantes e os animais foram monitorados por meio de uma câmera de vídeo. Todas as sessões começaram com um tempo de aclimação de 5 min (Apêndice B).

Quadro 1. Características da sessão de avaliação do ASR, PPI e habituação intrassessão.

Blocos	Tentativa (ordem de apresentação)	Estímulos acústicos		Repetições
		Pré-pulso	Pulso	
Inicial	ASR (1-5)	-	113 dB/20 ms	05
	ASR (6-53)	-	113 dB/20 ms	12
Avaliação	Prep65dB+ASR (6-53)	4 kHz – 65 dB/20 ms	113 dB/20 ms	12
ASR/PPI	Prep70dB+ASR (6-53)	4 kHz – 70 dB/20 ms	113 dB/20 ms	12
	Prep75dB+ASR (6-53)	4 kHz – 75 dB/20 ms	113 dB/20 ms	12
Final	ASR (54-58)	-	113 dB/20 ms	05

Em cada sessão, foram apresentadas 58 tentativas. Cada tentativa possuía um estímulo desencadeante do ASR (pulso) que podia ou não ser precedido por um pré-pulso, conforme discriminado no Quadro 1. O pulso era um ruído branco com intensidade de 113 dB e duração de 20 ms, apresentado isoladamente nas tentativas ASR. O pré-pulso era um tom puro de 4 kHz, com intensidade de 65, 70 ou 75 dB e duração de 20 ms, que é apresentado 50 ms antes do pulso nas tentativas Prep65dB+ASR, Prep70dB+ASR ou Prep75dB+ASR (KOCH, 1998; RUPPRECHT et al., 1999; FARADAY e GRUNBERG, 2000).

As cinco primeiras tentativas constituíram o Bloco Inicial, nas quais foram apresentados pulsos (Tentativa ASR, 1ª a 5ª), cuja média foi utilizada no cálculo da habituação intrassessão e excluída do cálculo da amplitude média do ASR (CHARITIDI et al., 2012).

A avaliação do ASR e da PPI foi realizada entre as tentativas 6 e 53 (Bloco Avaliação ASR/PPI), empregando pulsos e pré-pulsos com três intensidades (65, 70 e 75 dB) combinados em quatro tipos de tentativas. No Bloco Avaliação ASR/PPI, a sequência de apresentação das tentativas foi realizada da forma semirrandômica, pelo método do quadrado latino, sendo o intervalo entre tentativas de 30 s, com variação aleatória de 33%.

A sessão terminou com a apresentação de cinco tentativas ASR (54ª a 58ª – Bloco Final), cuja média foi utilizada no cálculo da habituação intrassessão e excluída do cálculo da amplitude média do ASR (CHARITIDI et al., 2012). Para o estudo da habituação intrassessão foram comparadas as médias de amplitude do ASR entre os blocos Inicial, Avaliação ASR/PPI e Final, uma vez que as amplitudes do sobressalto tendem a ser maiores nas primeiras estimulações (GONZALEZ-LIMA et al., 1989).

Todos os animais passaram por avaliações repetidas do ASR, para se aumentarem as amostras em fases de ciclo estral de curta duração, diminuindo o número de fêmeas utilizadas. Nos machos, apesar das avaliações repetidas, foram analisados apenas os dados obtidos na quinta avaliação.

Cada animal foi estimulado sempre na mesma câmara de prova (PLAPPERT et al., 2005), após um intervalo mínimo de 72 h e por um limite máximo de dez sessões, para evitar a habituação

intersessão do reflexo, como a observada a partir da 15ª sessão em protocolos de avaliação a cada 48 h (MARTINS, 2013).

Dosagem plasmática de estradiol e progesterona

Nas fêmeas, após cada avaliação comportamental, 1 ml de sangue foi coletado para dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol e progesterona. A dosagem hormonal, somada à identificação da fase do ciclo pelo lavado vaginal, foi utilizada para estudar a relação entre o ASR e a flutuação hormonal durante o ciclo estral (GLOVER et al., 2013). A dosagem desses hormônios através do sangue também é válida para estudar sua relação com núcleos no sistema nervoso central imunorreativos à proteína Fos, já que eles atravessam a barreira hematoencefálica e suas concentrações no plasma e no líquido cefalorraquidiano são correspondentes (BACKSTROM et al., 1976).

Para a coleta de sangue, as fêmeas foram anestesiadas com isoflurano, que apresenta baixo índice de toxicidade devido a pouca formação de metabólitos, e rápida eliminação, o que garante uma recuperação mais rápida do quadro de anestesia em relação a outros agentes anestésicos comumente utilizados (EGER, 1981).

Após confirmação da ausência dos reflexos pupilar e de retirada, a coleta foi realizada através do plexo orbital, com o auxílio de uma pipeta de vidro heparinizada. O intervalo mínimo entre coletas foi de 72 h (como nas avaliações comportamentais), com alternância de antímero. Todos os animais receberam 1 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9% por via subcutânea após cada coleta.

Durante a coleta, as amostras foram mantidas em gelo e a seguir centrifugadas por 20 min, 3000 RPM a 4 °C, para a obtenção do plasma, sendo estocadas a -80 °C até a realização das dosagens. A dosagem hormonal foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) (SPARY et al., 2010), tanto para o estradiol (Kit #582251, Cayman) quanto para a progesterona (Kit #582601, Cayman).

Para a dosagem de estradiol, as amostras foram utilizadas puras; já as amostras de progesterona foram diluídas 200x no tampão de ELISA, para que as leituras caíssem dentro dos limites da curva-padrão (7,8-1000 pg/ml). Todas as amostras foram dosadas em duplicata, sendo considerado aceitável um coeficiente de variação entre as duplicatas de até 20%, como recomendado pelo fabricante.

A intensidade da absorbância foi determinada por espectrofotometria e é inversamente proporcional à concentração do hormônio na amostra. Os ensaios foram lidos de 15 em 15 minutos até 90 min após incubação com reagente de Ellman, com comprimentos de onda entre 405 e 420 nm. Dentre todas as leituras, foram selecionadas as que apresentaram maior coeficiente de correlação com a curva-padrão. Assim, todos os ensaios foram lidos 60 min após a incubação com o reagente de Ellman, sendo que, para os ensaios de estradiol, foi utilizado o comprimento de onda de 420 nm, e de progesterona, 405 nm.

Imuno-histoquímica para a proteína Fos

Inicialmente, para padronização do método, seis animais passaram pelo protocolo de mensuração do ASR seguido do protocolo de perfusão com diferentes intervalos de tempo, para

determinar qual intervalo entre o término da sessão de avaliação de ASR e a eutanásia era ideal para detecção imuno-histoquímica da proteína Fos.

Como a proteína Fos passa a ser sintetizada entre 30 e 45 min após o estímulo (HOFFMAN et al., 1993a), esses animais foram perfundidos 0, 15, 30, 45, 60 e 75 min após o término da avaliação comportamental e, então, submetidos ao protocolo de imuno-histoquímica para Fos. Em todos os intervalos testados, os animais apresentaram neurônios imunorreativos à Fos (FOS-ir). No entanto, a distribuição e intensidade da imunorreatividade variaram conforme o intervalo empregado. Para a determinação do melhor tempo de sobrevivência, foram analisados núcleos e regiões relacionados às vias auditivas, do ASR e da PPI.

Algumas regiões apresentaram expressão basal de Fos ($t = 0$ min), que se manteve constante ou aumentou nos demais intervalos. Na maioria dos núcleos, entretanto, a intensidade da imunorreatividade, o número de neurônios FOS-ir e sua distribuição aumentou gradualmente a partir do menor intervalo até atingir imunorreatividade mais evidente após 60 min do término da sessão (intervalo selecionado, Figura 5), diminuindo gradualmente após 75 min (Apêndice C).

Nos grupos experimentais, passados no mínimo 15 dias do término da etapa de avaliação comportamental, doze fêmeas (três em cada fase do ciclo estral) e três machos foram submetidos à avaliação comportamental do ASR, PPI e habituação intrassessão para posterior imuno-histoquímica para a proteína Fos.

Após 60 min do término da sessão, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% e eutanasiados por perfusão transcárdica, com uma bomba peristáltica ajustada para o fluxo de 30ml/min. Para lavagem do leito vascular, foi empregado 150 ml de soro *Ringer* livre de cálcio (NaCl 0,85%, KCl 0,025%, NaHCO₃ 0,02%, pH 6,9), com adição de 0,15 ml de heparina, seguido de 1 ℓ de solução fixadora composta por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

Ao término da perfusão, o encéfalo foi coletado e reduzido a um bloco do núcleo do nervo hipoglosso ao hipotálamo mamilar. O bloco foi crioprotetido em solução de sacarose a 30%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 48 h a 4 °C. Seções seriadas de 30 μm foram feitas no plano coronal, em micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R), equipado com platina congeladora (BFS-30MP, Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos sequencialmente em um conjunto de dez frascos, que constituíram 10 séries de cortes.

O protocolo de imuno-histoquímica utilizou o processamento em cortes flutuantes. Inicialmente, os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M para retirada da sacarose infiltrada no tecido. A peroxidase endógena foi inibida com uma solução de água oxigenada P.A. a 10%, durante 20 min sob agitação. Os cortes foram então lavados com tampão TBS-Tx, composto por Tris (Trisma Base, Sigma #T-6066) 0,05M, pH 7,6, com NaCl 0,85% e Triton X-100 0,5% (Merck #11869), incubados em solução de soro normal de cabra a 2% durante 40 min para bloqueio da marcação inespecífica e, em seguida, incubados em anticorpo primário anti-Fos (Calbiochem, #PC38), obtido em coelho, a concentração de 1/10.000 durante 48 h em geladeira, sob agitação.

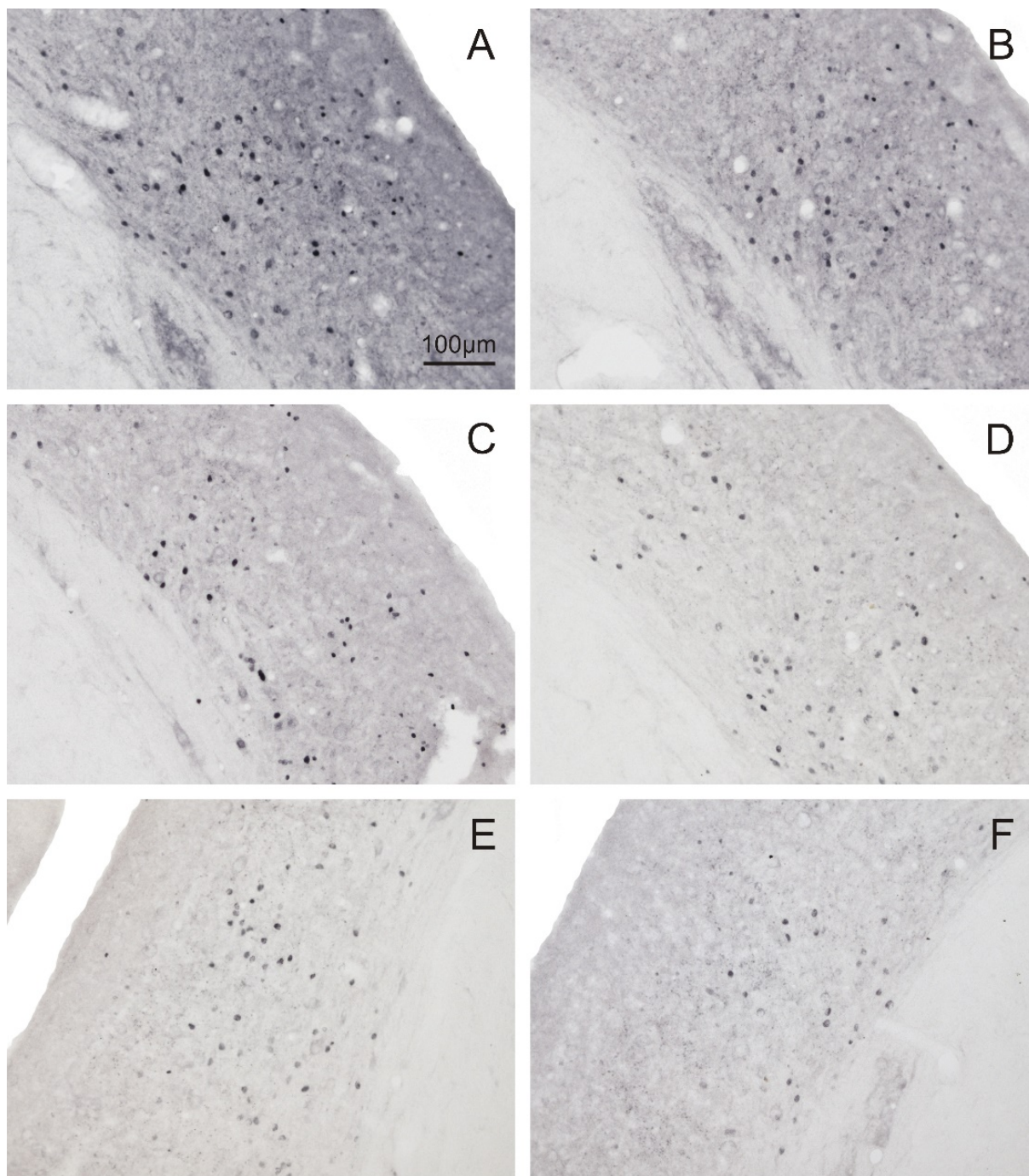


Figura 5. Neurônios imunorreativos à proteína Fos no núcleo coclear dorsal em diferentes intervalos entre a avaliação do ASR e a eutanásia. As fotomicrografias representam casos submetidos ao processamento imunohistoquímico após tempos de sobrevivência distintos: 0 min (A), 15 min (B), 30 min (C), 45 min (D), 60 min (E) e 75 min (F). A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

Após lavagens com tampão TBS-Tx, os cortes foram incubados novamente em solução de anticorpo secundário anti-coelho biotilado (obtido em cabra, Vector Labs BA-1.000) 1/250, durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, incubados em complexo ABC (ABC, Vectastain Standard®, Vector Labs, #PK-4000), preparado no mesmo tampão, por 2 h à temperatura ambiente. O método do complexo avidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981) se baseia na grande afinidade que a molécula de avidina tem pela molécula de biotina (constante de dissociação 10^{-15}).

Para visualização da proteína Fos, a peroxidase unida ao complexo ABC foi evidenciada mediante a ação da água oxigenada, usando como cromógeno o 3,3'diaminobenzidina

tetrahidrocloro (DAB) intensificado com níquel (níquel amônio sulfato, Sigma #A-1827), que gera um produto de reação estável na cor negra (ADAMS, 1981; HSU e SOBAN, 1982). Para o procedimento, os cortes foram incubados em uma solução de tampão Tris 0,05M pH 8,0, DAB a 0,07%, água oxigenada a 0,003% e níquel a 0,04%, com controle visual e microscópico. A reação foi interrompida com lavagens de tampão Tris 0,05M pH 8,0 (Apêndice D).

Após as reações imuno-histoquímicas, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina a 0,4%, em tampão Tris 0,05M, e montados em lâminas de vidro de caudal para rostral. Duas séries de cada caso experimental foram contracoradas com tionina, pelo método de Nissl, para referência citoarquitetônica. Esse método se inicia com a desidratação dos cortes em alcóois de concentrações crescentes (etanol 50% a 100%), dissolução de lipídios em banhos de xilol, reidratação por meio de alcóois em concentração decrescente (etanol 100% a 50%), coloração com tionina (Fisher #T-409), nova desidratação e diafanização com xilol. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando Permount[®] (Fisher Scientific) como meio de montagem.

Avaliação dos órgãos genitais internos das fêmeas

Após a perfusão das fêmeas destinadas ao processamento imuno-histoquímico para Fos (n=3 por fase do ciclo estral), os órgãos genitais internos foram coletados em bloco (vagina, útero, tubas uterinas e ovários), dissecados e pesados. Essa análise foi importante para verificar seu aspecto macroscópico, confirmando o estadiamento realizado pelo lavado vaginal e ausência do estado de pseudo-gravidez.

ANÁLISE DOS DADOS

Estadiamento do ciclo estral

As lâminas de lavado vaginal foram analisadas em microscópio óptico convencional para a determinação das fases do ciclo estral e suas transições (WESTWOOD, 2008). Sete estágios foram identificados com base nas características morfológicas do lavado vaginal: proestro (P, Figura 6A), com predominância de células nucleadas; transição proestro-estro (P-E, Figura 6B); estro (E, Figura 6C), com a presença majoritária de células queratinizadas; transição estro-metaestro (E-M, Figura 6D); metaestro (M, Figura 6E), no qual há uma distribuição igualitária de células nucleadas, células queratinizadas e leucócitos polimorfonucleares; transição metaestro-diestro (M-D, Figura 6F); e diestro (D, Figura 6G), com predominância de leucócitos polimorfonucleares.

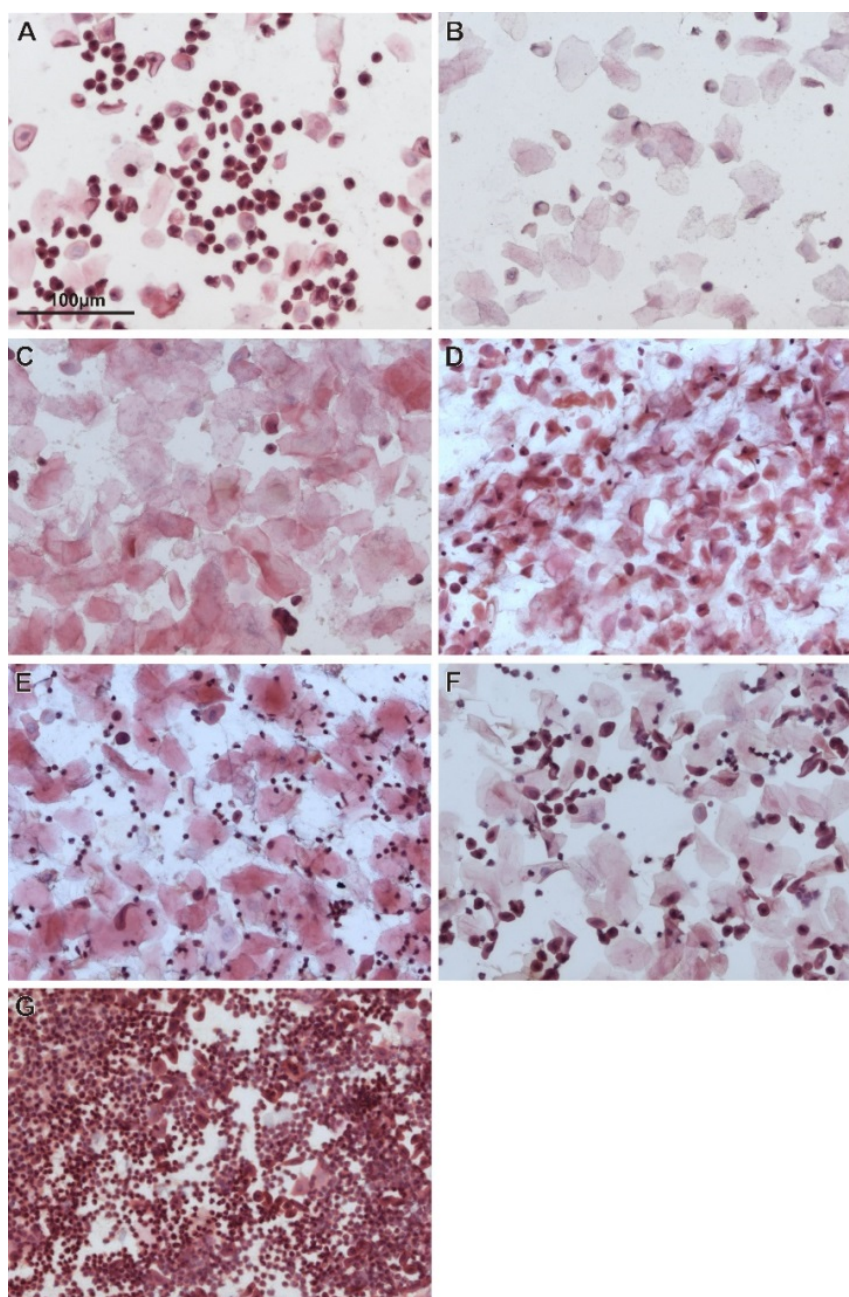


Figura 6. Fotomicrografias do lavado vaginal nas diferentes fases do ciclo estral e suas transições. Estão representadas as fases de proestro (A), transição entre proestro e estro (B), estro (C), transição entre estro e metaestro (D), metaestro (E), transição entre metaestro e diestro (F) e diestro (G). Para as características morfológicas de cada estágio, vide texto. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

Relação entre ciclo estral e ASR

Primeiramente, as amplitudes de resposta do reflexo foram normalizadas em todos os grupos pelo peso corporal dos animais, uma vez que os machos têm maior peso que as fêmeas da mesma idade e que a amplitude do ASR tende a aumentar com o aumento de peso (BLASZCZYK e TAJCHERT, 1996). Os gráficos de amplitude de todas as respostas de sobressalto, precedidas ou não por um pré-estímulo, também foram analisados, eliminando-se as tentativas nas quais o animal não apresentou o reflexo (JOVANOVIC et al., 2004).

A latência foi determinada como o tempo que o animal levou para atingir a maior amplitude de ASR (pico máximo) após a apresentação do estímulo desencadeante. Ela foi calculada a partir do registro de atividade do animal obtido em cada tentativa com resolução temporal de 1 ms. Os dados foram exportados para o *software Microsoft Excel* e o tempo de latência obtido com ajuda de uma macro desenvolvida em colaboração com o Sr. Henrique Martins Filho.

Para o cálculo da amplitude do ASR nas tentativas com e sem pré-pulso, foram levados em conta os 1000 ms posteriores à apresentação do estímulo sonoro de 113 dB. Os resultados da avaliação comportamental da %PPI foram analisados com base na relação entre as amplitudes de resposta de sobressalto precedidas ou não por um pré-pulso, calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\%PPI = \left(\frac{\text{amplitude média Tentativas ASR} - \text{amplitude média Tentativas Prep + ASR}}{\text{amplitude média Tentativas ASR}} \right) \times 100$$

Sabendo que a habituação do ASR acontece de maneira acentuada nas primeiras apresentações do estímulo (VALSAMIS e SCHMID, 2011), estudou-se em separado as amplitudes das respostas correspondentes ao Bloco Inicial (Tentativas 1 a 5) e ao Bloco Final (Tentativas 54 a 58). Assim, a porcentagem de habituação intrassessão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Habituação} = \left(\frac{\text{amplitude média Bloco Inicial} - \text{amplitude média Bloco Final}}{\text{amplitude média Bloco Inicial}} \right) \times 100$$

Imuno-histoquímica para a proteína Fos

As lâminas processadas por imuno-histoquímica foram estudadas em microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro e a documentação fotográfica realizada com câmara digital (AxioCamHRc, Zeiss). Os cortes processados foram estudados com o auxílio do atlas estereotáxico do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005) e utilizados para a análise semiquantitativa dos neurônios FOS-ir, realizada de acordo com o método empregado em estudos prévios (ZHANG et al., 1996; CHEN et al., 2000), determinando-se a densidade de neurônios FOS-ir, com ênfase em núcleos e regiões reconhecidamente envolvidas nas vias do ASR e da PPI (LINGENHOHL e FRIAUF, 1994; FENDT et al., 2001).

As regiões de interesse foram fotografadas em duas séries complementares (intervalo entre secções = 150 µm) e as fotos unidas em um mosaico. Os neurônios FOS-ir foram contados com o programa de análise de imagens *ImageJ* (SCHNEIDER et al., 2012) (version 1.49, US National Institutes of Health) e a área do núcleo/região foi medida em cada um dos antímeros do tronco encefálico (Apêndice E). A densidade neuronal em cada núcleo foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Densidade neuronal} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de neurônios FOS - ir}}{\text{Área total do núcleo}}$$

O número total de neurônios FOS-ir é a soma de todos os perfis neuronais marcados em todas as secções de um determinado núcleo e área total do núcleo representa a soma das áreas delimitadas em todas as secções do núcleo.

Análises estatísticas

Antes de todas as análises, a distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e sua homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os dados que atenderam a essas duas premissas foram analisados por testes paramétricos (ANOVA para um fator ou ANOVA para medidas repetidas, com pós-teste de Tukey-Kramer para amostras desbalanceadas quando necessário), de acordo com as comparações realizadas. Os dados que não as atenderam foram analisados por testes não-paramétricos (teste Kruskal-Wallis ou teste de Friedman, com pós-teste de Dunn quando necessário). Em todos os casos, as diferenças estatísticas foram consideradas em nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Para buscar a associação do conjunto de variáveis hormonais (concentração de estradiol e progesterona) com a amplitude de ASR, a porcentagem de habituação intrassessão ou o conjunto de variáveis de %PPI (pré-pulsos de 65, 70 e 75 dB), foi empregada a Análise de Correlação Canônica. Essa análise resume as informações de cada conjunto em novas variáveis, agora chamadas de canônicas, que são utilizadas na busca de correlações (MINGOTI, 2005; JOHNSON e WICHERN, 2007).

No intuito de explorar os momentos ideais para delimitação dos blocos da sessão de avaliação (Inicial, Avaliação ASR/PPI e Final), realizamos uma análise das diferenças das amplitudes médias de ASR ao longo da sessão em todos os grupos experimentais. Nessa análise, para cada grupo experimental, foi obtida a média e desvio padrão da amplitude de ASR das duas primeiras tentativas e a média e desvio padrão da amplitude de ASR da segunda à 22ª tentativa. Posteriormente, foi realizado um teste t pareado para comparação das duas médias.

Em seguida, duas novas médias foram obtidas, sendo que uma considerava as três primeiras tentativas e a outra, as médias da 3ª à 22ª tentativa. Novamente, se realizou a comparação das médias por teste t pareado e o procedimento foi repetido sucessivamente até que fossem comparadas as médias das primeiras 21ª tentativas e das duas últimas. Assim, foi possível estimar se havia um momento durante a sessão, partindo do seu início, em que a amplitude média do ASR no conjunto das primeiras tentativas era diferente do conjunto das demais tentativas, o que caracterizaria o momento ideal para delimitar o Bloco Inicial da sessão. Quando esse momento foi encontrado para o Bloco Inicial, foi realizada a mesma análise em sentido inverso, partindo do final para o início da sessão, excluindo-se os valores do Bloco Inicial, para buscar o tamanho do Bloco Final.

Apresentação das ilustrações científicas

As imagens apresentadas foram organizadas em figuras e trabalhadas com os programas *Adobe Photoshop CS2* e *CorelDraw X3*, ajustando-se brilho, contraste e balanço de cores, bem como removendo-se artefatos localizados externamente aos cortes, de acordo com o preconizado por

Schenket al. (1999) e Saper (1999) para apreparação de imagens digitais para publicação científica. As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando-se, com os mesmos equipamentos e aumentos, uma lâmina de escala micrométrica calibrada (Leica, LeitzWetzlar), cuja menor divisão corresponde a 100 μm .

RESULTADOS

Estadiamento do ciclo estral e análise do peso dos órgãos genitais internos

O estadiamento do ciclo estral permitiu identificar um ciclo estral regular nas fêmeas, com duração de 4 a 5 dias durante todo o experimento, com exceção de duas fêmeas que apresentaram interrupção do ciclo estral e foram retiradas do conjunto de animais experimentais. O estadiamento diário do ciclo estral, baseado na análise do lavado vaginal, permitiu coletar os dados comportamentais nas fêmeas a partir das seguintes observações de fases e transições: proestro (n = 12), proestro-estro (n = 12), estro (n = 18), estro-metaestro (n = 6), metaestro (n = 9), metaestro-diestro (n = 9) e diestro (n = 24).

Os órgãos genitais internos das fêmeas diferiram quanto ao peso ao longo do ciclo estral somente em proestro, sendo mais pesados do que em todas as demais fases. Esse aspecto pôde ser verificado macroscopicamente, pois, durante o proestro, os úteros se apresentavam dilatados e com grande quantidade de fluido (Figuras 7 e 8).

Peso dos órgãos genitais internos das fêmeas

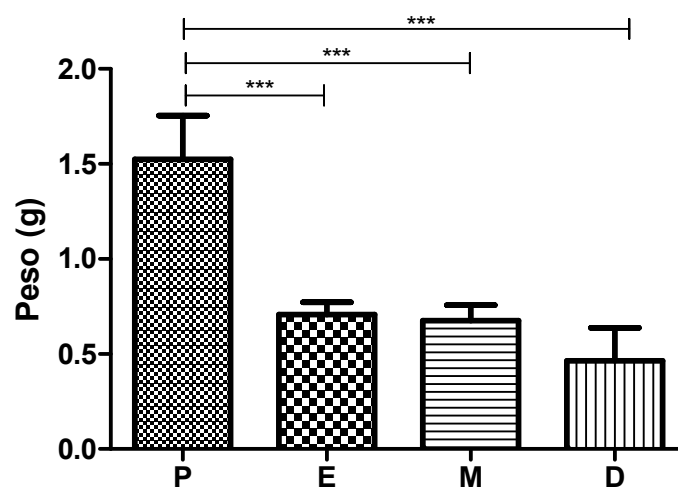


Figura 7. Gráfico do peso médio dos órgãos genitais internos das fêmeas nas fases do ciclo estral. Observa-se que, durante o proestro, o órgão é mais pesado que nas demais fases. Os dados, apresentados como média e desvio-padrão (Apêndice F1), foram analisados por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey-Kramer (***) = $p < 0,001$).

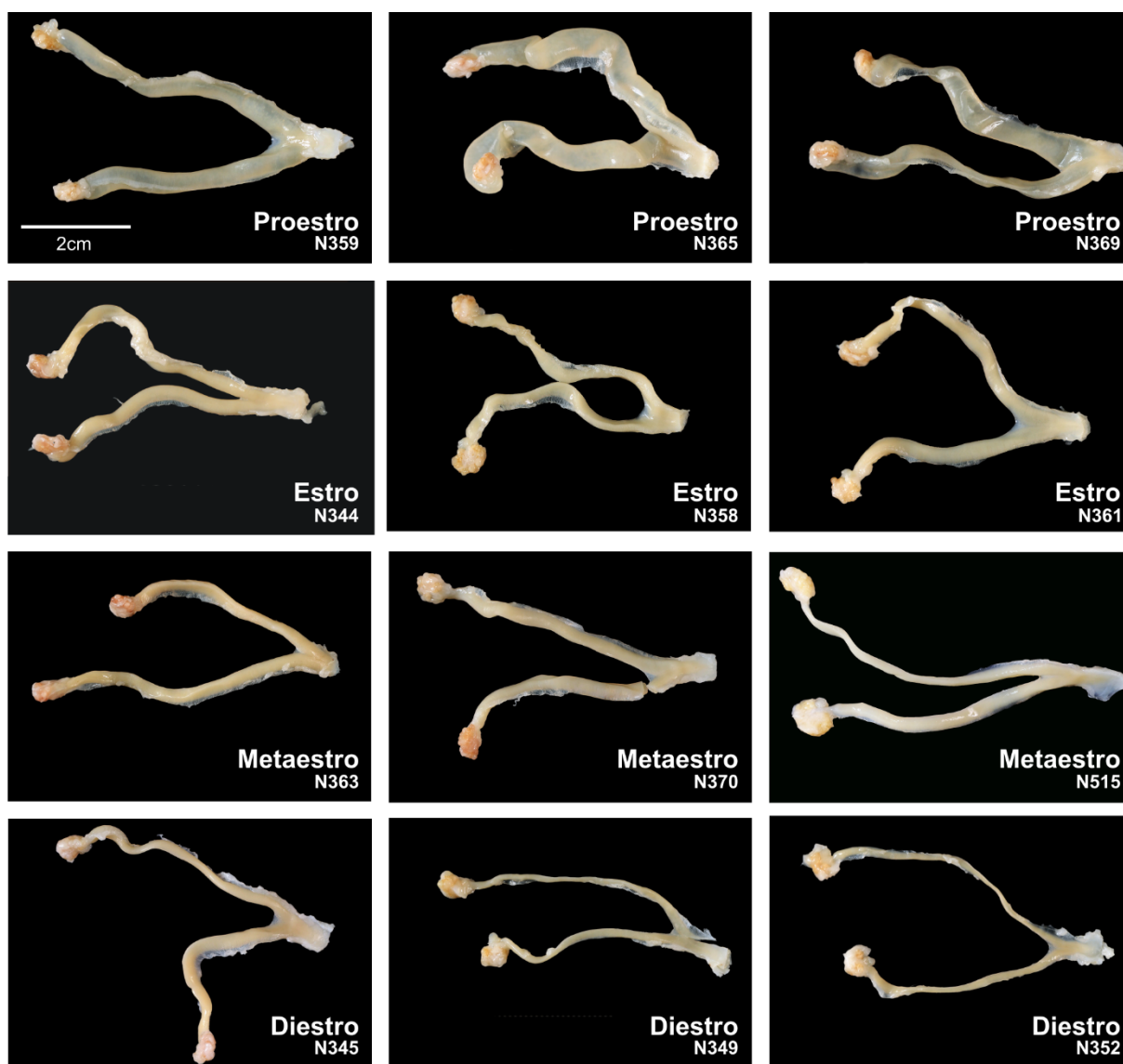


Figura 8. Fotos dos órgãos genitais internos em diferentes fases do ciclo estral. Material proveniente das fêmeas perfundidas para realização do protocolo de imuno-histoquímica para proteína Fos. Nota-se que o útero das fêmeas em proestro é mais dilatado e com maior quantidade de fluido do que o mesmo órgão nas demais fases do ciclo. Durante o diestro, o útero atrofia. As fases do ciclo estral e o número do caso experimental estão indicados no canto inferior direito de cada foto. A barra de calibração na foto Proestro/N359 é válida para todas as demais fotos.

Dosagem plasmática de estradiol e progesterona

A dosagem plasmática de estradiol foi realizada em dois ensaios de ELISA com 71 amostras, classificadas de acordo com as fases do ciclo estral estadiado pelo lavado vaginal: proestro (P, n = 12), proestro-estro (P-E, n = 11), estro (E, n = 12), estro-metaestro (E-M, n = 6), metaestro (M, n = 9), metaestro-diestro (M-D, n = 9) e diestro (D, n = 12). As curvas-padrão dos ensaios realizados apresentaram índices de correlação elevados ($r^2 = 0,990$ e $r^2 = 0,996$) e coeficiente de variação médio das amostras em duplicata de 8,52%. As amostras cujas concentrações se encontravam fora da curva de calibração dos padrões ou com coeficiente de variação >20% foram excluídas das análises estatísticas. Embora a concentração plasmática de estradiol varie ao longo do ciclo estral, não houve diferença significativa entre suas fases ou transições (Figura 9).

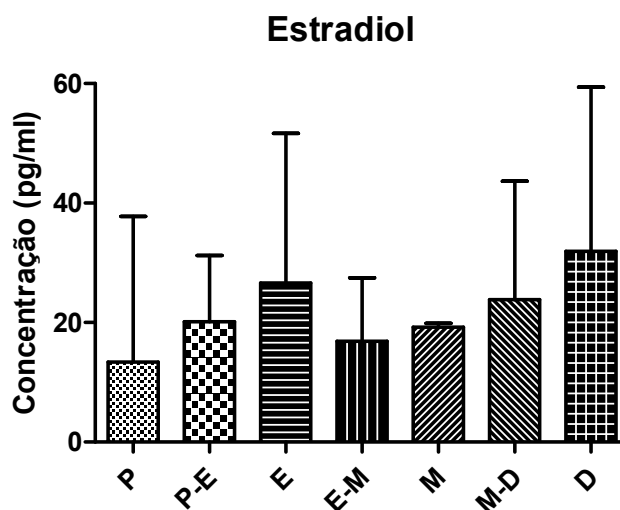


Figura 9. Gráfico da concentração plasmática de estradiol (pg/ml) nas fêmeas ao longo do ciclo estral. Não foram observadas diferenças entre as fases e transições do ciclo estral. Os dados são apresentados como mediana e interquartil 75% (Apêndice F2) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

A dosagem plasmática de progesterona foi realizada em um ensaio de ELISA com 35 amostras, sendo cinco para cada fase e transição do ciclo estral. O coeficiente de variação médio das amostras em duplicata no ensaio foi 8,74% e a curva-padrão apresentou índice de correlação elevado ($r^2 = 0,9946$). Apesar das amostras não apresentarem valores fora da curva de calibração, foram excluídas aquelas com coeficiente de variação entre duplicatas $>23\%$. A concentração plasmática de progesterona variou ao longo do ciclo estral, apresentando os valores mais baixos na transição proestro-estro em relação à transição metaestro-diestro ($p < 0,05$) (Figura 10).

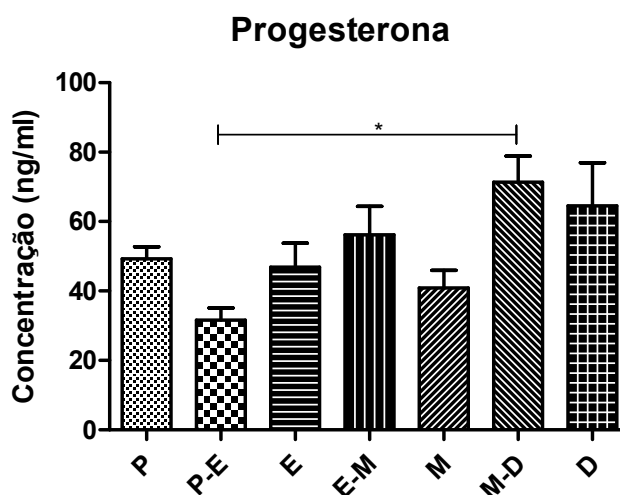


Figura 10. Gráfico da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) nas fêmeas ao longo do ciclo estral e suas transições. As fêmeas na transição proestro-estro têm uma menor concentração plasmática em relação às fêmeas em metaestro-diestro. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndice F3) e foram analisados por ANOVA ($p = 0,0259$) seguido de pós-teste de Tukey-Kramer ($* = p < 0,05$).

Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e sua inibição por estímulo prévio

A mensuração do ASR, PPI e da habituação intrassessão foi realizada nos machos ($n = 10$) e nas fêmeas em todas as fases do ciclo estral e suas transições. Todos os animais apresentaram

respostas de sobressalto típicas, e a apresentação prévia do pré-pulso foi capaz de reduzir a amplitude do reflexo, seguindo o paradigma da PPI.

Os machos apresentaram maior peso corporal ($399,4 \text{ g} \pm 25,27$, $p < 0,0001$) do que as fêmeas, independentemente da fase do ciclo na qual se encontravam (Figura 11). Devido à amplitude do ASR ser proporcional à massa corporal, todos os dados referentes à amplitude das respostas foram normalizados pelo peso do animal, para possibilitar a comparação entre gêneros e evitar distorções nos resultados.

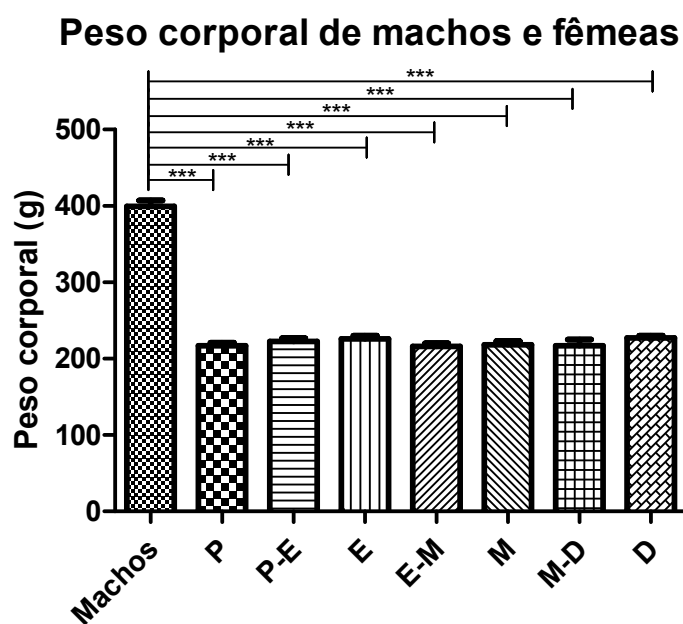


Figura 11. Gráfico do peso corporal de machos e fêmeas. O peso corporal dos machos é maior do que o das fêmeas, independentemente da fase do ciclo estral. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndice F4) e foram analisados por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey-Kramer (***) = $p < 0,001$).

A análise da amplitude normalizada do ASR entre os momentos de apresentação do estímulo em uma sessão (Blocos Inicial, Avaliação ASR/PPI ou Final), fixando-se o gênero ou a fase do ciclo estral, indicou que existe uma pequena diminuição da amplitude do ASR ao longo da sessão de avaliação, sendo que, de maneira geral, o Bloco Inicial apresenta valores mais elevados, seguido pelo Bloco Avaliação ASR/PPI e pelo Bloco Final (Figura 12).

No entanto, o Bloco Avaliação ASR/PPI não apresenta diferenças em relação ao Bloco Inicial e ao Bloco Final, exceto nas fêmeas em diestro (Figura 12), nas quais ocorre diminuição da amplitude de ASR entre o Bloco Avaliação ASR/PPI e Final ($p = 0,0093$). Os machos ($p = 0,0132$), as fêmeas na transição proestro-estro ($p = 0,0379$) e as fêmeas em metaestro ($p = 0,0425$) têm diminuição da amplitude do ASR no Bloco Final em relação ao Bloco Inicial, caracterizando a habituação intrassessão (Figura 12).

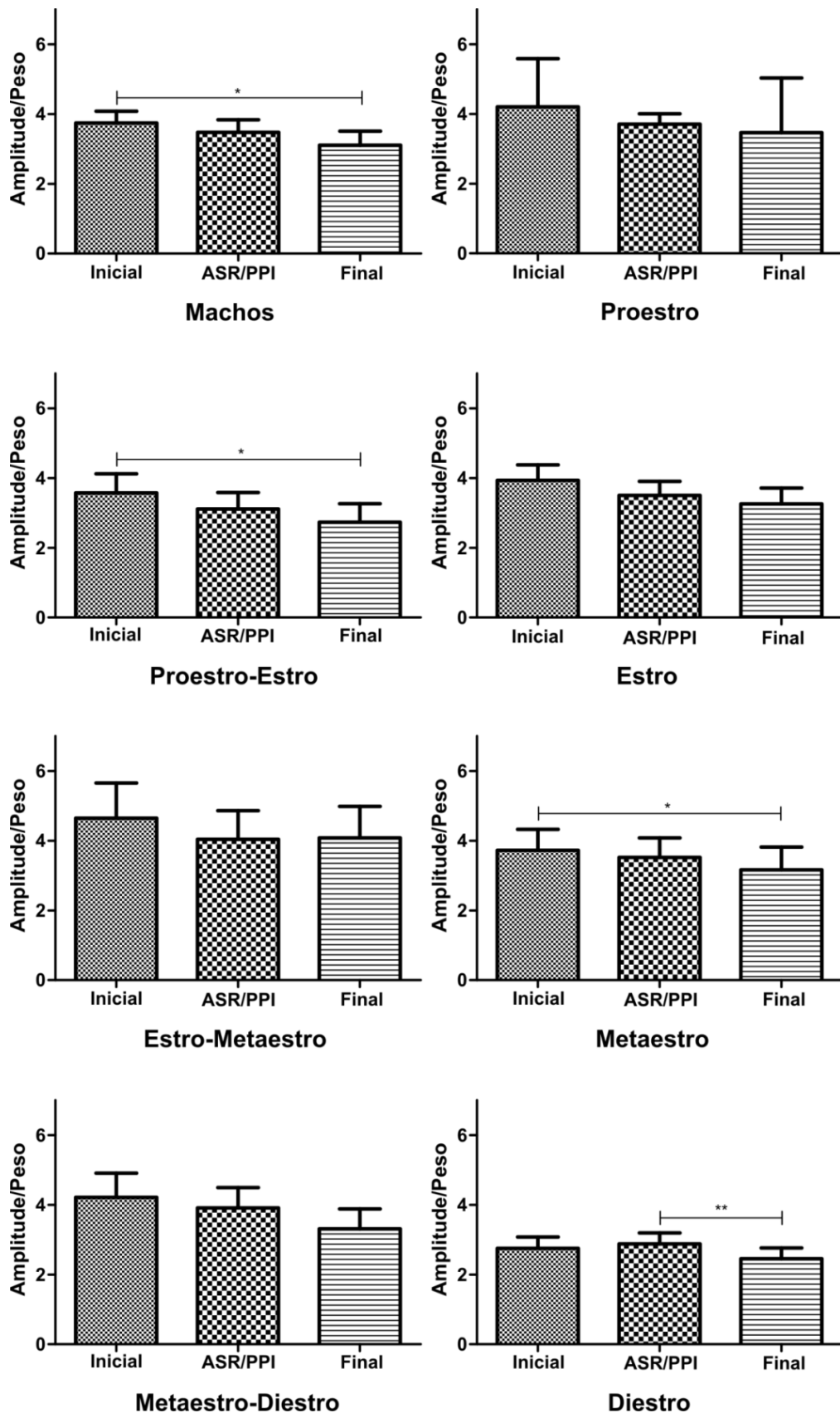


Figura 12. Gráficos da amplitude normalizada do ASR entre os blocos de tentativas apresentados em uma sessão de avaliação comportamental, fixando-se o gênero ou as fases do ciclo estral. Machos, fêmeas na transição proestro-estro e em metaestro habituaram entre o Bloco Inicial e o Bloco Final de estímulos. O Bloco Avaliação ASR/PPI não difere dos Blocos Inicial e Final com exceção das fêmeas em diestro, nas quais o Bloco Final tem menor amplitude. Os dados das fêmeas em proestro, apresentados como mediana e interquartil 75%, foram analisados pelo teste de Friedman ($p > 0,05$). Os demais conjuntos de dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F5 a F12) e foram analisados por ANOVA para medidas repetidas seguida de pós-teste de Tukey-Kramer quando $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

A análise das diferenças das amplitudes médias de ASR entre conjuntos de tentativas ao longo da sessão de avaliação indicou que, nos machos, existem diferenças na amplitude do ASR entre os conjuntos até a 4ª tentativa. Nas fêmeas, somente na transição proestro-estro também foi possível observar diferenças entre os conjuntos, as quais ocorreram até a 3ª tentativa (Apêndices F13 e F15). Nos dois casos, o conjunto de tentativas iniciais sempre têm maior amplitude que o conjunto final.

Observando-se os resultados dessa análise em sentido inverso, do final para o início da sessão, e excluindo as 4 tentativas iniciais para os machos e fêmeas em proestro-estro, observamos que existem diferenças na amplitude média do ASR nos conjuntos de tentativas finais apenas nas fêmeas em metaestro, até as 5 últimas tentativas, e em diestro, nos conjuntos até as 8 últimas tentativas (Apêndices F18 e F20). Nos dois casos, os conjuntos de tentativas finais sempre têm menor amplitude que os iniciais.

A amplitude normalizada do ASR não apresentou diferenças entre os gêneros ou fases do ciclo estral, ao se fixarem os blocos de apresentação de estímulos (Inicial, Avaliação ASR/PPI e Final) (Figura 13).

Com relação à latência de pico máximo do ASR, não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas em qualquer fase do ciclo estral ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis). A média de latência variou de $24,40 \pm 5,00$ ms nos machos até $37,14 \pm 15,18$ ms nas fêmeas na transição proestro-estro (Apêndice F24).

Todos os animais também apresentaram inibição do reflexo por um estímulo prévio, em porcentagens que variaram de 24,82% a 56,05%. As três intensidades de pré-estímulos utilizadas na sessão se mostraram eficientes para desencadear a PPI (Tabela 1). A análise das %PPI em machos e em cada fase do ciclo estral isoladamente indicou que as %PPI foram maiores com pré-pulsos de 70 e 75 dB quando comparadas com as %PPI obtidas com o pré-pulso de 65 dB, embora sem diferenças estatísticas em todos os grupos, exceto para a transição proestro-estro.

Tabela 1. Tabela descritiva da porcentagem de PPI em cada grupo experimental com os três pré-pulsos utilizados. Os dados são descritos como média e erro padrão da média e foram analisados em cada grupo por ANOVA para medidas repetidas seguido de pós-teste de Tukey-Kramer. Os dados referentes às fêmeas em estro e metaestro foram analisados pelo teste de Friedman seguido de pós-teste de Dunn. Letras diferentes indicam %PPI diferentes em um mesmo gênero ou fase do ciclo estral.

	%PPI 65dB	%PPI 70dB	%PPI 75dB
Machos	40,77%±5,75 ^A	49,72%±5,65 ^B	48,93%±4,79 ^B
Proestro	24,82%±6,04	26,76%±5,59	32,52%±6,06
Proestro-estro	40,83%±5,89	37,54%±7,83	36,07%±6,16
Estro	31,34%±8,36	43,82%±4,20	42,05%±4,97
Estro-metaestro	41,35%±5,95 ^A	49,44%±5,87 ^{AB}	53,39%±6,30 ^B
Metaestro	37,49%±5,64	42,81%±4,50	41,26%±5,04
Metaestro-diestro	46,25%±4,80	46,71±7,10	43,86%±4,45
Diestro	48,45%±4,67 ^A	51,28%±5,45 ^{AB}	56,05%±3,80 ^B

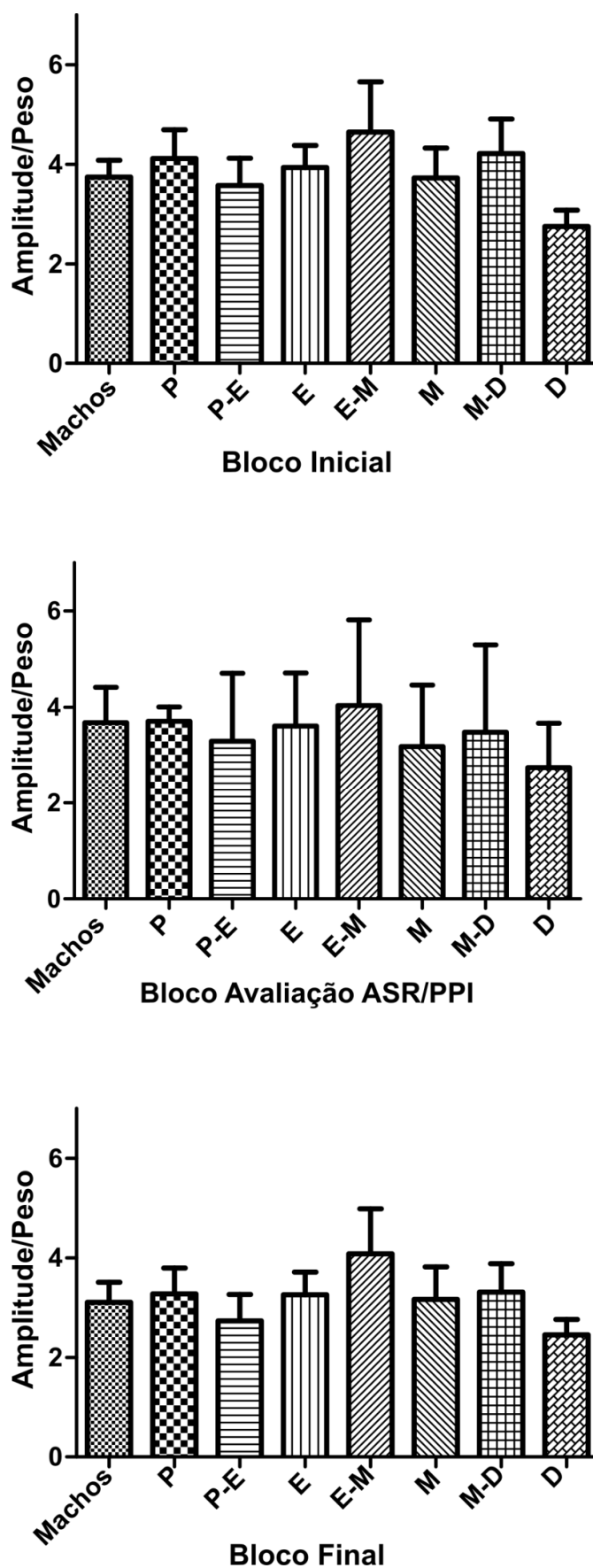


Figura 13. Gráficos da amplitude normalizada de ASR entre gêneros e fases do ciclo estral fixando-se os blocos da sessão (Inicial, Avaliação ASR/PPI e Final). O gênero e o ciclo estral não modificam de forma significativa o ASR em nenhum dos blocos. Os dados dos Blocos Inicial e Final, apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F21 e F23), foram analisados por ANOVA ($p > 0,05$). Os dados do Bloco Avaliação ASR/PPI são apresentados como mediana e interquartil 75% (Apêndice F22) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

A análise da %PPI entre os gêneros e fases do ciclo estral, fixando-se a intensidade do pré-pulso, demonstrou que houve diferenças apenas entre as fêmeas em proestro e diestro. Assim, a %PPI foi menor nas fêmeas em proestro em relação às fêmeas em diestro quando foram utilizados os pré-pulsos de 70 dB ($p = 0,0465$) e 75 dB ($p = 0,0262$). Não foram observadas diferenças entre os demais grupos experimentais (Figura 14).

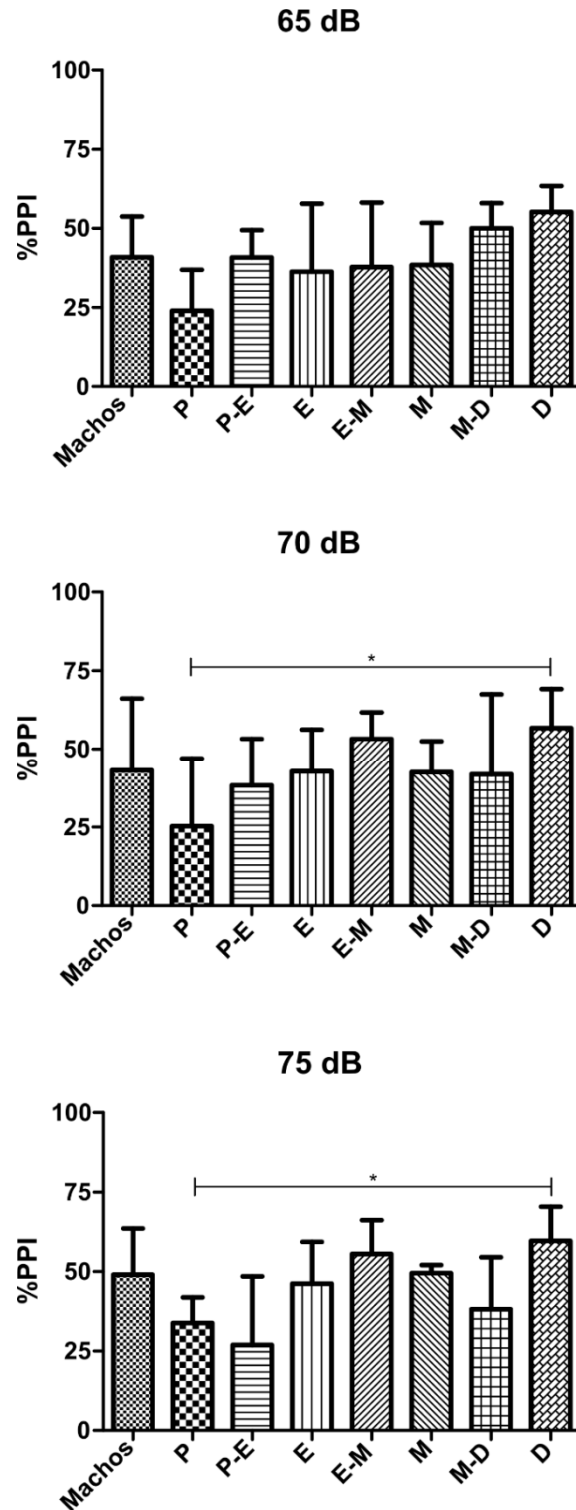


Figura 14. Gráficos da porcentagem de PPI com pré-estímulos de 65, 70 e 75 dB em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. As fêmeas em proestro apresentaram %PPI menor do que as fêmeas em diestro quando utilizados os pré-pulsos de 70 ($p = 0,0465$) e 75 dB ($p = 0,0262$). Os dados são apresentados como mediana e interquartil 75% (Apêndices F25 a F27) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn quando necessário (* = $p < 0,05$).

As concentrações hormonais e as variáveis comportamentais das fêmeas foram analisadas quanto à sua correlação (correlação de Spearman), independente da fase do ciclo estral, para estudar a possível influência dos hormônios ovarianos na amplitude, habituação do ASR e %PPI. Entretanto, não foram observadas correlações entre essas variáveis comportamentais e os níveis plasmáticos de estradiol ($n = 43$, Tabela 2) ou de progesterona ($n = 31$, Tabela 3).

Tabela 2. Tabela das correlações entre os níveis plasmáticos de estradiol e as variáveis comportamentais. Não houve correlação em nenhum dos casos analisados.

Correlação	Valor Spearman	Valor p
Estradiol x ASR	-0,1967	0,2061
Estradiol x %PPI 65 dB	0,2360	0,1276
Estradiol x %PPI 70 dB	0,2039	0,1898
Estradiol x %PPI 75 dB	0,1991	0,2005
Estradiol x %Habituação	-0,2135	0,1692

Tabela 3. Tabela das correlações entre os níveis plasmáticos de progesterona e as variáveis comportamentais. Também não houve correlação em nenhum dos casos analisados.

Correlação	Valor Spearman	Valor p
Progesterona x ASR	-0,1867	0,3146
Progesterona x %PPI 65 dB	0,0746	0,6900
Progesterona x %PPI 70 dB	0,0633	0,7351
Progesterona x %PPI 75 dB	0,2258	0,2219
Progesterona x %Habituação	0,1899	0,3062

As análises de correlação canônica entre as variáveis canônicas constituídas pelas variáveis hormonais e amplitude de ASR ($p = 0,698$), habituação ($p = 0,654$) ou as %PPI ($p = 0,447$) não demonstraram associação significativa ($n = 18$). No entanto, observou-se uma associação entre a variável canônica das %PPI e a concentração plasmática de progesterona (carga canônica cruzada, $p = 0,014$), isto é, os animais que apresentaram maior concentração plasmática de progesterona também apresentaram maior %PPI, com especial destaque para a PPI com pré-pulso de 75 dB (carga canônica = 0,667). Não foi observada associação significativa entre as %PPI e a concentração plasmática de estradiol (carga canônica cruzada, $p = 0,597$) (Tabela 4).

Tabela 4. Cargas canônicas e cargas canônicas cruzadas da associação entre as variáveis hormonais e as %PPI em fêmeas.

Variáveis	Cargas Canônicas	Cargas Canônicas Cruzadas
<i>Hormônios ovarianos</i>		
Estradiol	0,234	0,134 ($p = 0,597$)
Progesterona	0,999	0,570 ($p = 0,014$)
<i>%PPI</i>		
%PPI 65 dB	-0,028	-0,016 ($p = 0,951$)
%PPI 70 dB	-0,068	-0,039 ($p = 0,878$)
%PPI 75 dB	0,667	0,380 ($p = 0,120$)

Imunorreatividade à proteína Fos nos gêneros e ao longo do ciclo estral

Após a padronização do tempo de sobrevivência para a perfusão, foram perfundidos doze animais para análise semiquantitativa da presença da proteína Fos nos núcleos e áreas envolvidos nas vias do ASR e da PPI: machos (n = 3) e fêmeas em proestro (n = 3), estro (n = 3), metaestro (n = 3) e diestro (n = 3).

A análise qualitativa dos núcleos que apresentaram neurônios FOS-ir foi realizada no tronco encefálico e é apresentada em detalhes no Quadro 2. Em todos os grupos experimentais foram observados neurônios FOS-ir em núcleos próprios da via auditiva, como núcleo coclear dorsal (DCN) e núcleo central do colículo inferior (CIC). Também foram observadas regiões sabidamente relacionadas às vias de ASR/PPI, como o núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB), núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg) e o locus ceruleus (LC) (Figura 15).

Quadro 2. Distribuição qualitativa dos neurônios FOS-ir no tronco encefálico de machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

Núcleo/Área	Machos	♀ Proestro	♀ Estro	♀ Metaestro	♀ Diestro
IRt	●				
Cu	●				
Sp5	●	●	●	●	●
LRt	●	●	●	●	●
Sol	●				
IO	●				
Rob	●				
Rpa	●	●	●	●	●
Ecu	●				
Pa5	●	●	●	●	●
PCRt	●				
SpVe	●				●
LPGi	●		●	●	
Mve	●				
X	●		●	●	●
RVL	●		●	●	
GrCb	●	●	●	●	●
RMg	●		●	●	
PPy			●		
DCN	●	●	●	●	●
A5	●	●	●	●	●
VCP	●	●	●	●	●
LSO	●		●		
GrDC	●	●	●	●	●
VNTB	●	●	●	●	●
MNTB	●	●	●	●	●
SPON	●	●	●	●	●
DPO	●	●		●	●
Pr5VL	●			●	
SGe	●		●	●	●
LC	●	●	●	●	●
LNTB	●	●		●	●
CGA	●			●	
SubCV	●			●	●
DMTg	●			●	●
CGPn	●		●	●	
PDTg	●			●	
CGO	●		●	●	●

Quadro 2 (continuação). Distribuição qualitativa dos neurônios FOS-ir no tronco encefálico de machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

Núcleo/Área	Machos	♀ Proestro	♀ Estro	♀ Metaestro	♀ Diestro
RtTg	●	●			●
LDTg	●			●	
LPBC	●	●	●	●	●
DR	●				●
DTg	●				
KF	●			●	●
DCIC	●	●	●	●	●
ECIC	●	●	●	●	●
CIC	●	●	●	●	●
CG	●				●
VLL	●	●	●	●	●
PnO		●	●	●	
PPTg	●	●	●	●	
DLL	●	●		●	●
PAG	●	●	●	●	●
MnR	●		●	●	
CnF	●	●	●	●	●
MPL	●	●	●	●	
Pn	●	●	●	●	●
ILL	●		●	●	
TrLL			●		●
Com	●	●	●	●	●
MiTg				●	
SC	●	●	●	●	●
DpSC	●		●	●	
BIC	●	●	●	●	
SubB	●		●	●	
mRT	●			●	

Para a análise semiquantitativa, foram selecionados núcleos e regiões que são participantes da via auditiva, do ASR e/ou da PPI e que apresentaram neurônios FOS-ir em todos os grupos experimentais, permitindo a comparação das diferenças de atividade nos núcleos em que ela pôde ser detectada de maneira consistente, já que o ASR e a PPI foram observados em todos os animais.

Assim, selecionaram-se os seguintes núcleos para a contagem de neurônios FOS-ir e cálculo da densidade neuronal: núcleo coclear dorsal (DCN), núcleo pálido da rafe (RPa), núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB), núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB), núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg), núcleo cuneiforme (CnF), locus ceruleus (LC), grupamento noradrenérgico A5 (A5), núcleo central do colículo inferior (CIC), córtex externo do colículo inferior (ECIC) e córtex dorsal do colículo inferior (DCIC). As diferenças quanto ao número de neurônios e densidade neuronal estão sintetizadas no Quadro 3.

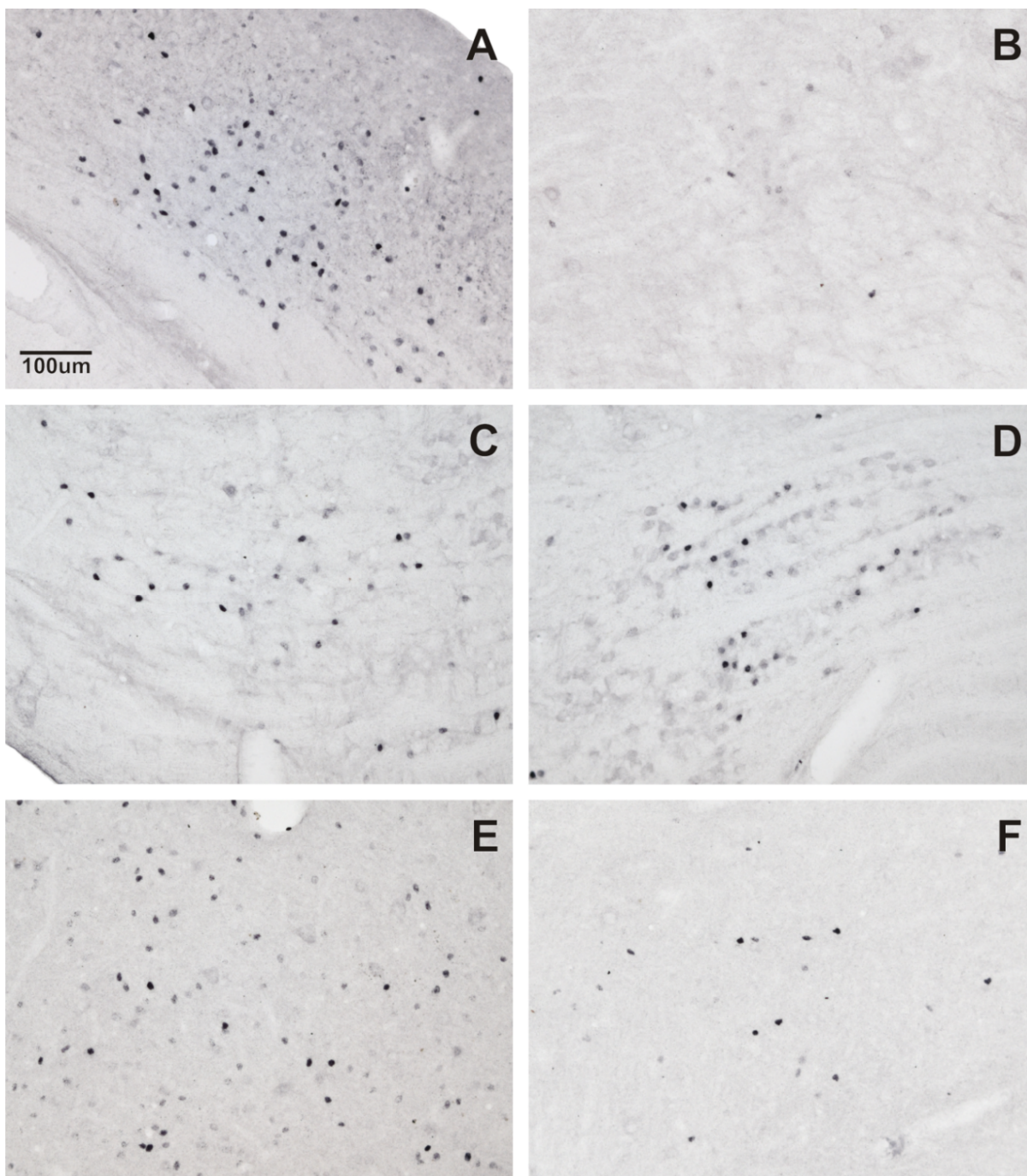


Figura 15. Neurônios FOS-ir nos núcleos da via auditiva e regiões sabidamente relacionadas às vias de ASR/PPI. A imunorreatividade à proteína é observada no núcleo dos neurônios. Em A, núcleo coclear dorsal (DCN). Em B, grupamento noradrenérgico A5 (A5). Em C, núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB). Em D, núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB). Em E, núcleo central do colículo inferior (CIC). Em F, núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg). A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

Quadro 3. Diferenças quanto ao número de neurônios e densidade neuronal encontradas nos núcleos selecionados para contagem de neurônios FOS-ir.

Núcleo	Número de neurônios FOS-ir	Densidade neuronal
DCN	-	-
RPa	♂ > ♀E	-
MNTB	♀P > ♀E	♀P > ♀E
VNTB	♀P > ♀E ♀P > ♀D	-
PPTg	♀P > ♀E	♀P > ♀E
CnF	♀P > ♀D	♀P > ♀D
LC	-	-
A5	♀P > ♀D	♀P > ♀D ♀P > ♀E > ♂
CIC	-	-
ECIC	♀P > ♀E	-
DCIC	♀M > ♀E ♀M > ♀D	♀P > ♀E

Não houve diferenças entre os gêneros e as fases do ciclo estral quanto ao número de neurônios FOS-ir ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, Apêndice F28) e densidade neuronal no DCN ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, Apêndice F29). Em relação ao RPa, os machos apresentaram mais neurônios FOS-ir do que fêmeas em estro ($p = 0,0399$, teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, Apêndice F30), mas sem diferenças significativas na densidade neuronal ($p > 0,05$, ANOVA, Apêndice F31).

No MNTB, as fêmeas em proestro apresentaram mais neurônios FOS-ir ($p = 0,009$, ANOVA, pós-teste de Tukey-Kramer, Apêndice F32) e maior densidade neuronal do que as fêmeas em estro ($p = 0,0244$, ANOVA, pós-teste de Tukey-Kramer, Apêndice F33). Por outro lado, as fêmeas em proestro apresentaram mais neurônios FOS-ir no VNTB do que as fêmeas em estro e diestro ($p = 0,0052$), mas sem diferenças significativas na densidade neuronal ($p > 0,05$) (Figura 16).

Núcleo ventral do corpo trapezoide (VNTB)

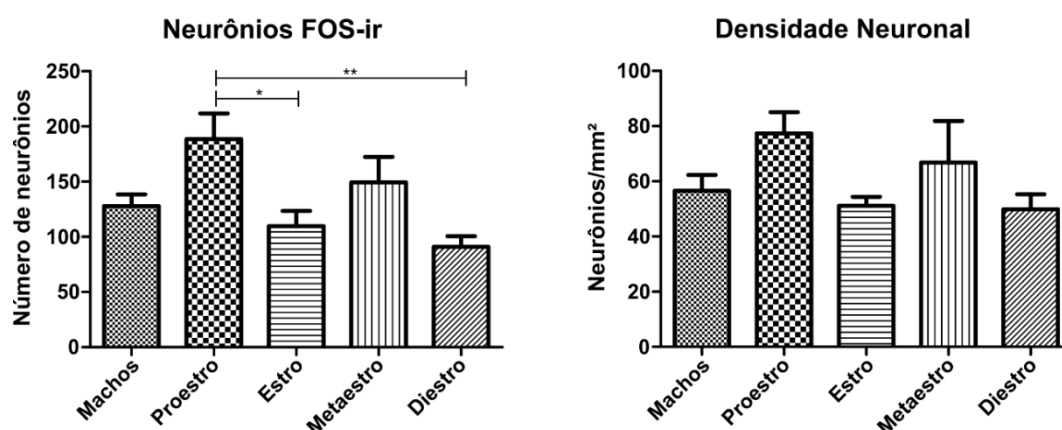


Figura 16. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no VNTB. O número de neurônios nas fêmeas em proestro é maior do que nas fêmeas em estro e diestro. Não foram observadas diferenças significativas na densidade neuronal. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F34 e F35) e foram analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer ($p = 0,0052$) e teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

No PPTg, as fêmeas em proestro apresentaram mais neurônios FOS-ir em relação às fêmeas em estro ($p = 0,0129$), assim como maior densidade neuronal ($p = 0,0118$) (Figura 17). As fêmeas em proestro também apresentaram mais neurônios FOS-ir no CnF ($p = 0,0199$) e maior densidade neuronal quando comparadas às fêmeas em diestro ($p = 0,0321$) (Figura 18).

Núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg)

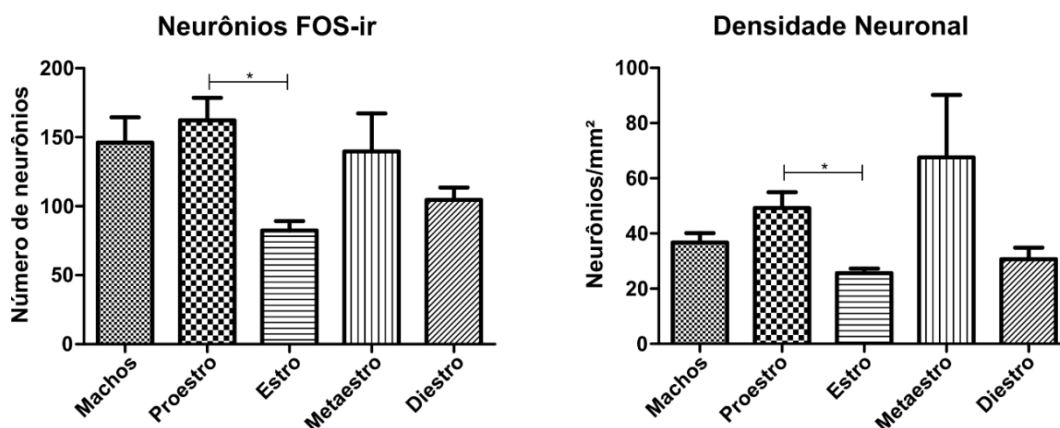


Figura 17. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no PPTg. As fêmeas em proestro apresentaram maior número de neurônios e maior densidade neuronal do que as fêmeas em estro. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F36 e F37) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,0129$ e $p = 0,0118$, respectivamente) seguido de pós-teste de Dunn (* = $p < 0,05$).

Núcleo cuneiforme (CnF)

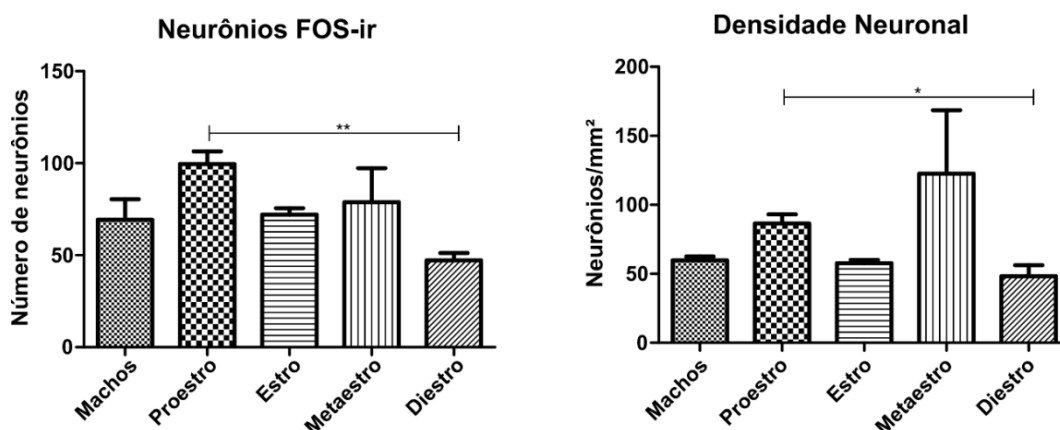


Figura 18. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no CnF. O número de neurônios FOS-ir nas fêmeas em proestro e sua densidade é maior do que nas fêmeas em diestro. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F38 e F39) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,0199$ e $p = 0,0321$, respectivamente) seguido de pós-teste de Dunn (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

A número de neurônios FOS-ir e sua densidade não varia significativamente no LC ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, Apêndices F40 e F41). Já no grupamento noradrenérgico A5, o número de neurônios FOS-ir foi maior nas fêmeas em proestro em relação às fêmeas em diestro ($p = 0,0092$), assim como sua densidade neuronal, que também foi maior nas fêmeas em proestro em relação a machos e fêmeas em estro ($p < 0,0001$). Os machos também possuem menor densidade neuronal do que as fêmeas em estro (Figura 19).

Grupamento noradrenérgico A5 (A5)

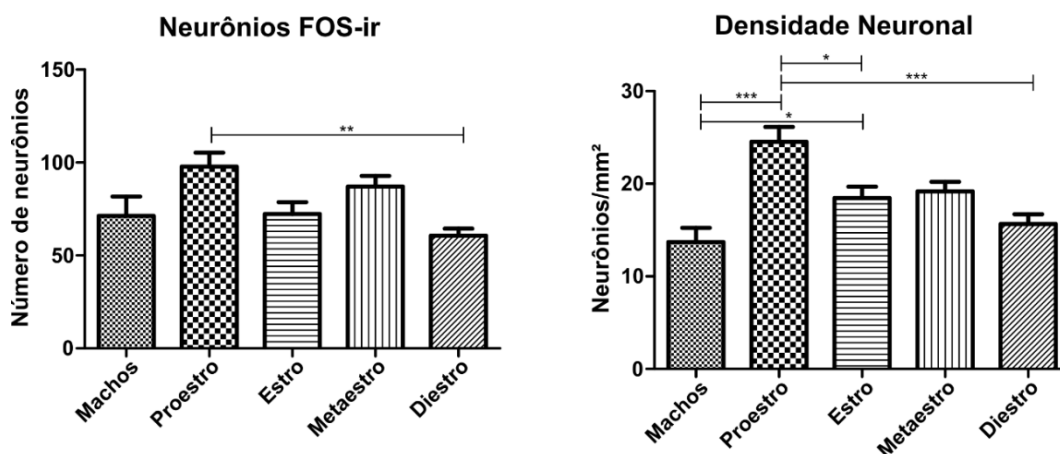


Figura 19. Gráficos do número de neurônios FOS-ir e sua densidade neuronal no A5. O número de neurônios FOS-ir nas fêmeas em proestro e sua densidade é maior do que nas fêmeas em diestro. A densidade neuronal também é maior nas fêmeas em proestro em relação a machos e fêmeas em estro, que apresentam maior densidade neuronal que machos. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (Apêndices F42 e F43) e foram analisados por ANOVA ($p = 0,0092$ e $p < 0,0001$, respectivamente) seguido de pós-teste de Tukey-Kramer (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Não foram observadas variações significativas no número de neurônios FOS-ir e sua densidade no CIC ($p > 0,05$, ANOVA, Apêndices F44 e F45). Não foram observadas diferenças na densidade neuronal no ECIC ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, Apêndice F47), embora no número de neurônios em proestro fosse maior que em estro ($p = 0,0163$, teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn $p > 0,1$, Apêndice F46). No DCIC, as fêmeas em metaestro apresentaram mais neurônios FOS-ir que as fêmeas em estro e diestro ($p = 0,0061$, teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, Apêndice F48). No entanto, em relação à densidade neuronal, as fêmeas em proestro têm maior densidade que as em estro ($p = 0,0174$, teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, Apêndice F49).

As médias de densidade neuronal nas fêmeas em proestro sempre foram as maiores em todos os núcleos que sabidamente subsidiam a PPI, exceto para o PPTg e CnF nas fêmeas em metaestro (Tabela 5). Esse aspecto reflete a existência de diferenças estatísticas sempre envolvendo a fase de proestro, nos quais os valores de contagem e densidade sempre são os mais elevados.

Tabela 5. Densidade de neurônios FOS-ir encontradas nos núcleos selecionados para contagem.

	<i>Densidade neuronal</i>				
	Machos	♀ Proestro	♀ Estro	♀ Metaestro	♀ Diestro
VNTB	56,55 ± 5,8	77,40 ± 7,7	51,11 ± 3,3	66,75 ± 15,1	49,90 ± 5,4
PPTg	36,74 ± 3,4	49,22 ± 5,7	25,63 ± 1,7	67,55 ± 22,7	30,69 ± 4,2
CnF	59,69 ± 2,8	86,48 ± 6,7	57,79 ± 2,4	122,6 ± 46,0	48,19 ± 8,0
LC	30,74 ± 3,1	46,12 ± 5,3	32,42 ± 4,0	29,37 ± 7,0	28,35 ± 4,1
A5	13,70 ± 1,5	24,55 ± 1,6	18,47 ± 1,2	19,18 ± 1,0	15,67 ± 1,1
CIC	161,8 ± 17,2	203,4 ± 54,3	126,8 ± 20,8	187,3 ± 30,7	157,0 ± 24,7

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foi possível avaliar, em função do gênero ou fase do ciclo estral, a amplitude, latência, porcentagem de habituação e de PPI do ASR, concentrações plasmáticas de hormônios ovarianos e alterações no padrão de atividade neuronal de núcleos do tronco encefálico relacionados às vias auditiva, do ASR e da PPI por meio da detecção da proteína Fos.

Identificamos que a amplitude normalizada do ASR e sua latência não diferem entre os gêneros. No entanto, a porcentagem de habituação, de PPI e o padrão de atividade neuronal sofreram modificações em função do gênero ou das diferentes fases do ciclo estral. Apesar de observarmos uma associação entre a progesterona e as porcentagens de PPI, não foi possível encontrar uma correlação direta entre as concentrações plasmáticas de estradiol ou progesterona com cada parâmetro comportamental. Também identificamos modificações na amplitude de ASR durante a sessão de avaliação que justificam atenção à configuração de protocolos de mensuração. Assim, acreditamos que o gênero e as fases do ciclo estral devam sempre ser considerados no planejamento e na coleta dos dados comportamentais de ASR.

Estadiamento do ciclo estral

Consideramos que o acompanhamento do ciclo estral das fêmeas antes do início da fase de avaliação do ASR e da PPI foi fundamental para que os animais pudessem se habituar à rotina de coleta de lavado vaginal que, posteriormente, foi realizada na mesma manhã da prova comportamental, reduzindo a interferência que essa manipulação poderia causar. A avaliação do lavado vaginal permitiu também examinar a regularidade do ciclo estral no início e durante todo o protocolo experimental, excluindo animais com ciclo irregular ou em anestro.

O estadiamento do ciclo estral pelo lavado vaginal pôde ser confirmado pela observação da morfologia do útero nas fêmeas perfundidas para o protocolo de imuno-histoquímica para a proteína Fos. Nesses casos experimentais, a morfologia uterina foi compatível com a fase do ciclo estadiada pelo lavado vaginal (EVERETT, 1989), sem sinais de pseudo-gravidez. As fêmeas perfundidas em proestro apresentavam o útero dilatado e com grande quantidade de fluido, o que concorda com descrições prévias desse órgão nessa fase do ciclo estral (EVERETT, 1989).

A quantidade de dados comportamentais coletados nas diferentes fases do ciclo estral variou entre $n = 6$ (estro-metaestro) e $n = 24$ (diestro), o que reflete, em parte, a maior probabilidade de estadiar fases do ciclo estral com maior duração (WESTWOOD, 2008). Para obter o maior número possível de dados de todas as fases e transições, consideramos muito interessante prognosticar o estadiamento do ciclo pela observação do lavado vaginal a fresco antes da mensuração do ASR, para evitar estimulação repetida de animais nas fases mais longas em detrimento das mais curtas. Posteriormente, o estadiamento foi confirmado com o diagnóstico da fase por dois pesquisadores de forma independente, após a coloração do lavado vaginal.

Mensuração do reflexo auditivo de sobressalto e sua inibição por estímulo prévio

O protocolo de mensuração do reflexo auditivo de sobressalto empregado foi padronizado previamente por nosso grupo de pesquisa (MARTINS, 2013), e gerou respostas válidas em todos os blocos da sessão de avaliação. A apresentação prévia de estímulos sonoros de 65, 70 e 75 dB foi

capaz de diminuir a amplitude do ASR, o que condiz com o paradigma da PPI (KOCH, 1999). Mesmo assim, a variabilidade das respostas de sobressalto é grande e esperada, tanto em animais experimentais, quanto no homem (ARMBRUSTER et al., 2014).

Não houve diferenças na amplitude normalizada do ASR em nenhum momento da sessão de avaliação entre machos e fêmeas em qualquer fase do ciclo estral. Esses resultados corroboram as observações do grupo controle no trabalho de Palénicék et al. (2010), embora nosso estudo discrimine com muito mais detalhe a análise comportamental nas fases e transições do ciclo estral e utilize animais adultos, e não púberes, o que evita possíveis variações hormonais decorrentes da idade.

Por outro lado, Kinkead et al. (2008) observaram que a amplitude do ASR em ratos *Long-Evans* é maior em machos do que em fêmeas em proestro e metaestro. Essa diferença poderia relacionar-se à falta de normalização das respostas de ASR pelo peso dos animais, já que não há referências metodológicas a esse procedimento nem indicação dessa ponderação na descrição dos resultados desse estudo.

Não observamos diferenças na latência de pico máximo do ASR entre os grupos experimentais, assim como o descrito em machos e fêmeas adultos *Long-Evans* (KINKEAD et al., 2008) e entre homens e mulheres (SWERDLOW et al., 1997; JOVANOVIC et al., 2004).

Em nosso estudo, também não foram observadas diferenças significativas nas %PPI entre machos e fêmeas em qualquer fase do ciclo estral. No entanto, fêmeas em proestro têm menor %PPI que fêmeas em diestro quando o pré-pulso utilizado é maior ou igual a 70dB. Assim, observamos que a fase do ciclo estral influencia a PPI em fêmeas, sendo fundamental seu estadiamento durante a coleta de dados comportamentais.

Portanto, em trabalhos que pretendam avaliar a %PPI entre machos e fêmeas, indicamos que os resultados obtidos em fêmeas em proestro devam ser tratados separadamente daqueles obtidos nas demais fases do ciclo e em machos. A segregação do proestro deve ser vantajosa metodologicamente por ser uma fase curta comparada ao diestro.

Outros aspectos indicam que os dados obtidos em proestro devam ser tratados separadamente para comparação entre gêneros e fases do ciclo estral. Assim, verificamos diferenças na atividade neuronal detectada por meio da proteína Fos quase sempre envolvendo essa fase do ciclo. Também encontramos no proestro a menor concentração de estradiol, embora sem diferença estatística.

Nossos resultados corroboram observações em fêmeas *Sprague-Dawley* adultas, as quais também apresentam menor %PPI em proestro quando comparadas a fêmeas em diestro (KOCH, 1998). Porém, nesse trabalho, também foram observadas diferenças entre machos e fêmeas em estro, não encontradas em nosso estudo. Além disso, as alterações na PPI foram discutidas com base na possível influência das concentrações plasmáticas de estradiol ao longo do ciclo estral, cuja correlação não foi possível em nosso estudo.

Trabalhos prévios ao nosso, que utilizaram o mesmo modelo experimental (ratos da linhagem *Wistar*), apresentam resultados divergentes, seja com ausência de interação entre o gênero ou as

fases do ciclo estral e a PPI em ratos púberes (ADAMS et al., 2008; PALENICEK et al., 2010), seja com machos adultos apresentado maior PPI que fêmeas com pré-pulsos ≥ 76 dB (FARADAY et al., 1999; LEHMANN et al., 1999). Destaca-se, contudo, que Lehmann et al. (1999) não separaram as fêmeas de acordo com o ciclo estral, de tal forma que as diferenças nas fases não foram consideradas.

Em mulheres, as menores porcentagens de PPI são encontradas durante a fase lútea (SWERDLOW et al., 1997; JOVANOVIĆ et al., 2004), que corresponde às fases de metaestro e diestro em ratas e, portanto, diferem dos resultados encontrados em nosso estudo.

Nosso desenho experimental pretendia analisar o ASR e a PPI em machos e fêmeas intactos, com os sistemas neuroendócrinos em condições fisiológicas normais. Por esse motivo, a coleta de sangue foi realizada imediatamente após a mensuração do ASR/PPI, buscando sua possível relação com as concentrações circulantes dos hormônios ovarianos ao término da avaliação comportamental.

Assim, todas as amostras foram coletadas no período da manhã, nas primeiras horas do ciclo claro, e acreditamos que isso influenciou as concentrações hormonais observadas. Esse aspecto pode explicar porque, embora haja variação na concentração plasmática entre as fases do ciclo estral, não existem diferenças estatísticas entre elas, assim como os picos hormonais não puderam ser identificados, como descritos previamente, quando as concentrações hormonais foram acompanhadas em curtos intervalos de tempo ao longo de todo o dia (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975; FACCIO et al., 2013).

Apesar de não serem observadas correlações significativas nas fêmeas entre as concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos e os parâmetros comportamentais, tanto isoladamente quanto na correlação canônica entre as concentrações hormonais e o conjunto das %PPI, observou-se que as concentrações plasmáticas de progesterona têm relação direta com a variável canônica de porcentagem de inibição, ou seja, quanto maior a concentração plasmática de progesterona, maior as %PPI, especialmente com o pré-pulso de 75 dB, indicando que a PPI está sujeita a alterações de acordo com a flutuação hormonal ao longo do ciclo estral.

Estudos farmacológicos indicaram que houve um aumento na %PPI 18 h após a administração de estradiol em fêmeas *Sprague-Dawley* ovariectomizadas (VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001). Já a administração de progesterona em ratos *Wistar* machos controles diminuiu a amplitude do ASR sem alterar a %PPI (RUPPRECHT et al., 1999). Além disso, a administração de agonistas do receptor de estrógeno subtipo alfa em camundongos machos controles aumentou a %PPI; que diminuiu após a administração de antagonistas (LABOUESSE et al., 2015). Por outro lado, agonistas do receptor de estrógeno subtipo beta foram capazes de diminuir a amplitude do ASR nesse mesmo grupo experimental (LABOUESSE et al., 2015).

Outro aspecto a ser considerado é que estrógenos podem exercer modulação direta na cóclea, através de receptores específicos (STENBERG et al., 1999; CHARITIDI et al., 2009; AL-MANA et al., 2010). Sabe-se, por exemplo, que existe modulação da sensibilidade auditiva pelo sistema olivococlear medial durante o ciclo menstrual (AL-MANA et al., 2010), aumentando a sensibilidade auditiva nas mulheres no período pré-ovulação.

Apesar disso, nossos resultados sugerem que os níveis circulantes de progesterona sejam mais importantes para as variações na %PPI em fêmeas, o que também explicaria a ausência de diferenças em relação aos machos, que possuem níveis extremamente baixos desse hormônio no cérebro (TAVES et al., 2013). Também é possível que as influências do ciclo estral na PPI aconteçam por efeitos combinados do estradiol com a progesterona (BANNBERS et al., 2010), cujos metabólitos podem interagir com receptores GABAérgicos (BAULIEU et al., 1996) em núcleos relacionados às vias da PPI. No entanto, não identificamos a associação da variável canônica hormonal com a variável canônica %PPI em nossa análise multivariada.

É importante destacar que a influência do gênero e das fases do ciclo estral no ASR e na PPI foi estudada em animais sexualmente maduros e, por isso, esses resultados não podem ser extrapolados para animais em outras faixas etárias (BECKER et al., 2005). Além disso, compartilhamos da opinião de trabalhos prévios (CAHILL, 2006) que as variações na %PPI estejam relacionadas a diferenças funcionais presentes no sistema nervoso central entre as fases do ciclo estral, mais do que às variações hormonais que nelas ocorrem.

Com relação à amplitude média do ASR nos três blocos da sessão de avaliação, não foram observadas diferenças entre o Bloco Avaliação ASR/PPI e os Blocos Inicial e Final, exceto nas fêmeas em diestro, nas quais ocorreu diminuição da amplitude do ASR no Bloco Final, fenômeno que não se caracteriza como habituação intrassessão. Machos e fêmeas em proestro-estro e metaestro sofreram habituação intrassessão do reflexo, ou seja, diminuição da amplitude do ASR entre o Bloco Inicial e o Bloco Final.

Na habituação intrassessão, a amplitude do ASR diminuiu devido à estimulação repetida e não se deve a uma adaptação sensorial ou fadiga motora (RANKIN et al., 2009). Sabe-se que o processo de habituação ao sobressalto está restrito a estruturas do tronco encefálico, uma vez que ratos machos descerebrados continuam a apresentá-la (FOX, 1979; LEATON et al., 1985), mas seus mecanismos neurais ainda são pouco estudados (RANKIN et al., 2009).

Relatos prévios indicaram que machos *Wistar* controles habituem mais rapidamente ao estímulo sonoro do que fêmeas, nas quais não houve o controle do ciclo estral (LEHMANN et al., 1999), assim como machos *Long-Evans* em relação a fêmeas em diestro (GULINELLO et al., 2003). Não foi identificada uma relação entre a habituação intrassessão e os níveis hormonais de estradiol, pois a administração aguda de estradiol não promoveu a habituação intrassessão em fêmeas Sprague-Dawley ovariectomizadas (VAN DEN BUUSE e EIKELIS, 2001). Em nosso estudo, também não foi possível encontrar uma correlação significativa entre a porcentagem de habituação intrassessão e as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona.

A ausência de diferenças estatísticas na amplitude média dos Blocos Inicial e Final com o Bloco Avaliação ASR/PPI, com exceção do Bloco Final das fêmeas em diestro, indica que o Bloco Avaliação ASR/PPI é o melhor momento dentro da sessão de avaliação comportamental para comparação de animais de diferentes gêneros e fases do ciclo estral. Para determinar qual número de tentativas seria ideal nos Blocos Inicial e Final em protocolos de avaliação envolvendo ambos os gêneros, foram realizadas as análises para identificar as diferenças na amplitude média do ASR, tentativa a tentativa ao longo da sessão.

Observou-se que um Bloco Inicial com quatro tentativas seria ideal para avaliação dos machos, enquanto que bastariam três tentativas no caso de fêmeas na transição proestro-estro. Nas demais fases e transições do ciclo estral, não foram encontradas diferenças significativas entre as primeiras tentativas e as demais, não sendo essencial a existência do Bloco Inicial.

Como os machos e as fêmeas em proestro-estro apresentaram habituação intrassessão do ASR (Figura 12), o fato de haver um conjunto inicial de tentativas com amplitudes médias mais altas nos leva a acreditar que, nesses animais, a amplitude de ASR diminui logo no início da sessão e tende a se manter mais constante até o final. Assim, a habituação intrassessão observada nesses grupos é caracterizada por uma maior amplitude das primeiras tentativas em relação às demais.

Por outro lado, ainda com base nessa análise, indicamos a necessidade da existência de um Bloco Final para as fêmeas em metaestro e diestro. O tamanho do Bloco Final não deve ser menor do que cinco tentativas nas fêmeas em metaestro e oito tentativas nas fêmeas em diestro. Portanto, para avaliação do ASR nas fêmeas em diestro, seria necessário que o bloco de avaliação terminasse mais cedo, em uma sessão mais curta, com um número total de estímulos de no máximo de 44 tentativas, já que esta é a tentativa de antecede as oito últimas tentativas de ASR durante a nossa sessão de avaliação.

Devido às fêmeas em metaestro apresentarem habituação intrassessão do ASR e as fêmeas em diestro apresentarem diminuição da amplitude de ASR entre o Bloco Avaliação ASR/PPI e o Bloco Final (Figura 12), acreditamos que o conjunto de tentativas finais com amplitudes médias mais baixas nesses animais determine a diminuição da amplitude de ASR de forma mais importante no final da sessão, diferentemente do que ocorre em machos e fêmeas em proestro-estro. Isso reforça a necessidade de configurar a sessão de forma que o bloco de avaliação termine mais cedo.

Considerando a dificuldade metodológica de utilizar uma sessão de avaliação diferente para machos e fêmeas em cada fase do ciclo estral, o que levaria à necessidade de estadiamento prévio à avaliação do ASR, e poderia incutir dificuldades na análise dos dados, como desbalanceamento do número de tentativas avaliadas, sugerimos a configuração de uma sessão de avaliação do ASR que fosse válida para ambos gêneros.

Nossa proposta para uma sessão, com os mesmos parâmetros de intervalo entre tentativas de 30 s com variação aleatória de 33%, seria configurar a sessão de forma mais restritiva, delimitando os blocos nos momentos em que foram encontradas as diferenças nas amplitudes médias ao longo da sessão. Assim, o bloco inicial teria no mínimo 4 tentativas, respeitando a diferença encontrada no conjunto de tentativas iniciais dos machos e o bloco de avaliação do ASR poderia se estender até a 44^a tentativa, respeitando o momento em que as fêmeas em diestro começam a apresentar menor amplitude de ASR, levando à habituação intrassessão (Figura 20).

Destacamos, entretanto, que essa proposta não invalida os resultados encontrados em nosso estudo, uma vez que nosso protocolo de avaliação do ASR possui cinco tentativas iniciais e finais que são excluídas do cálculo da amplitude média ASR, ou seja, com margem de segurança para todos os grupos experimentais. Apenas nas fêmeas em diestro poderia haver uma pequena influência na amplitude média do ASR pelo Bloco Final ser um pouco mais curto que o desejável para essa fase.

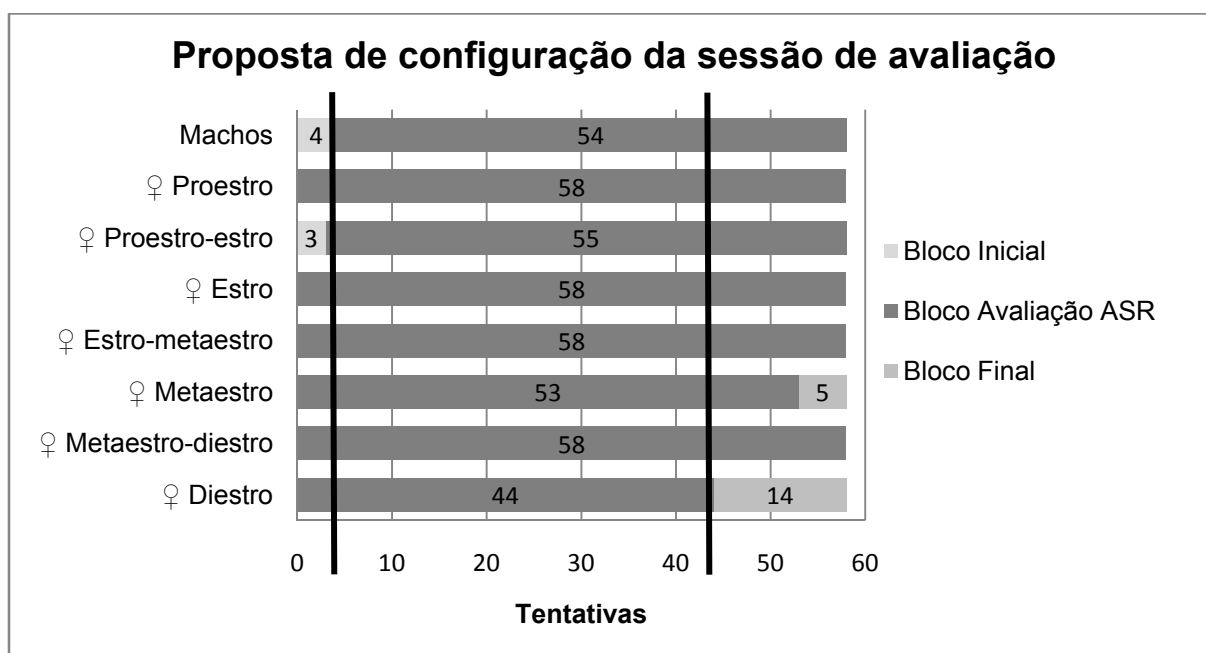


Figura 20. Proposta de configuração do tamanho dos blocos da sessão de avaliação do ASR para machos e fêmeas em cada fase do ciclo estral, com base na análise das diferenças de amplitude média do ASR entre conjuntos de tentativas ao longo da sessão de avaliação. As linhas pretas indicam os momentos em que os blocos da sessão deveriam ser configurados para que uma sessão de avaliação do ASR pudesse ser utilizada em ambos os gêneros sem influência da habituação intrassessão.

A análise da habituação intrassessão em modelos animais também é valiosa porque eles são a base para estudos translacionais de déficits sensório-motores em pacientes com esquizofrenia. Apesar de homens jovens saudáveis apresentarem habituação ao reflexo (ORNITZ e GUTHRIE, 1989), pacientes com a doença (grupo misto de homens e mulheres) não habituem ao reflexo (GEYER et al., 1990).

A extensão das diferenças espécie-específicas que existem no ASR e na PPI, que divergem entre os modelos experimentais e o homem, é de extrema importância. Metodologicamente, esse conhecimento é essencial para delinear futuros estudos e executá-los corretamente, para entender como resultados obtidos em modelos experimentais podem auxiliar no estudo da condição humana (FARADAY e GRUNBERG, 2000).

Imunorreatividade à proteína Fos nos gêneros e ao longo do ciclo estral

A proteína Fos atua como um fator de transcrição expresso no núcleo após estímulos externos variados, como influxo de Ca^{2+} , neurotransmissores, fatores de crescimento ou fármacos, mas não necessariamente despolarização neuronal (HOFFMAN e LYO, 2002; KOVACS, 2008). Ela está presente fundamentalmente em neurônios, mas pode ser encontrada em células da glia após injúria tecidual (ARENANDER e DE VELLIS, 1992), como lesão e estresse térmico, o que não acontece em nosso protocolo experimental. Dessa maneira, a imunorreatividade à proteína Fos foi utilizada como um marcador de modificação da atividade neuronal tanto na via auditiva (FRIAUF, 1995; CHEN et al., 2000; NAKAMURA et al., 2005) quanto em estudos sobre o ciclo estral (JENNES et al., 1992; CONDE et al., 1995).

Os neurônios FOS-ir analisados não sofreram influência da manipulação experimental realizada para anestesia e perfusão, porque a proteína Fos começa a ser expressa no mínimo entre

35 e 40 min após o estímulo desencadeante, não sendo sensível para detecção de alterações na atividade neuronal determinadas por estímulos realizados imediatamente antes da eutanásia (HOFFMAN et al., 1993a).

Com relação ao gênero e às fases do ciclo estral, destacamos que nas fêmeas em proestro foi observado o maior número de neurônios imunorreativos à proteína Fos em núcleos relacionados à PPI como VNTB, PPTg, CnF, LC e A5. Por outro lado, também foi nessa fase em que observamos a distribuição qualitativamente mais restrita de neurônios FOS-ir. Assim, ressaltamos que, tanto na %PPI quanto na atividade de centros neurais, quando foram identificadas diferenças entre gêneros e fases do ciclo estral, as fêmeas em proestro quase sempre estiveram envolvidas.

Não foram encontradas diferenças no número de neurônios e sua densidade no DCN entre nenhum dos gêneros e fases do ciclo. Não existem relatos de variação na atividade do DCN ao longo do ciclo estral, apesar de existirem receptores dos subtipos alfa e beta de estrógeno nas células ciliadas internas e externas da cóclea e células do tipo I e tipo II no gânglio espiral (STENBERG et al., 1999), que poderiam modular sua atividade.

No RPa, observou-se menos neurônios FOS-ir nas fêmeas em estro em relação a machos. O RPa é um núcleo serotoninérgico que envia projeções para núcleos do sistema nervoso simpático (LOEWY et al., 1981) e também ao PnC (GALLAGER e PERT, 1978). Estudos eletrofisiológicos em gatos também mostram que o RPa responde a estimulações acústicas intensas e inesperadas (BLAIR e EVANS, 1991), o que poderia relacioná-lo aos circuitos subjacentes ao ASR, assim como a imunorreatividade observada em nossos grupos experimentais.

A análise do MNTB mostrou que as fêmeas em proestro têm mais neurônios FOS-ir e maior densidade neuronal que fêmeas em estro. Apesar de o MNTB ser historicamente descrito como responsável pela localização de sons (KOPP-SCHEINPFLUG et al., 2008), resultados recentes de nosso grupo de pesquisa indicam que ele também envia eferências aos CRN e, portanto, poderia participar de vias de modulação do ASR.

As fêmeas em proestro apresentam mais neurônios FOS-ir do que as fêmeas em estro e diestro no VNTB, mas sem diferenças em sua densidade neuronal. Sabe-se que os neurônios do VNTB enviam eferências aos CRN (GOMEZ-NIETO et al., 2008) e participam da via rápida da PPI, com intervalos entre estímulos ≤ 50 ms (GOMEZ-NIETO et al., 2013), promovendo o aumento da %PPI (BARIONI, 2015). Nossos resultados corroboram a participação do VNTB na via da PPI e indicam que nele foi detectada maior alteração da atividade neuronal durante o proestro, fase que apresenta menores %PPI.

De maneira similar, as fêmeas em proestro têm mais neurônios FOS-ir e maior densidade neuronal no PPTg do que fêmeas em estro. O PPTg envia eferências colinérgicas inibitórias ao PnC (KOCH et al., 1993) que foram descritos como essenciais na mediação da PPI (KOCH et al., 1993; FENDT et al., 2001; YEOMANS et al., 2006). Intimamente associado ao PPTg se encontra o CnF, no qual as fêmeas em proestro apresentaram mais neurônios FOS-ir bem como maior densidade neuronal quando comparadas às fêmeas em diestro.

O CnF também envia eferências ao PnC (KORTE et al., 1992) e diversos trabalhos que descrevem as funções do PPTg em relação ao sobressalto também envolvem o CnF (KOCH et al.,

1993; SWERDLOW e GEYER, 1993b). A estimulação elétrica do CnF (e regiões adjacentes) antes da apresentação de um estímulo desencadeante do sobressalto provoca diminuição da amplitude do ASR (SAITOH et al., 1987), ou seja, esse núcleo participaria da via da PPI.

A lesão do CnF também diminui a porcentagem de PPI, além de impedir a habituação intersessão (LEITNER et al., 1981). Lesões no complexo PPTg/CnF causam diminuição da %PPI sem alterar a amplitude do ASR (KOCH et al., 1993; SWERDLOW e GEYER, 1993b), mas, diferentemente dos resultados de Leitner et al. (1981), somente o tamanho da lesão no PPTg se correlaciona com a diminuição da %PPI.

Estudos recentes da atividade metabólica do encéfalo de ratos através de PET, após uma prova de mensuração da PPI, indicaram que tanto o PPTg quanto o CnF têm aumento da atividade metabólica (ROHLEDER et al., 2014), sendo que, no caso do CnF, a intensidade da atividade se correlaciona positivamente com o número de tentativas nas quais houve diminuição da amplitude do reflexo (ROHLEDER et al., 2014). Em conjunto, o VNTB, o PPTg e o CnF são descritos como núcleos que medeiam a PPI (GOMEZ-NIETO et al., 2013; MACLAREN et al., 2014; ROHLEDER et al., 2014) e neles foram detectadas alterações da atividade neuronal nas fêmeas em proestro, nas quais observamos diminuição da %PPI.

O grupamento noradrenérgico A5 apresentou mais neurônios FOS-ir nas fêmeas em proestro em relação às fêmeas em diestro. Sua densidade neuronal também foi maior nas fêmeas em estro e diestro e machos, que apresentaram menor densidade neuronal do que as fêmeas em estro. Resultados de nosso grupo de pesquisa mostram que o A5 envia projeções aos CRN e PnC, que compõe a via do ASR (DA SILVA, 2015). Além disso, lesões seletivas no A5 indicam que ele participa de circuitos relacionados à PPI com longos intervalos entre estímulos (DA SILVA, 2015).

O LC também envia eferências aos CRN (HORMIGO et al., 2015) e participa das vias da PPI, mas não foram observadas diferenças significativas na quantidade de neurônios FOS-ir e sua densidade entre os grupos experimentais, apesar das fêmeas em proestro apresentarem mais neurônios e densidade do que os demais animais.

No colículo inferior, não houve diferenças significativas entre os gêneros nem no número nem na densidade de neurônios FOS-ir no CIC, assim como no ECIC. No DCIC, as fêmeas em metaestro apresentaram mais neurônios FOS-ir do que as fêmeas em estro e diestro. Entretanto, a maior densidade neuronal foi observada nas fêmeas em proestro em relação às em estro.

O colículo inferior integra as vias auditivas ascendentes e descendentes, mas também já foi descrito como integrante da via da PPI devido à sua projeção ao PPTg (KOCH et al., 1993), que culmina em eferências ao PnC (LI et al., 1998; FENDT et al., 2001; YEOMANS et al., 2006). Mais especificamente, lesões no CIC provocam déficits na PPI (LI et al., 1998). Estudos mais recentes também mostraram que o CIC envia eferências a neurônios do VNTB que projetam para o CRN (GOMEZ-NIETO et al., 2008), indicando que ele também participa de vias da PPI relacionadas a intervalos entre estímulos mais curtos (GOMEZ-NIETO et al., 2008).

Convém destacar, entretanto, que apesar da detecção da proteína Fos ser amplamente utilizada para avaliação de alterações de atividade neuronal, essa técnica apresenta baixa resolução temporal, falta de informação sobre a conectividade das células marcadas, e impossibilidade de

quantificação em tempo real da alteração promovida (KOVACS, 2008). Dessa forma, entendemos que, embora seja importante para uma análise ampla da atividade de centros neurais no sistema nervoso, a informação provinda desses experimentos deve ser complementada com outras técnicas para enriquecer a discussão dos resultados encontrados.

Ainda assim, consideramos relevante a alteração da atividade neuronal observada nas fêmeas em proestro, especialmente nos núcleos relacionados à PPI, mesmo que não sejam observadas diferenças estatísticas. Dessa maneira, acreditamos que a fase de proestro promova alterações no padrão de atividade neuronal nas vias da PPI, provocando alterações na expressão desses comportamentos. Poderia existir um tônus inibitório na fase do proestro que alterasse o funcionamento dos núcleos relacionados à PPI, que seria evidenciado pela patente alteração na atividade neuronal detectada pela proteína Fos nessa fase do ciclo estral, e a inibição sobre núcleos reconhecidamente promotores de inibição no paradigma da PPI poderia explicar a diminuição da %PPI observada em proestro.

CONCLUSÕES

Com base em nosso trabalho podemos concluir que:

- A amplitude normalizada e a latência do ASR não variam entre os gêneros e fases do ciclo estral.
- As fêmeas em proestro apresentam as menores %PPI e as maiores alterações da atividade neural detectada, nos núcleos relacionados às vias da PPI, pela proteína Fos; em ambos os casos, com diferenças estatísticas em relação aos machos ou a outras fases do ciclo estral.
- Há uma associação direta entre as concentrações plasmáticas de progesterona e as %PPI, especialmente na PPI obtida com pré-pulso de 75 dB.
- O padrão de habituação intrassessão é diferente entre as fases do ciclo estral e em machos.
- Protocolos experimentais devem ser propostos levando-se em conta essas diferenças para configurar as sessões de avaliação do ASR/PPI, bem como analisar os dados obtidos em machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, A. L. et al. Effects of estrous stage and time of day on prepulse inhibition in female rats. **J Neurosci Methods**, v. 173, p. 295-8, 2008.
- ADAMS, J. C. Heavy metal intensification of dab-based hrp reaction product. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 775, 1981.
- AL-MANA, D. et al. Alteration in auditory function during the ovarian cycle. **Hear Res**, v. 268, p. 114-22, 2010.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: What is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, p. 49-51, 2012.
- ANGERMEYER, M. C.; KUHN, L. Gender differences in age at onset of schizophrenia. An overview. **Eur Arch Psychiatry Neurol Sci**, v. 237, p. 351-64, 1988.
- ANISMAN, H. et al. Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: Relation to monoamine activity. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4405-16, 2000.
- ARENANDER, A.; DE VELLIS, J. Early response gene induction in astrocytes as a mechanism for encoding and integrating neuronal signals. **Prog Brain Res**, v. 94, p. 177-88, 1992.
- ARMBRUSTER, D. et al. The impact of sex and menstrual cycle on the acoustic startle response. **Behav Brain Res**, v. 274, p. 326-33, 2014.
- BACKSTROM, T.; CARSTENSEN, H.; SODERGARD, R. Concentration of estradiol, testosterone and progesterone in cerebrospinal fluid compared to plasma unbound and total concentrations. **J Steroid Biochem**, v. 7, p. 469-72, 1976.
- BANNBERS, E. et al. Lower levels of prepulse inhibition in luteal phase cycling women in comparison with postmenopausal women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, p. 422-9, 2010.
- BARIONI, N. O. **Estudo comportamental das aferências do núcleo ventral do corpo trapezoide ao primeiro núcleo do circuito neural do reflexo auditivo de sobressalto: Núcleo da raiz coclear**. Mestrado Academic Departament, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu 2015
- BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, p. 303-9, 1997.
- BAULIEU, E. E. et al. Progesterone as a neurosteroid: Actions within the nervous system. **Cell Mol Neurobiol**, v. 16, p. 143-54, 1996.
- BECK, K. D. et al. Estrus cycle stage modifies the presentation of stress-induced startle suppression in female sprague-dawley rats. **Physiol Behav**, v. 93, p. 1019-23, 2008.
- BECKER, J. B. et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. **Endocrinology**, v. 146, p. 1650-73, 2005.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 565-72, 2011.
- BELL, R. L. et al. Amphetamine-modified acoustic startle responding and prepulse inhibition in adult and adolescent alcohol-preferring and -nonpreferring rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, p. 163-71, 2003.
- BLAIR, R. W.; EVANS, A. R. Responses of medullary raphespinal neurons to electrical stimulation of thoracic sympathetic afferents, vagal afferents, and to other sensory inputs in cats. **J Neurophysiol**, v. 66, p. 2084-94, 1991.
- BLASZCZYK, J.; TAJCHERT, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino wistar and hooded rats. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 56, p. 919-25, 1996.
- BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. Cocaine preexposure sensitizes conditioned fear in a potentiated acoustic startle paradigm. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, p. 935-42, 1994.
- BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 234-58, 2001.
- BRAFF, D. L. et al. Female schizophrenia patients have prepulse inhibition deficits. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 817-20, 2005.
- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of lh, fsh, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, p. 1704-8, 1974.
- CAHILL, L. Why sex matters for neuroscience. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 477-84, 2006.
- CHABOT, C. C.; TAYLOR, D. H. Circadian modulation of the rat acoustic startle response. **Behav Neurosci**, v. 106, p. 846-52, 1992.
- CHARITIDI, K.; MELTSE, I.; CANLON, B. Estradiol treatment and hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate the expression of estrogen receptors in the auditory system and the prepulse inhibition of acoustic startle response. **Endocrinology**, v. 153, p. 4412-21, 2012.
- CHARITIDI, K. et al. Functional responses of estrogen receptors in the male and female auditory system. **Hear Res**, v. 252, p. 71-8, 2009.
- CHEN, T. J.; CHEN, S. S.; HSIEH, Y. L. Evaluating the protective role of the olivocochlear bundle against acoustic overexposure in rats by using fos immunohistochemistry. **J Neurol Sci**, v. 177, p. 104-13, 2000.
- CONDE, G. L.; BICKNELL, R. J.; HERBISON, A. E. Changing patterns of fos expression in brainstem catecholaminergic neurons during the rat oestrous cycle. **Brain Res**, v. 672, p. 68-76, 1995.
- DA SILVA, A. V. **Origem de aferências monoaminérgicas e cart-érgicas ao circui-to elementar do reflexo auditivo de sobressalto**. Doutorado Academic Departament, UNESP, Botucatu 2015
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **Am Psychol**, v. 61, p. 741-56, 2006.

- DAVIS, M. et al. A primary acoustic startle circuit: Lesion and stimulation studies. **J Neurosci**, v. 2, p. 791-805, 1982.
- DAVIS, M.; GENDELMAN, P. M. Plasticity of the acoustic startle response in the acutely decerebrate rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 91, p. 549-63, 1977.
- DRAGUNOW, M.; DE CASTRO, D.; FAULL, R. L. Induction of fos in glia-like cells after focal brain injury but not during wallerian degeneration. **Brain Res**, v. 527, p. 41-54, 1990.
- EGER, E. I., 2ND Isoflurane: A review. **Anesthesiology**, v. 55, p. 559-76, 1981.
- EVERETT, J. W. Neurobiology of reproduction in the female rat. A fifty-year perspective. **Monogr Endocrinol**, v. 32, p. 1-133, 1989.
- FACCIO, L. et al. Serum levels of lh, fsh, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by trypanosoma evansi. **Exp Parasitol**, v. 135, p. 110-5, 2013.
- FARADAY, M. M.; GRUNBERG, N. E. The importance of acclimation in acoustic startle amplitude and pre-pulse inhibition testing of male and female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 66, p. 375-81, 2000.
- FARADAY, M. M.; O'DONOGHUE, V. A.; GRUNBERG, N. E. Effects of nicotine and stress on startle amplitude and sensory gating depend on rat strain and sex. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 62, p. 273-84, 1999.
- FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 216-24, 2001.
- FOX, J. E. Habituation and prestimulus inhibition of the auditory startle reflex in decerebrate rats. **Physiol Behav**, v. 23, p. 291-7, 1979.
- FRIAUF, E. C-fos immunocytochemical evidence for acoustic pathway mapping in rats. **Behav Brain Res**, v. 66, p. 217-24, 1995.
- GALLAGER, D. W.; PERT, A. Afferents to brain stem nuclei (brain stem raphe, nucleus reticularis pontis caudalis and nucleus gigantocellularis) in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. **Brain Res**, v. 144, p. 257-75, 1978.
- GEYER, M. A. et al. Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia. **Brain Res Bull**, v. 25, p. 485-98, 1990.
- GLOVER, E. M. et al. Inhibition of fear is differentially associated with cycling estrogen levels in women. **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, p. 341-8, 2013.
- GOMEZ-NIETO, R.; RUBIO, M. E.; LOPEZ, D. E. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. **J Comp Neurol**, v. 506, p. 452-68, 2008.
- GOMEZ-NIETO, R. et al. A fast cholinergic modulation of the primary acoustic startle circuit in rats. **Brain Struct Funct**, v. p. 2013.
- GONZALEZ-LIMA, F.; FINKENSTADT, T.; EWERT, J. P. Neural substrates for long-term habituation of the acoustic startle reflex in rats: A 2-deoxyglucose study. **Neurosci Lett**, v. 96, p. 151-6, 1989.
- GRILLON, C. et al. Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. **Psychiatry Res**, v. 64, p. 169-78, 1996.
- GRILLON, C.; SINHA, R.; O'MALLEY, S. S. Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 114, p. 167-71, 1994.
- GRILLON, C. et al. Families at high and low risk for depression: A three-generation startle study. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 953-60, 2005.
- GULINELLO, M.; ORMAN, R.; SMITH, S. S. Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the alpha4 subunit of the gabaa receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. **Eur J Neurosci**, v. 17, p. 641-8, 2003.
- HAFNER, H. et al. Generating and testing a causal explanation of the gender difference in age at first onset of schizophrenia. **Psychol Med**, v. 23, p. 925-40, 1993.
- HOFFMAN, G. E. et al. C-fos and fos-related antigens as markers for neuronal activity: Perspectives from neuroendocrine systems. In: GRZANNA, R.; BROWN, R. M.; NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Activation of immediate early genes by drugs of abuse**. Rockville, MD (5600 Fishers Lane, Rockville 20857): U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute on Drug Abuse, 1993a. iv, 219 p.
- HOFFMAN, G. E. et al. C-fos and fos-related antigens as markers for neuronal activity: Perspectives from neuroendocrine systems. **NIDA Res Monogr**, v. 125, p. 117-33, 1993b.
- HOFFMAN, G. E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: Are we all 'fos-ed out'? **J Neuroendocrinol**, v. 14, p. 259-68, 2002.
- HOFFMAN, H. S.; FLESHLER, M. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. **Science**, v. 141, p. 928-30, 1963.
- HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Rev**, v. 87, p. 175-89, 1980.
- HORMIGO, S. et al. The noradrenergic projection from the locus coeruleus to the cochlear root neurons in rats. **Brain Struct Funct**, v. 220, p. 1477-96, 2015.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 816-21, 1981.
- HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (dab) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 1079-82, 1982.
- INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.). COMMITTEE ON UNDERSTANDING THE BIOLOGY OF SEX AND GENDER DIFFERENCES **Exploring the biological contributions to human health : Does sex matter?** Washington, D.C.: National Academy Press, 2001.
- ISON, J. R.; MCADAM, D. W.; HAMMOND, G. R. Latency and amplitude changes in the acoustic startle reflex of the rat produced by variation in auditory prestimulation. **Physiol Behav**, v. 10, p. 1035-9, 1973.

- JENNES, L. et al. C-fos expression in noradrenergic α_2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. **Brain Res**, v. 586, p. 171-5, 1992.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: 2007.
- JOVANOVIC, T. et al. Menstrual cycle phase effects on prepulse inhibition of acoustic startle. **Psychophysiology**, v. 41, p. 401-6, 2004.
- KASK, K. et al. Lower levels of prepulse inhibition of startle response in pregnant women compared to postpartum women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 100-7, 2008.
- KAVIANI, H. et al. Affective modulation of the startle response in depression: Influence of the severity of depression, anhedonia, and anxiety. **J Affect Disord**, v. 83, p. 21-31, 2004.
- KINKEAD, B. et al. Endogenous neurotensin is involved in estrous cycle related alterations in prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 178-87, 2008.
- KOCH, M. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. **Physiol Behav**, v. 64, p. 625-8, 1998.
- KOCH, M. The neurobiology of startle. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 107-28, 1999.
- KOCH, M.; KUNDEL, M.; HERBERT, H. Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. **Exp Brain Res**, v. 97, p. 71-82, 1993.
- KOPP-SCHEINPFLUG, C. et al. The medial nucleus of the trapezoid body: Comparative physiology. **Neuroscience**, v. 154, p. 160-70, 2008.
- KORTE, S. M. et al. Mesencephalic cuneiform nucleus and its ascending and descending projections serve stress-related cardiovascular responses in the rat. **J Auton Nerv Syst**, v. 41, p. 157-76, 1992.
- KOVACS, K. J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. **J Neuroendocrinol**, v. 20, p. 665-72, 2008.
- KRUKOFF, T. L. Expression of c-fos in studies of central autonomic and sensory systems. **Mol Neurobiol**, v. 7, p. 247-63, 1993.
- LABOUESSE, M. A.; LANGHANS, W.; MEYER, U. Effects of selective estrogen receptor alpha and beta modulators on prepulse inhibition in male mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. p. 2015.
- LEATON, R. N.; CASSELLA, J. V.; BORSZCZ, G. S. Short-term and long-term habituation of the acoustic startle response in chronic decerebrate rats. **Behav Neurosci**, v. 99, p. 901-12, 1985.
- LEE, Y. et al. A primary acoustic startle pathway: Obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. **J Neurosci**, v. 16, p. 3775-89, 1996.
- LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; FELDON, J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in wistar rats. **Behav Brain Res**, v. 104, p. 113-7, 1999.
- LEITNER, D. S. et al. Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle. **Physiol Behav**, v. 26, p. 259-68, 1981.
- LI, L. et al. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: Prepulse intensity functions. **Physiol Behav**, v. 65, p. 133-9, 1998.
- LINGENHOHL, K.; FRIAUF, E. Giant neurons in the rat reticular formation: A sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? **J Neurosci**, v. 14, p. 1176-94, 1994.
- LOEWY, A. D.; WALLACH, J. H.; MCKELLAR, S. Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. **Brain Res**, v. 228, p. 63-80, 1981.
- LUDEWIG, S. et al. Prepulse inhibition deficits in patients with panic disorder. **Depress Anxiety**, v. 15, p. 55-60, 2002.
- MACLAREN, D. A.; MARKOVIC, T.; CLARK, S. D. Assessment of sensorimotor gating following selective lesions of cholinergic pedunculopontine neurons. **Eur J Neurosci**, v. 40, p. 3526-37, 2014.
- MANSBACH, R. S.; GOLD, L. H.; HARRIS, L. S. The acoustic startle response as a measure of behavioral dependence in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 108, p. 40-6, 1992.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, p. 609-14, 2002.
- MARTINS, M. G. **Estudo hodológico e neuroquímico das aferências da região noradrenérgica a5 aos neurônios da raiz coclear**. (Trabalho de Conclusão de Curso) Academic Department, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2013
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: Uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.
- MUELLER, S. C.; GRISSOM, E. M.; DOHANICH, G. P. Assessing gonadal hormone contributions to affective psychopathologies across humans and animal models. **Psychoneuroendocrinology**, v. 46, p. 114-28, 2014.
- NAKAMURA, M. et al. Electrical stimulation of the cochlear nerve in rats: Analysis of c-fos expression in auditory brainstem nuclei. **Brain Res**, v. 1031, p. 39-55, 2005.
- ORNITZ, E. M.; GUTHRIE, D. Long-term habituation and sensitization of the acoustic startle response in the normal adult human. **Psychophysiology**, v. 26, p. 166-73, 1989.
- PALENICEK, T. et al. Sex differences in the effects of n,n-diethyllysergamide (Lsd) on behavioural activity and prepulse inhibition. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, p. 588-96, 2010.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press, 2005.
- PERRIOL, M. P. et al. Disturbance of sensory filtering in dementia with lewy bodies: Comparison with parkinson's disease dementia and alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, p. 106-8, 2005.
- PILZ, P. K.; SCHNITZLER, H. U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: Amplitude, threshold, and latency measures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 66, p. 67-79, 1996.

- PILZ, P. K.; SCHNITZLER, H. U.; MENNE, D. Acoustic startle threshold of the albino rat (*rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 101, p. 67-72, 1987.
- PLAPPERT, C. F.; RODENBUCHER, A. M.; PILZ, P. K. Effects of sex and estrous cycle on modulation of the acoustic startle response in mice. **Physiol Behav**, v. 84, p. 585-94, 2005.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, p. 775-7, 2005.
- RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, p. 135-8, 2009.
- RIECHER-ROSSLER, A. et al. Can estradiol modulate schizophrenic symptomatology? **Schizophr Bull**, v. 20, p. 203-14, 1994.
- ROHLEDER, C. et al. Neural correlates of sensorimotor gating: A metabolic positron emission tomography study in awake rats. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 178, 2014.
- RUPPRECHT, R. et al. Assessment of neuroleptic-like properties of progesterone. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 143, p. 29-38, 1999.
- SAITOH, K. et al. Possible role of the brainstem in the mediation of prepulse inhibition in the rat. **Neurosci Lett**, v. 75, p. 216-22, 1987.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.
- SEEMAN, M. V. Psychopathology in women and men: Focus on female hormones. **Am J Psychiatry**, v. 154, p. 1641-7, 1997.
- SIMPSON, J.; KELLY, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behav Brain Res**, v. 229, p. 289-300, 2012.
- SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, p. 219-26, 1975.
- SPARY, E. J.; MAQBOOL, A.; BATTEN, T. F. Changes in oestrogen receptor alpha expression in the nucleus of the solitary tract of the rat over the oestrous cycle and following ovariectomy. **J Neuroendocrinol**, v. 22, p. 492-502, 2010.
- STENBERG, A. E. et al. Mapping of estrogen receptors alpha and beta in the inner ear of mouse and rat. **Hear Res**, v. 136, p. 29-34, 1999.
- SWERDLOW, N. R. et al. Men are more inhibited than women by weak prepulses. **Biol Psychiatry**, v. 34, p. 253-60, 1993.
- SWERDLOW, N. R.; BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Animal models of deficient sensorimotor gating: What we know, what we think we know, and what we hope to know soon. **Behav Pharmacol**, v. 11, p. 185-204, 2000.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, p. 741-4, 1993a.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Prepulse inhibition of acoustic startle in rats after lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. **Behav Neurosci**, v. 107, p. 104-17, 1993b.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A.; BRAFF, D. L. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: Current knowledge and future challenges. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 156, p. 194-215, 2001.
- SWERDLOW, N. R.; HARTMAN, P. L.; AUERBACH, P. P. Changes in sensorimotor inhibition across the menstrual cycle: Implications for neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry**, v. 41, p. 452-60, 1997.
- SWERDLOW, N. R. et al. Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 58, p. 192-200, 1995.
- TAKAHASHI, K. et al. Neural circuits containing pallidotegmental gabaergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. **Biol Psychiatry**, v. 62, p. 148-57, 2007.
- TAVES, M. D. et al. Measurement of steroid concentrations in brain tissue: Methodological considerations. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 2, p. 39, 2013.
- TURVIN, J. C.; MESSER, W. S., JR.; KRITZER, M. F. On again, off again effects of gonadectomy on the acoustic startle reflex in adult male rats. **Physiol Behav**, v. 90, p. 473-82, 2007.
- VAILLANCOURT, C. et al. Effects of ovariectomy and estradiol on acoustic startle responses in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 103-9, 2002.
- VALSAMIS, B.; SCHMID, S. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. **J Vis Exp**, v. 55, p. e3446, 2011.
- VAN DEN BUUSE, M.; EIKELIS, N. Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 425, p. 33-41, 2001.
- WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. **Toxicol Pathol**, v. 36, p. 375-84, 2008.
- WILKINS, D. E.; HALLETT, M.; WESS, M. M. Audiogenic startle reflex of man and its relationship to startle syndromes. A review. **Brain**, v. 109 (Pt 3), p. 561-73, 1986.
- WINSLOW, J. T.; NOBLE, P. L.; DAVIS, M. Modulation of fear-potentiated startle and vocalizations in juvenile rhesus monkeys by morphine, diazepam, and buspirone. **Biol Psychiatry**, v. 61, p. 389-95, 2007.
- YEOMANS, J. S.; FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: Neurons and connections. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, p. 301-14, 1995.
- YEOMANS, J. S. et al. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. **Neuroscience**, v. 142, p. 921-9, 2006.

ZHANG, J. S. et al. Electrically induced fos-like immunoreactivity in the auditory pathway of the rat: Effects of survival time, duration, and intensity of stimulation. **Brain Res Bull**, v. 39, p. 75-82, 1996.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE LAVADOS VAGINAIS

PROTOCOLO COLETA, FIXAÇÃO, COLORAÇÃO E MONTAGEM DE ESFREGAÇOS VAGINAIS

Versão 15/03/2013

1. Coleta

Material necessário: solução fisiológica NaCl (0,9%), ponteira de 200µl, lâminas histológicas com pocinhos, água destilada, borracha para sucção.

- Identificar as lâminas histológicas com a data da coleta e o número dos animais. Anotar qual animal corresponde a cada um dos pocinhos.
- Segurar o animal firmemente, como no procedimento de injeção intraperitoneal, expondo-se a vagina mais facilmente. De preferência, sempre fazer a coleta em duas pessoas.
- Completar a ponteira com soro fisiológico.
- Na entrada da vagina, com muito cuidado, liberar e sugar o soro fisiológico cerca de três vezes para obter o lavado vaginal com as células descamadas.
- Colocar o líquido obtido no pocinho correspondente ao animal.
- Sempre descartar a ponteira entre uma coleta e outra.

2. Fixação, coloração e montagem

- Deixar o material em estufa desligada durante 12h para secagem.
- Fixar com passagem em álcool absoluto. Deixar secar por mais 12h em estufa desligada.
- Após esse período, é possível se iniciar a coloração.
 - 30s em álcool 100% I
 - 30s em álcool 95%
 - 30s em álcool 70%
 - 30s em água destilada
 - 2min em hematoxilina filtrada (*Hematoxilina de Harris, CAS 517-28-2*)
 - 2 lavagens de 30s/cada em água destilada
 - 5 lavagens em água corrente
 - 30s em álcool 70%
 - 30s em álcool 95%
 - 30s em álcool 100% I
 - 1min em Orange-G (*Orange-G, Sigma #O-1625*)
 - 30s em álcool 100% I
 - 30s em álcool 100% II
 - 2min em eosina (*Eosina amarela 0,25%, CAS 17372-87-1*)
 - 30s em álcool 100% I
 - 30s em álcool 100% II
 - 1min em xilol I
 - 1 min em xilol II
- Montagem: adicionar um fio de Permount junto à borda inferior da lamínula e deitar a lâmina sobre ela com cuidado, a fim de expulsar todo o ar e evitar a formação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura. Deixar as lâminas secando e, posteriormente, limpar o excesso de cola com um pano umedecido com xilol.

Preparo Orange-G

Álcool 99,5%	800ml
Orange-G	5g
Ácido fosfotúngico(<i>Sigma #P-4006</i>)	0,16g
H ₂ O destilada	200ml

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE MENSURAÇÃO DO ASR E PPI

PROTOCOLO PARA MENSURAÇÃO DO REFLEXO ACÚSTICO DE SOBRESSALTO

Versão 08/04/2013

1. Iniciar o sistema

- Ligar o computador e a caixa de sobressalto.
- Verificar se a régua de força está ligada.
- Verificar se o plug USB está conectado.

2. Iniciar a rotina

- Colocar as duas câmeras de vídeo no *desktop*.
- Abrir o programa “Sobressalto”, na Área de Trabalho.
- Ir em Editar > Procedimento.
- Abrir “Arquivo de procedimento existente” ou buscá-lo em histórico.
- Localizar o arquivo da sessão de interesse e abri-lo.
- Durante a calibração, não mudar os parâmetros e clicar em avançar.
- Ao final da calibração, clicar em salvar.
- Será aberta a janela de identificação do experimento. Nessa janela, anotar os dados para cada balança individualmente. Obs: não esquecer de anotar o número ID da sessão.
- Clicar em salvar e depois fechar.
- Se for a primeira sessão do dia, conferir a calibração das balanças e verificar se o erro está no máximo em 5%. Caso a calibração for correta ou já tenha sido feita neste dia, clicar em: “Sim, a calibração atual está satisfatória. Executar o próximo passo”.
- Clicar em salvar as configurações de procedimento e confirmar o início do procedimento.
- Clicar em “executar o arquivo de procedimentos agora”.
- Ativar as janelas: respostas de sobressalto e gráficos.
- Clicar em iniciar sessão.
- Salvar os dados da sessão na pasta “Animais” do *desktop*.
- Ao final do procedimento, clicar em “OK” e fechar apenas a janela de monitor de sobressalto.

3. Resumo do procedimento

- Anotar na ficha de experimento número, espécie e peso do animal que será submetido à prova de sobressalto, bem como a data, o número da sessão (ID) e a caixa (01 ou 02) na qual a prova foi realizada.
- Colocar o animal na gaiola cilíndrica (tamanho máximo do animal = 310 g) e fechá-la com dois elásticos para evitar a abertura das portas.
- Posicionar a gaiola na balança, dentro da caixa, e fixar os parafusos (Sempre segurar a balança para que não se faça força na balança, evitando sua descalibração).
- Abrir a sessão desejada.
- Preencher cuidadosamente os dados de cada balança no sistema: pesquisador (responsável pela sessão), título (Prova Basal ou ASR PPIint), sujeito (número do animal NXX/ANO), cobaia (rato) e peso. Obs.: caso alguma das balanças esteja vazia durante uma sessão, escrever, em todos os campos, “vazio”.
- Antes de iniciar a sessão, utilizar o comando “Converter para planilha – Excel” para salvar o protocolo do procedimento em um arquivo Excel.
- Iniciar a sessão.
- Acompanhar resposta do animal através da câmara (acesso por Meu Computador > Câmera 01/02) e dos dados gerados pelo programa.
- Após o término da sessão, retirar o animal da gaiola e limpá-la com água durante as sessões. Ao término das sessões daquele período, lavar a gaiola com água e sabão e higienizar com álcool 90%.

04. Prova Basal

- Período de habituação com ruído de fundo (RF) ligado – 05 minutos
- Bloco 01: estímulo sozinho (treino) – 75 dB – 05 repetições
- Bloco 02: estímulo sozinho – 75 dB
- Bloco 03: estímulo sozinho – 79 dB
- Bloco 04: estímulo sozinho – 84 dB
- Bloco 05: estímulo sozinho – 87 dB

- Bloco 06: estímulo sozinho – 89 dB
- Bloco 07: estímulo sozinho – 91 dB
- Bloco 08: estímulo sozinho – 93 dB
- Bloco 09: estímulo sozinho – 95 dB
- Bloco 10: estímulo sozinho – 97 dB
- Bloco 11: estímulo sozinho – 99 dB
- Bloco 12: estímulo sozinho – 101 dB
- Bloco 13: estímulo sozinho – 103 dB
- Bloco 14: estímulo sozinho – 105 dB
- Bloco 15: estímulo sozinho – 107 dB
- Bloco 16: estímulo sozinho – 109 dB
- Bloco 17: estímulo sozinho – 111 dB
- Bloco 18: estímulo sozinho – 113 dB

05. PREPISI

- Período de habituação com ruído de fundo (RF) ligado – 05 minutos
- Bloco 01: estímulo sozinho (treino) – 113 dB – 05 repetições
- Bloco 02: estímulo sozinho – 113 dB – 12 repetições
- Bloco 03: estímulo + pré-pulso 65 dB – 12 repetições
- Bloco 04: estímulo + pré-pulso 70 dB – 12 repetições
- Bloco 05: estímulo + pré-pulso 75 dB – 12 repetições
- Bloco 06: estímulo sozinho – 05 repetições

06. Criação de relatórios

- Para gerar o relatório de respostas, acessar, no programa, Relatórios > Sequências Respostas.
 - Selecionar o ID da prova de interesse, bem como a balança do animal desejado.
 - Verificar se a caixa “Organizar pesquisa por tentativa” está marcada e clicar em “Pesquisar”.
 - Exportar os dados para o Excel (menu superior à esquerda) e salvar a planilha na pasta da sessão.
- Obs.:* padronizar o nome do arquivo como “ID \underline{X} -NY”.

07. Criação de gráficos

- Para gerar os gráficos das respostas, acessar, no programa, Ferramentas > Exportar Dados.
- Selecionar o tipo de arquivo para “Arquivo de dados”.
- Escolher e abrir a sessão desejada pelo ID e número da balança (descrito no nome de cada arquivo).
- Exportar para planilha Excel (menu superior à esquerda) e salvar na pasta da sessão. *Obs.:* padronizar o nome do arquivo como “ID \underline{X} -NY Gráficos”.

APÊNDICE C – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS FOS-IR

Identificação da imunorreatividade à proteína Fos nos núcleos e áreas do tronco encefálico, em diferentes intervalos de sobrevivência após a sessão de avaliação do ASR/PPI. Após cada intervalo indicado no quadro abaixo foi realizada a eutanásia do animal. Significado dos símbolos: (-) Ausência de imunorreatividade; (+/-) imunorreatividade muito fraca; (+) imunorreatividade fraca; (++) imunorreatividade moderada; (+++) imunorreatividade forte; (++++) imunorreatividade muito forte. Com base nestas observações, foi escolhido o intervalo de sobrevivência de 60 minutos entre o término da prova de avaliação do ASR/PPI e a eutanásia.

Núcleo/Área	<i>Tempo de sobrevivência após prova de ASR PPI</i>					
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
Núcleo do trato espinal do trigêmeo (parte caudal)	+	-	++	++	+	+/-
Núcleo do trato solitário	-	-	+++	+++	+	+/-
Núcleo reticular lateral (parte lateral)	-	-	++	+++	+++	+
Núcleo pálido da rafe	+++	-	++++	+++	+++	+++
Núcleo cuneiforme acessório	-	-	-	+/-	-	-
Núcleo magno da rafe	-	-	-	+	-	-
Núcleo coclear dorsal	+	+	+++	++++	++++	+
Núcleo coclear ventral posterior	-	-	+	++	++	+/-
Neurônio da raiz coclear	-	-	-	-	+	-
Núcleo ventral do corpo trapezoide	+	-	++	++	++	+
Núcleo medial do corpo trapezoide	-	-	+	-	+	-
Núcleo coclear ventral anterior	-	-	-	-	+	-
Núcleo paragigantocelular lateral	-	-	-	-	+	-
Locusceruleus	-	-	-	-	++	-

APÊNDICE D – PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS**PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA ANTI-FOS (Calbichem CAT#PC38)****Versão 27/05/2014**

*****1º Dia*****

Materialnecessário: pincéis, redinhas, becker para descarte de soluções e para dosar tampões, suporte para potinhos, agitador orbital, tampões, inibição de peroxidase, anticorpos (primário e secundário), soluções de bloqueio e reação histoquímica.

****CASO JÁ TENHA SIDO REALIZADO OUTRO PROCEDIMENTO DE IMUNOHISTOQUÍMICA
PASSAR PARA LAVAGEM COM TBS-TX****

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,42 X 10min em agitação.

PB se prepara a partir da soluçãoestoque 0,4M. Diluir 01 parte de PB 0,4M em03 partes de H₂O destilada.

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500).....45,12g

- NaH₂PO₄· H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500)11,04g

- H₂O destilada.....1000ml

Ajustar o pH com solução de HCl a 3M até pH 7,4

*Em 800ml de água, adicionar os sais aos poucos em agitador e então completar até 1000ml.

- Inibição da peroxidase endógena1 X 20min em agitação.

A solução de inibição da peroxidaseendógena se prepara adicionando 09 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3ml por potinho.

Solução para 01 potinho: 300µl de H₂O₂ 33%

2700µl de PB 0,1M pH 7,4

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,45 X 5min em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,603 X 10min em agitação.

TBS-Tx se prepara diluindo 01 parte da soluçãoestoque 10X em09 partes de H₂O destilada

ou:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06g

- NaCl.....8,85g

- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25ml

- H₂O dest.....q.s.p. 1000ml

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

- Bloqueio de marcação inespecífica.....1 X 40min em agitação.

Incubar em solução de soro normal de cabra a 2%, onde foi produzido o anticorpo secundário. Incubar 1ml por potinho. Obs: caso sobre soro normal na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

Solução para 01 potinho: 20µl de soro normal de cabra

980µl de TBS-Tx 0,05M pH 7,60

- Anticorpo primário anti-FOS1/1000048 horas a 4°C em agitação.

Melhor concentração do anticorpo primário: 1/20.000 em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1ml por potinho. Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

Solução para 01 potinho: 5µl de anti-FOS a 1/100

995µl de TBS-Tx 0,05M pH 7,60

*****2º Dia*****

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10min em agitação.

- Anticorpo secundário goatanti-rabbit1/200120min temp. ambiente em agitação.

Preparar a solução do anticorpo secundário, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar 1ml por potinho. Obs: pode ficar uma noite a 4°C em agitação.

Solução para 01 potinho: 5µl de anticorpo anti-rabbit (feito em cabra) puro

995µl de TBS-Tx 0,05M pH 7,60

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10min em agitação.

Obs: caso seja utilizado anticorpo secundário fluorescente passe para a montagem das lâminas, caso seja utilizado anticorpo secundário biotinilado siga para o passo seguinte.

- Incubação em ABC 1/200 (Vectastain Standart Kit PK4000) . 120min a temp. amb. em agitação.

Preparar a solução, agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado. Incubar 1ml por potinho.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

Solução para 01 potinho: 5µl de solução A

5µl de solução B

990µl de TBS-Tx 0,05M pH 7,60

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....2 X 10min em agitação.

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,63 X 10min em agitação.

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06g

- H₂O dest.q.s.p. 1000ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

- Revelação com DAB + Níquelem baixa agitação e controle visual em microscópio.

Preparar as soluções imediatamente antes de usar e protege-las da luz, pois o DAB é fotossensível. Sempre usar luvas de nitrila e realizar o procedimento em capela, pois o DAB é carcinogênico.

Obs.: Deixar um pouco em geladeira para baixar a temperatura, assim tendo um maior controle sobre a reação. Tudo que entrar em contato com DAB, deve ser deixado na capela em um becker com 50ml de hipoclorido de sódio comercial, para precipitação do DAB. Eliminar a solução no dia seguinte em local adequado (frasco de coleta de resíduos azul).

Solução para 01 potinho: 40µl de solução de DAB a 1% em H₂O destilada (Sigma D-9015 PM 360,1)

0,01g de níquel

2500µl de Tris-HCl 0,05M pH 7,6

0,5µl de H₂O₂ P.A. a 30% imediatamente antes de incubar

- *Tempo de revelação com DAB: 10 minutos.*

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10min em agitação.

APÊNDICE E – PROTOCOLO DE CONTAGEM DE NEURÔNIOS FOS-IR

PROTOCOLO DE MENSURAÇÃO DA ÁREA E CONTAGEM DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA A PROTEÍNA FOS

CAPTURA DE IMAGENS EM MICROSCÓPIO DE LUZ

Calibração do microscópio:

- Posicionar a objetiva de 10X para análise das imagens (não utilizar a lente condensador)
- Executar o *khöller* (centralização de luz) e a função *shading correction* (uniformidade da luz) sem a presença de lâmina com material
- Observar no próprio microscópio a intensidade de luz que julgar adequada para observar o material
- Passar a aquisição da imagem para o computador e clicar em *measure* para medir a intensidade luminosa (deve estar com o valor de aproximadamente 1ms)
- Verificar se a resolução da imagem está ajustada para 1388X1040
- Ajustar foco e luz, sendo que todas as curvas do espectro de cor devem estar pareadas e cobrindo todo o espectro
- Capturar todas as fotos da área desejada tomando-se o cuidado de deixar uma margem de segurança de sobreposição entre uma imagem e outra para permitir a posterior construção do mosaico

PREPARO DAS IMAGENS NO ADOBE PHOTOSHOP

Para realizar o *photomerge* das imagens (mosaico) e configurar uma imagem panorâmica:

Arquivo > Automatizar > Photomerge > Selecionar as fotos > OK

Salvar as imagens descartando-se as camadas (tamanho do arquivo reduzido)

MENSURAÇÃO E CONTAGEM DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS

Abrir o programa *ImageJ* (versão 1.48)

File > Open > Abrir a imagem da barra de calibração capturada com a objetiva de 10X

- Clicar na ferramenta indicada por uma barra (*straight*) e fazer uma linha reta de um tamanho determinado utilizando as barras da régua de calibração
- Manter a tecla *shift* pressionada para a barra ficara em linha reta

Analyse > Set scale

- Em *known distance*, colocar o valor que foi determinado na barra de calibração
- Em *unit of length*, micrômetros
- Selecionar a caixa correspondente a *Global* (para que todas as futuras mensurações mantenham a calibração realizada) > OK

Para iniciar a mensuração da área:

File > Open > Abrir a imagem para análise

- Desativar opção *Disable Global Calibration* para cada nova imagem aberta
 - Em Analyze > Set measurements, selecionar as seguintes opções: *Area*, *Perimeter* e *Display Label*
 - Selecionar a ferramenta representada por um polígono (*polygonal selections*) e contornar a área de interesse da imagem > Ctrl+M
 - A caixa *Results* abrirá com os resultados da imagem. É possível medir a área de várias imagens em sequência e depois salvar o arquivo com todos os dados

Para iniciar a contagem de células:

Plugins > Analyze > Cell conter

- Na nova janela, selecionar a cor com a qual se deseja marcar as células.
- Para iniciar a contagem, basta clicar em cada célula desejada. Esse *plugin* possui quatro opções de cores (vermelho, verde, azul e amarelo).
- Após a contagem de todas as células da imagem, clicar em *Results* para o total de células marcadas com cada cor

APÊNDICE F – ESTATÍSTICA DESCRITIVA

F1 – Estatística descritiva do peso dos órgãos genitais internos das fêmeas (Figura 7)

	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Number of values	3	3	3	3
Mean	1,524	0,7073	0,7040	0,4643
Std. Deviation	0,2308	0,06536	0,08431	0,1739
Std. Error	0,1333	0,03774	0,04868	0,1004

F2– Estatística descritiva dos níveis plasmáticos de estradiol (Figura 9)

	<i>Grupos experimentais</i>						
	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	7	5	6	4	7	5	8
25% Percentile	12,59	17,63	14,74	11,58	9,946	19,55	23,21
Median	13,38	20,14	26,62	16,86	19,24	23,82	31,93
75% Percentile	37,80	31,21	51,66	27,46	19,86	43,66	59,44

F3– Estatística descritiva dos níveis plasmáticos de progesterona (Figura 10)

	<i>Grupos experimentais</i>						
	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	5	3	4	4	5	5	5
Mean	49,31	31,62	46,88	56,21	40,88	71,41	64,55
Std. Deviation	7,527	6,082	13,80	16,31	11,40	16,72	27,66
Std. Error	3,366	3,512	6,900	8,155	5,099	7,476	12,37

F4 – Estatística descritiva do peso corporal dos grupos experimentais (Figura 11)

	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
Mean	399,4	217,1	222,8	226,1	216,2	218,1	216,9	227,3
Std. Deviation	25,27	13,17	14,11	17,47	10,03	14,73	24,71	14,42
Std. Error	7,991	3,803	4,073	4,118	4,094	4,912	8,235	2,944

F5 – Estatística descritiva da habituação dos machos (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	10	10	10
Mean	3,743	3,473	3,108
Std. Deviation	1,064	1,148	1,263
Std. Error	0,3365	0,3632	0,3993

F6 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em proestro (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	12	12	12
25% Percentile	2,822	3,032	1,823
Median	4,203	3,709	3,461
75% Percentile	5,586	4,007	5,032

F7 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em proestro-estro (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	12	12	12
Mean	3,575	3,111	2,731
Std. Deviation	1,885	1,640	1,846
Std. Error	0,5442	0,4734	0,5330

F8 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em estro (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	18	18	18
Mean	3,932	3,502	3,259
Std. Deviation	1,892	1,714	1,931
Std. Error	0,4460	0,4039	0,4550

F9 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em estro-metaestro (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	6	6	6
Mean	4,645	4,039	4,078
Std. Deviation	2,473	2,009	2,218
Std. Error	1,010	0,8203	0,9056

F10 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em metaestro (Figura 12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	9	9	9
Mean	3,726	3,519	3,167
Std. Deviation	1,795	1,684	1,956
Std. Error	0,5984	0,5612	0,6521

F11 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em metaestro-diestro (Figura12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	9	9	9
Mean	4,214	3,909	3,312
Std. Deviation	2,082	1,749	1,716
Std. Error	0,6941	0,5830	0,5720

F12 – Estatística descritiva da habituação das fêmeas em diestro (Figura12)

	<i>Tentativas</i>		
	1^a-5^a	6^a-53^a	54^a-58^a
Number of values	24	24	24
Mean	2,749	2,878	2,454
Std. Deviation	1,596	1,557	1,498
Std. Error	0,3257	0,3179	0,3058

F13– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em machos

Primeiras tentativas (N1) X	<i>Média ± SD</i>		Valor p	
	Últimas tentativas (N2)	N1		N2
2 x 21		3,94 ± 0,89	3,44 ± 1,12	0,042
3 x 20		3,75 ± 1,10	3,40 ± 1,16	0,015
4 x 19		3,74 ± 1,05	3,40 ± 1,13	0,056
5 x 18		3,72 ± 1,09	3,39 ± 1,16	0,105
6 x 17		3,68 ± 1,10	3,37 ± 1,17	0,176
7 x 16		3,71 ± 1,08	3,36 ± 1,19	0,142
8 x 15		3,72 ± 1,04	3,33 ± 1,20	0,066
9 x 14		3,73 ± 1,05	3,29 ± 1,21	0,026
10 x 13		3,70 ± 1,06	3,26 ± 1,21	0,017
11 x 12		3,72 ± 1,06	3,24 ± 1,22	0,007
12 x 11		3,68 ± 1,03	3,18 ± 1,21	0,001
13 x 10		3,62 ± 1,03	3,17 ± 1,23	0,003
14 x 9		3,58 ± 1,06	3,21 ± 1,28	0,018
15 x 8		3,58 ± 1,07	3,22 ± 1,26	0,033
16 x 7		3,58 ± 1,08	3,17 ± 1,31	0,035
17 x 6		3,55 ± 1,09	3,11 ± 1,27	0,007
18 x 5		3,52 ± 1,10	3,11 ± 1,26	0,015
19 x 4		3,50 ± 1,11	3,12 ± 1,27	0,029
20 x 3		3,45 ± 1,13	3,15 ± 1,25	0,089
21 x 2		3,44 ± 1,13	3,44 ± 1,24	0,984

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
17 x 2	3,37 ± 1,17	3,44 ± 1,24	0,716
16 x 3	3,38 ± 1,17	3,15 ± 1,25	0,128
15 x 4	3,43 ± 1,15	3,12 ± 1,27	0,040
14 x 5	3,46 ± 1,14	3,11 ± 1,26	0,018
13 x 6	3,49 ± 1,13	3,11 ± 1,27	0,005
12 x 7	3,53 ± 1,11	3,17 ± 1,31	0,033
11 x 8	3,52 ± 1,10	3,22 ± 1,26	0,041
10 x 9	3,52 ± 1,09	3,21 ± 1,28	0,022
9 x 10	3,56 ± 1,06	3,17 ± 1,23	0,004
8 x 11	3,65 ± 1,08	3,18 ± 1,21	0,001
7 x 12	3,70 ± 1,10	3,24 ± 1,22	0,002
6 x 13	3,68 ± 1,09	3,26 ± 1,21	0,010
5 x 14	3,71 ± 1,08	3,29 ± 1,21	0,017
4 x 15	3,71 ± 1,07	3,33 ± 1,20	0,075
3 x 16	3,67 ± 1,17	3,36 ± 1,19	0,260
2 x 17	3,55 ± 1,28	3,37 ± 1,17	0,547

F14– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em proestro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	4,01 ± 1,83	3,45 ± 1,47	0,131
3 x 20	4,11 ± 1,88	3,42 ± 1,45	0,065
4 x 19	4,09 ± 1,93	3,37 ± 1,45	0,080
5 x 18	4,11 ± 2,02	3,33 ± 1,44	0,089
6 x 17	4,14 ± 2,00	3,28 ± 1,44	0,076
7 x 16	4,04 ± 1,90	3,22 ± 1,44	0,077
8 x 15	4,00 ± 1,86	3,21 ± 1,45	0,066
9 x 14	3,94 ± 1,84	3,17 ± 1,43	0,077
10 x 13	3,88 ± 1,78	3,14 ± 1,45	0,082
11 x 12	3,78 ± 1,69	3,13 ± 1,43	0,089
12 x 11	3,74 ± 1,66	3,16 ± 1,45	0,108
13 x 10	3,69 ± 1,62	3,15 ± 1,44	0,123
14 x 9	3,70 ± 1,57	3,15 ± 1,48	0,088
15 x 8	3,62 ± 1,51	3,07 ± 1,41	0,058
16 x 7	3,60 ± 1,46	3,14 ± 1,59	0,145
17 x 6	3,54 ± 1,44	3,13 ± 1,67	0,196
18 x 5	3,51 ± 1,43	3,25 ± 1,81	0,435
19 x 4	3,51 ± 1,43	3,30 ± 1,86	0,508
20 x 3	3,51 ± 1,43	3,23 ± 1,83	0,335
21 x 2	3,47 ± 1,44	3,12 ± 1,78	0,161

F15– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em proestro-estro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	3,71 ± 2,17	3,12 ± 1,66	0,036
3 x 20	3,87 ± 2,03	3,08 ± 1,65	0,010
4 x 19	3,68 ± 2,03	3,03 ± 1,66	0,054
5 x 18	3,59 ± 1,89	3,02 ± 1,67	0,059
6 x 17	3,58 ± 1,88	3,01 ± 1,68	0,047
7 x 16	3,43 ± 1,79	2,97 ± 1,67	0,079
8 x 15	3,40 ± 1,77	3,00 ± 1,69	0,089
9 x 14	3,41 ± 1,69	2,99 ± 1,69	0,033
10 x 13	3,40 ± 1,69	2,95 ± 1,71	0,013
11 x 12	3,29 ± 1,60	2,93 ± 1,73	0,027
12 x 11	3,34 ± 1,66	2,99 ± 1,79	0,014
13 x 10	3,37 ± 1,70	2,91 ± 1,73	0,004
14 x 9	3,35 ± 1,71	2,80 ± 1,71	0,005
15 x 8	3,31 ± 1,71	2,78 ± 1,69	0,010
16 x 7	3,31 ± 1,68	2,77 ± 1,72	0,026
17 x 6	3,27 ± 1,68	2,70 ± 1,84	0,040
18 x 5	3,25 ± 1,67	2,70 ± 1,88	0,056
19 x 4	3,20 ± 1,66	2,64 ± 1,95	0,050
20 x 3	3,17 ± 1,68	2,76 ± 1,96	0,084
21 x 2	3,18 ± 1,69	2,81 ± 1,94	0,212

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
17 x 2	3,06 ± 1,67	2,81 ± 1,94	0,318
16 x 3	3,05 ± 1,66	2,76 ± 1,96	0,148
15 x 4	3,07 ± 1,62	2,64 ± 1,95	0,071
14 x 5	3,13 ± 1,62	2,70 ± 1,88	0,079
13 x 6	3,14 ± 1,63	2,70 ± 1,84	0,065
12 x 7	3,18 ± 1,64	2,77 ± 1,72	0,051
11 x 8	3,18 ± 1,68	2,78 ± 1,69	0,022
10 x 9	3,21 ± 1,68	2,80 ± 1,71	0,010
9 x 10	3,24 ± 1,67	2,91 ± 1,73	0,015
8 x 11	3,17 ± 1,61	2,99 ± 1,79	0,163
7 x 12	3,07 ± 1,50	2,93 ± 1,73	0,334
6 x 13	3,21 ± 1,61	2,95 ± 1,71	0,102
5 x 14	3,20 ± 1,65	2,99 ± 1,69	0,275
4 x 15	3,13 ± 1,71	3,00 ± 1,69	0,538
3 x 16	3,11 ± 1,68	2,97 ± 1,67	0,544
2 x 17	3,40 ± 1,86	3,01 ± 1,68	0,170

F16– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em estro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	3,86 ± 2,22	3,53 ± 1,67	0,361
3 x 20	3,75 ± 1,89	3,50 ± 1,66	0,362
4 x 19	3,81 ± 1,86	3,50 ± 1,67	0,271
5 x 18	3,93 ± 1,89	3,47 ± 1,69	0,120
6 x 17	3,91 ± 1,86	3,42 ± 1,69	0,097
7 x 16	3,86 ± 1,78	3,39 ± 1,71	0,101
8 x 15	3,86 ± 1,72	3,38 ± 1,74	0,058
9 x 14	3,75 ± 1,72	3,35 ± 1,73	0,088
10 x 13	3,67 ± 1,69	3,38 ± 1,74	0,221
11 x 12	3,68 ± 1,72	3,42 ± 1,77	0,264
12 x 11	3,71 ± 1,73	3,39 ± 1,75	0,186
13 x 10	3,68 ± 1,70	3,32 ± 1,75	0,152
14 x 9	3,66 ± 1,69	3,33 ± 1,77	0,131
15 x 8	3,69 ± 1,68	3,30 ± 1,75	0,062
16 x 7	3,65 ± 1,67	3,19 ± 1,78	0,058
17 x 6	3,62 ± 1,68	3,23 ± 1,91	0,165
18 x 5	3,60 ± 1,66	3,25 ± 1,92	0,209
19 x 4	3,59 ± 1,66	3,24 ± 1,88	0,138
20 x 3	3,54 ± 1,63	3,20 ± 1,89	0,151
21 x 2	3,54 ± 1,65	3,45 ± 2,28	0,766

F17– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em estro-metaestro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	5,10 ± 2,82	4,14 ± 2,11	0,169
3 x 20	4,99 ± 2,71	4,09 ± 2,09	0,148
4 x 19	4,87 ± 2,48	4,05 ± 2,07	0,107
5 x 18	4,67 ± 2,44	4,03 ± 2,07	0,188
6 x 17	4,52 ± 2,40	4,04 ± 2,08	0,335
7 x 16	4,32 ± 2,33	4,05 ± 2,09	0,578
8 x 15	4,14 ± 2,28	4,12 ± 2,11	0,962
9 x 14	4,19 ± 2,30	4,20 ± 2,17	0,979
10 x 13	4,15 ± 2,25	4,17 ± 2,14	0,967
11 x 12	4,05 ± 2,21	4,20 ± 2,18	0,777
12 x 11	4,07 ± 2,19	4,31 ± 2,21	0,631
13 x 10	4,06 ± 2,06	4,31 ± 2,16	0,474
14 x 9	4,07 ± 2,06	4,36 ± 2,24	0,271
15 x 8	4,10 ± 2,12	4,37 ± 2,26	0,257
16 x 7	4,15 ± 2,10	4,36 ± 2,17	0,456
17 x 6	4,22 ± 2,13	4,26 ± 2,28	0,914
18 x 5	4,20 ± 2,10	4,05 ± 2,24	0,718
19 x 4	4,18 ± 2,09	4,11 ± 2,42	0,885
20 x 3	4,19 ± 2,09	4,18 ± 2,49	0,993
21 x 2	4,20 ± 2,12	4,11 ± 2,59	0,854

F18– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em metaestro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	3,64 ± 2,15	3,47 ± 1,73	0,674
3 x 20	3,61 ± 1,68	3,44 ± 1,73	0,552
4 x 19	3,67 ± 1,70	3,44 ± 1,77	0,397
5 x 18	3,71 ± 1,80	3,41 ± 1,78	0,214
6 x 17	3,71 ± 1,75	3,39 ± 1,74	0,117
7 x 16	3,67 ± 1,60	3,37 ± 1,75	0,120
8 x 15	3,69 ± 1,65	3,36 ± 1,83	0,093
9 x 14	3,64 ± 1,53	3,33 ± 1,81	0,106
10 x 13	3,57 ± 1,61	3,34 ± 1,90	0,262
11 x 12	3,54 ± 1,62	3,37 ± 1,89	0,472
12 x 11	3,55 ± 1,66	3,39 ± 1,92	0,545
13 x 10	3,55 ± 1,57	3,35 ± 1,95	0,490
14 x 9	3,55 ± 1,60	3,34 ± 2,04	0,388
15 x 8	3,55 ± 1,65	3,30 ± 2,03	0,316
16 x 7	3,57 ± 1,68	3,28 ± 2,00	0,242
17 x 6	3,57 ± 1,70	3,17 ± 1,97	0,081
18 x 5	3,57 ± 1,75	3,11 ± 1,91	0,007
19 x 4	3,52 ± 1,76	2,99 ± 1,70	0,001
20 x 3	3,52 ± 1,74	3,07 ± 1,60	0,008
21 x 2	3,50 ± 1,73	2,85 ± 1,75	0,004

F19– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em metaestro-diestro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	4,29 ± 2,07	3,81 ± 1,69	0,398
3 x 20	4,22 ± 2,04	3,80 ± 1,68	0,409
4 x 19	4,17 ± 1,92	3,79 ± 1,67	0,399
5 x 18	4,20 ± 2,09	3,78 ± 1,68	0,403
6 x 17	4,27 ± 2,03	3,74 ± 1,67	0,301
7 x 16	4,24 ± 1,98	3,69 ± 1,67	0,282
8 x 15	4,24 ± 1,83	3,66 ± 1,69	0,221
9 x 14	4,25 ± 1,81	3,62 ± 1,72	0,126
10 x 13	4,27 ± 1,72	3,57 ± 1,68	0,050
11 x 12	4,22 ± 1,69	3,50 ± 1,69	0,019
12 x 11	4,19 ± 1,69	3,47 ± 1,68	0,005
13 x 10	4,17 ± 1,68	3,43 ± 1,63	0,002
14 x 9	4,13 ± 1,68	3,38 ± 1,66	0,004
15 x 8	4,10 ± 1,69	3,35 ± 1,64	0,003
16 x 7	4,06 ± 1,74	3,31 ± 1,63	0,007
17 x 6	4,01 ± 1,70	3,28 ± 1,58	0,040
18 x 5	3,96 ± 1,68	3,31 ± 1,72	0,085
19 x 4	3,91 ± 1,66	3,36 ± 1,77	0,159
20 x 3	3,86 ± 1,66	3,45 ± 1,99	0,358
21 x 2	3,88 ± 1,67	3,71 ± 2,09	0,732

F20– Avaliação da amplitude média do ASR intra-sessão em fêmeas em diestro

Primeiras tentativas (N1) X Últimas tentativas (N2)	Média ± SD		Valor p
	N1	N2	
2 x 21	2,94 ± 1,82	2,74 ± 1,51	0,410
3 x 20	2,84 ± 1,72	2,72 ± 1,51	0,466
4 x 19	2,81 ± 1,63	2,73 ± 1,49	0,571
5 x 18	2,76 ± 1,59	2,73 ± 1,50	0,806
6 x 17	2,77 ± 1,57	2,74 ± 1,50	0,778
7 x 16	2,72 ± 1,57	2,73 ± 1,51	0,940
8 x 15	2,72 ± 1,50	2,75 ± 1,50	0,794
9 x 14	2,74 ± 1,49	2,76 ± 1,56	0,899
10 x 13	2,78 ± 1,53	2,74 ± 1,58	0,807
11 x 12	2,77 ± 1,51	2,71 ± 1,55	0,620
12 x 11	2,79 ± 1,49	2,71 ± 1,55	0,475
13 x 10	2,81 ± 1,50	2,69 ± 1,56	0,240
14 x 9	2,83 ± 1,49	2,64 ± 1,56	0,062
15 x 8	2,85 ± 1,50	2,58 ± 1,57	0,006
16 x 7	2,85 ± 1,52	2,50 ± 1,56	0,002
17 x 6	2,83 ± 1,53	2,46 ± 1,51	0,003
18 x 5	2,80 ± 1,52	2,46 ± 1,50	0,011
19 x 4	2,79 ± 1,52	2,46 ± 1,57	0,030
20 x 3	2,77 ± 1,51	2,43 ± 1,57	0,046
21 x 2	2,75 ± 1,50	2,49 ± 1,60	0,131

F21– Estatística descritiva do Bloco Inicial (Figura 13)

	Grupos experimentais							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
Mean	3,743	4,114	3,575	3,932	4,645	3,726	4,214	2,749
Std. Deviation	1,064	2,015	1,885	1,892	2,473	1,795	2,082	1,596
Std. Error	0,3365	0,5817	0,5442	0,4460	1,010	0,5984	0,6941	0,3257

F22 – Estatística descritiva do Bloco Avaliação ASR/PPI (Figura 13)

	Grupos experimentais							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
25% Percentile	2,655	3,032	1,436	2,071	2,009	2,432	2,308	1,738
Median	3,676	3,709	3,295	3,608	4,033	3,181	3,479	2,743
75% Percentile	4,414	4,007	4,705	4,709	5,814	4,460	5,292	3,663

F23 – Estatística descritiva do Bloco Final (Figura 13)

	<i>Grupos experimentais</i>							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
Mean	3,108	3,276	2,731	3,259	4,078	3,167	3,312	2,454
Std. Deviation	1,263	1,790	1,846	1,931	2,218	1,956	1,716	1,498
Std. Error	0,3993	0,5168	0,5330	0,4550	0,9056	0,6521	0,5720	0,3058

F24 – Estatística descritiva da latência do pico no Bloco Avaliação ASR/PPI

	<i>Grupos experimentais</i>							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
Mean	24,40	31,08	37,14	30,49	30,71	25,04	26,87	31,83
Std. Deviation	5,006	12,78	15,18	14,16	11,60	10,16	6,985	12,00
25% Percentile	21,35	19,48	29,35	21,67	23,22	19,67	21,33	22,60
Median	21,88	25,15	35,79	26,49	27,81	21,83	24,33	25,21
75% Percentile	27,36	45,62	40,68	33,34	38,15	26,01	33,48	40,99

F25 – Estatística descritiva da porcentagem de PPI com 65 dB (Figura 14)

	<i>Grupos experimentais</i>							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
25% Percentile	27,62	5,730	27,04	18,43	29,04	23,69	31,79	26,96
Median	40,82	23,95	40,79	36,26	37,73	38,41	50,01	55,15
75% Percentile	53,75	36,84	49,45	57,76	58,11	51,71	57,92	63,40

F26 – Estatística descritiva da porcentagem de PPI com 70 dB (Figura 14)

	<i>Grupos experimentais</i>							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
25% Percentile	33,94	17,82	19,94	27,70	36,50	33,39	25,44	34,65
Median	43,13	25,26	38,31	42,82	53,21	42,56	41,89	56,68
75% Percentile	66,10	46,96	53,22	56,16	61,66	52,44	67,46	69,11

F27 – Estatística descritiva da porcentagem de PPI com 75 dB (Figura 14)

	<i>Grupos experimentais</i>							
	Machos	P	P-E	E	E-M	M	M-D	D
Number of values	10	12	12	18	6	9	9	24
25% Percentile	41,39	14,46	20,96	18,34	36,47	23,07	33,42	35,47
Median	48,99	33,80	26,88	46,21	55,51	49,50	38,11	59,61
75% Percentile	63,59	41,85	48,50	59,28	66,20	52,06	54,53	70,37

F28– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no DCN

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	417,7	444,2	205,8	534,7	343,8
Std. Deviation	96,38	286,2	76,14	523,5	228,2
Std. Error	39,35	116,9	31,08	213,7	93,15

F29– Estatística descritiva da densidade neuronal no DCN

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	60,56	71,79	35,44	85,46	65,14
Std. Deviation	12,07	42,49	10,97	77,98	37,77
Std. Error	4,928	17,35	4,477	31,84	15,42

F30– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no RPa

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	44,00	29,00	21,17	51,33	32,67
Std. Deviation	16,15	12,62	6,369	33,47	6,890
Std. Error	6,593	5,151	2,600	13,66	2,813

F31– Estatística descritiva da densidade neuronal no RPa

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	333,5	327,8	252,7	353,4	326,2
Std. Deviation	61,86	119,3	52,69	90,87	88,81
Std. Error	25,25	48,68	21,51	37,10	36,26

F32– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no MNTB

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	117,7	172,5	75,33	139,8	101,3
Std. Deviation	38,85	59,45	31,39	28,74	52,68
Std. Error	15,86	24,27	12,81	11,73	21,51

F33– Estatística descritiva da densidade neuronal no MNTB

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	65,56	96,00	49,25	86,68	68,65
Std. Deviation	20,48	36,22	16,31	19,86	24,88
Std. Error	8,361	14,79	6,659	8,107	10,16

F34– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no VNTB (Figura 16)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	127,8	188,5	109,7	149,2	90,83
Std. Deviation	26,03	57,25	33,77	56,89	23,73
Std. Error	10,63	23,37	13,79	23,23	9,686

F35– Estatística descritiva da densidade neuronal no VNTB (Figura 16)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	56,55	77,40	51,11	66,75	49,90
Std. Deviation	14,09	18,80	8,041	36,94	13,14
Std. Error	5,754	7,676	3,283	15,08	5,363

F36– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no PPTg (Figura 17)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	146,0	162,3	82,33	139,8	104,7
Std. Deviation	44,94	39,79	16,90	67,22	21,71
Std. Error	18,34	16,25	6,898	27,44	8,864

F37– Estatística descritiva da densidade neuronal no PPTg (Figura 17)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	36,74	49,22	25,63	67,55	30,69
Std. Deviation	8,194	13,96	4,174	55,58	10,20
Std. Error	3,345	5,701	1,704	22,69	4,165

F38– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no CnF (Figura 18)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	69,33	99,50	72,00	78,83	47,17
Std. Deviation	27,24	16,92	8,672	45,27	9,827
Std. Error	11,12	6,908	3,540	18,48	4,012

F39– Estatística descritiva da densidade neuronal no CnF (Figura 18)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	59,69	86,48	57,79	122,6	48,19
Std. Deviation	6,940	16,35	5,807	112,6	19,70
Std. Error	2,833	6,675	2,371	45,98	8,042

F40– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no LC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	37,17	41,83	28,33	34,00	19,33
Std. Deviation	13,11	12,16	9,070	27,92	8,710
Std. Error	5,350	4,963	3,703	11,40	3,556

F41– Estatística descritiva da densidade neuronal no LC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	30,74	46,12	32,42	29,37	28,35
Std. Deviation	7,567	13,03	9,675	17,13	9,999
Std. Error	3,089	5,319	3,950	6,992	4,082

F42– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no A5 (Figura 19)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	71,33	97,83	72,33	87,00	60,67
Std. Deviation	25,23	18,19	15,60	14,38	9,114
Std. Error	10,30	7,427	6,370	5,871	3,721

F43– Estatística descritiva da densidade neuronal no A5 (Figura 19)

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	13,70	24,55	18,47	19,18	15,67
Std. Deviation	3,753	3,920	3,018	2,534	2,584
Std. Error	1,532	1,600	1,232	1,035	1,055

F44– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no CIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	922,5	1091	741,2	1278	821,7
Std. Deviation	262,8	537,4	282,0	541,2	291,8
Std. Error	107,3	219,4	115,1	220,9	119,1

F45– Estatística descritiva da densidade neuronal no CIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	161,8	203,4	126,8	187,3	157,0
Std. Deviation	42,09	133,1	50,91	75,10	60,38
Std. Error	17,18	54,32	20,78	30,66	24,65

F46– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no ECIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	899,0	1040	476,8	809,3	583,7
Std. Deviation	211,3	482,8	114,5	359,2	192,1
Std. Error	86,25	197,1	46,74	146,6	78,42

F47– Estatística descritiva da densidade neuronal no ECIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	107,8	157,6	65,80	122,3	105,9
Std. Deviation	31,10	92,15	17,15	57,53	27,79
Std. Error	12,70	37,62	7,001	23,49	11,34

F48– Estatística descritiva do número de neurônios FOS-ir no DCIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	523,2	647,0	367,3	830,8	374,7
Std. Deviation	106,8	237,9	100,1	387,8	124,6
Std. Error	43,60	97,12	40,87	158,3	50,85

F49– Estatística descritiva da densidade neuronal no DCIC

	<i>Grupos experimentais</i>				
	Machos	P	E	M	D
Number of values	6	6	6	6	6
Mean	225,5	325,9	146,2	292,6	185,7
Std. Deviation	38,72	131,3	29,91	134,4	77,18
Std. Error	15,81	53,61	12,21	54,86	31,51

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **584-CEUA**, sobre "Influência do gênero e do ciclo estral no reflexo auditivo de sobressalto em ratos Wistar", sob a responsabilidade de **José de Anchieta de Castro e Horta Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 27 de março de 2014.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA