

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/03/2018.



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



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.

Ao 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 sensório-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, pedunculo pontino 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 sensório-motora em ratos *Wistar* machos e fêmeas, a fim de aprimorar estudos translacionais.

Palavras-chave: integração sensório-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 pedunculopontino 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).

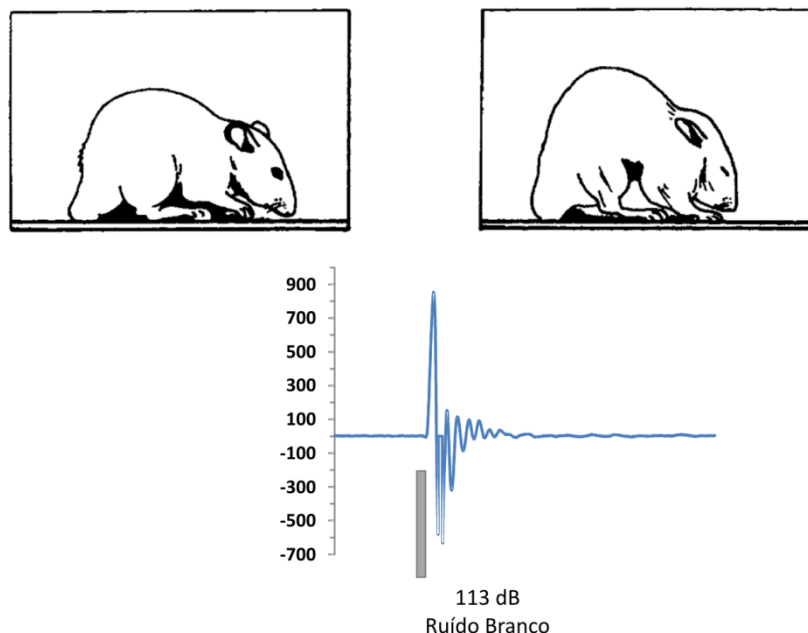


Figura 1. Esquema do reflexo auditivo de sobressalto no rato. Após ser estimulado por um som inesperado e de alta intensidade, o animal contrai a musculatura da face, pescoço e corpo para assumir uma postura defensiva (acima). Abaixo, gráfico da amplitude de resposta frente à apresentação de um estímulo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

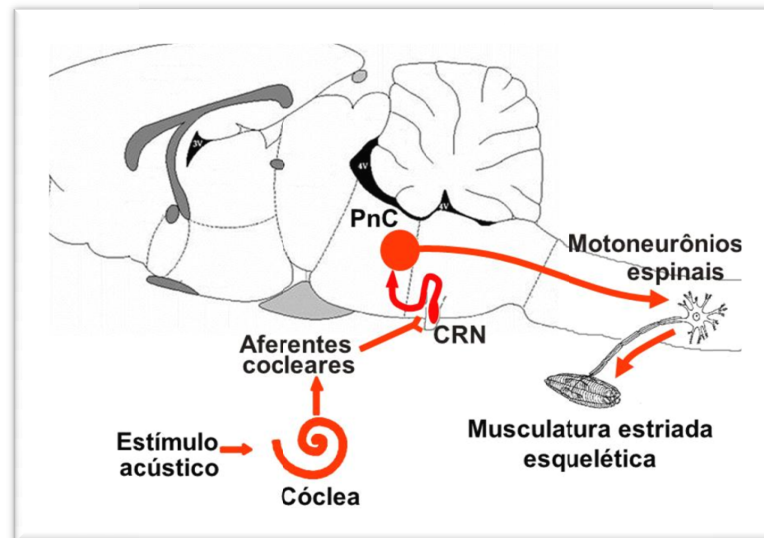


Figura 2. Esquema do circuito elementar do ASR em um corte sagital mediano do encéfalo do rato. Modificado de Barioni (2015).

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).

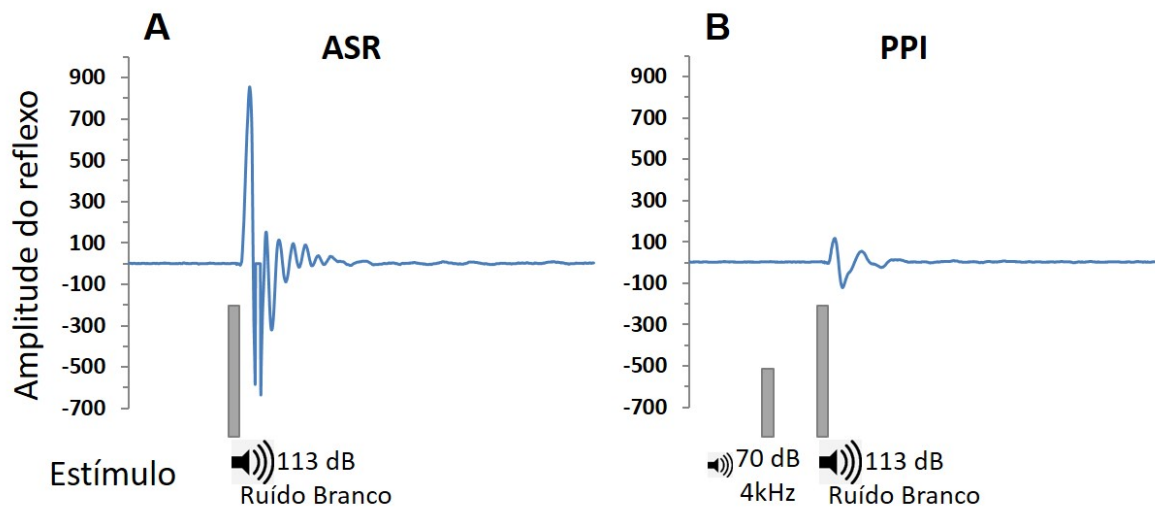


Figura 3. Registro da amplitude do reflexo auditivo de sobressalto (ASR) e da amplitude de sobressalto após inibição por estímulo prévio (PPI). Em A, a apresentação de um estímulo sonoro de alta intensidade (113 dB) desencadeia uma resposta de sobressalto no animal com grande amplitude. Em B, a amplitude 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; JOVANOVIĆ 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 sensório-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* orquidectomizados 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 consideração as 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).

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 circuí-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.; LYON, 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 $\alpha 2$ 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.
- JOVANOVIĆ, 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.; KUNGEL, 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-SCHNEIPFLUG, 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.; FRIAU, 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.