

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

**SUBSTRATOS NEURAI ENVOLVIDOS NOS EFEITOS MNEMÔNICOS DOS
HORMÔNIOS FEMININOS**

Cristina dos Santos Fonseca

Belo Horizonte
2010

Cristina dos Santos Fonseca

**SUBSTRATOS NEURAIS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS MNEMÔNICOS DOS
HORMÔNIOS FEMININOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia e Farmacologia do
Departamento de Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra Grace Schenatto Pereira

Belo Horizonte

2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, por todo apoio, conselhos, amor e dedicação em todos os momentos da minha vida. Pelo seu exemplo de determinação, trabalho árduo e de ter conseguido vencer na vida diante de tantas dificuldades.

Aos meus irmão Fábio, Priscila e Alexandre pelo apoio, carinho e incentivos.

Aos meus avós, Joaquim e Filomena, por terem me criado e me educado, terem me dado todo amor e suporte necessários.

Ao meu marido, André, pelo amor, apoio, companheirismo e incentivos em todos os momentos. Por ter acompanhado todo o mestrado desde o início, por me ajudar em vários protocolos e em muitos momentos de desespero. É o amor da minha vida, meu porto seguro e que faz minha vida ter sentido.

À irmandade, Giovanna e Fernanda, pela amizade, conselhos e principalmente companheirismo em todos os momentos desde a escola.

À minha amiga Giovanna, em especial, grande companheira de muitos anos, pela amizade, por muitos conselhos valiosos, pelo apoio e incentivo em todas as grandes decisões e conquistas. Por ser uma verdadeira irmã, sempre presente em todos os momentos de alegrias e tristezas. Um ombro amigo nas horas mais difíceis.

As minhas cunhadinhas, Ana Carolina e Dinamar, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

À minha sogra Maria José e vovó Regina pelo apoio e incentivo. Por me acolherem com todo carinho na família.

À minha orientadora, Grace, por me aceitar como aluna, confiando na minha competência, pelos ensinamentos e companhia nos desafios desses dois anos de mestrado.

Aos professores do NNC, André, Juliana e Márcio pelos ensinamentos.

Aos amigos do NNC, Maira, Luciana, Daniele Bernardes, Onésia, Natália, Daniela, Iva, Patrícia, Mariele, Renata, Talita, Aila, Hércules, Flávio, Marcelo, Thiago, Gustavo Rezende, Gustavo Lopes, Gustavo Brandão, Guilherme, Daniel, João, André, Bruno, José Maurício, pelo companheirismo, carinho, ajuda em vários protocolos e apoio em todos os momentos nesses dois anos de mestrado.

Às amigas Isabela, Ana Cláudia e Brisa, pessoas muito especiais que tiveram participação direta no projeto de mestrado, companheiras de muitas imunohistoquímicas, perfusões, protocolos comportamentais, análises. Amigas que me apoiaram e me aconselharam em muitos momentos e que também compartilharam muitas alegrias. Adoro vocês!

Agradecimento especial à Suellem e Mariele, pessoas maravilhosas, que nunca serão esquecidas pela família NNC.

Aos alunos de iniciação científica, Mariana, Cristiane, Guilherme, Gustavo Beleza e Gisele pela amizade e colaboração em vários protocolos.

À professora Adelina por ter me ajudado na padronização e execução dos protocolos de reposição hormonal, pela paciência e disponibilidade.

Aos integrantes do laboratório de endocrinologia, Gisele, Daniela, Fernanda, Patrícia, Iuri e Janine pela ajuda na padronização e execução da técnica de imunohistoquímica, pelo empréstimo de vários reagentes e materiais e pelo esclarecimento de várias dúvidas na parte endocrinológica do projeto.

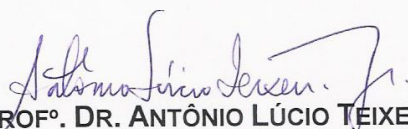
Ao professor Raphael pelas dicas imprescindíveis para o sucesso da técnica de imunohistoquímica.

À samira do departamento de morfologia por disponibilizar o criostato para os cortes do tecido, pela atenção e paciência.

“Substratos Neurais Envolvidos nos Efeitos Mnemônicos dos Hormônios Femininos”

CRISTINA DOS SANTOS FONSECA

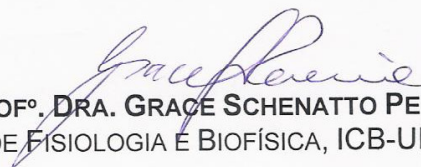
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **02 de dezembro de 2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANTÔNIO LÚCIO TEIXEIRA JÚNIOR
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, FM-UFMG



PROF. DR. RAPHAEL ESCORSIM SZAWKA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA, ICB-UFMG



PROF. DRA. GRACE SCHENATTO PEREIRA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA, ICB-UFMG, ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Memória.....	1
1.1.1. Memória de Trabalho (MT)	2
1.1.2. Memória de Curta Duração (MCD)	2
1.1.3. Memória de Longa Duração (MLD).....	2
1.1.4. Memórias não-declarativas	3
1.1.5. Memórias declarativas	3
1.2. Substratos neurais para a memória declarativa.....	4
1.2.1. O lobo temporal medial.....	4
1.3. Estrogênios, menopausa e memória	7
1.4. Proteínas marcadoras de ativação neuronal.....	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Animais experimentais.....	15
4.2. Cirurgia de Ovariectomia / Sham	15
4.3. Cirurgia de implante subcutâneo	15
4.4. Padronização da Terapia de Reposição Hormonal.....	17
4.5. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto – análise comportamental	18
4.5.1. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto – análise	
imunohistoquímica	19
4.6. Imunohistoquímica.....	20
4.7. Análise de imagens.....	21
4.8. Delineamento Experimental.....	23

4.8.1. PROTOCOLO 1: Verificar o efeito da duração da privação hormonal sobre a memória de reconhecimento de objetos	23
4.8.2. PROTOCOLO 2: Verificar se a reposição hormonal de 5 semanas reverte o déficit de memória.....	23
4.8.3. PROTOCOLO 3: Verificar a expressão de c-Fos no cérebro de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas.	25
4.8.4. PROTOCOLO 4: Verificar a expressão de c-Fos no cérebro de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas após terapia de reposição hormonal.	26
4.9. Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS	30
5.1. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto.....	30
5.1.1. Uma semana de privação hormonal.	30
5.1.2. Seis semanas de privação hormonal.	31
5.1.3. Doze semanas de privação hormonal.....	32
5.1.4. Comparação do desempenho cognitivo entre os grupos e ao longo do tempo.....	33
5.2. Padronização da reposição hormonal.....	34
5.3. Desempenho cognitivo após reposição hormonal	35
5.3.1. Verificação da eficiência da reposição hormonal após os experimentos comportamentais	37
5.4. Expressão de c-Fos após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos em fêmeas submetidas a doze semanas de privação hormonal	38
5.4.1. Expressão de c-Fos no hipocampo.....	38
5.4.2. Correlação entre a expressão de c-Fos no hipocampo e o tempo de exploração dos objetos	41
5.4.3. Expressão de c-Fos no córtex perirrinal.....	43
5.4.4. Correlação entre a expressão de c-Fos no córtex perirrinal e o tempo de exploração dos objetos	44
5.4.5. Expressão de c-Fos na amígdala	45
5.4.6. Correlação entre a expressão de c-Fos na amígdala e o tempo de exploração dos objetos	48
5.5. Expressão de c-Fos em fêmeas submetidas a doze semanas de ovariectomia mais cinco semanas de reposição hormonal.....	49
5.5.1. Expressão de c-Fos no hipocampo.....	50

5.5.2. Correlação entre a expressão de c-Fos no hipocampo e o tempo de exploração dos objetos	54
5.5.3. Expressão de c-Fos no córtex perirrinal.....	55
5.5.4. Correlação entre a expressão de c-Fos no córtex perirrinal e o tempo de exploração dos objetos	57
5.5.5. Expressão de c-Fos na amígdala	57
5.5.6. Correlação entre a expressão de c-Fos na amígdala e o tempo de exploração dos objetos	60
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO.....	72
8. BIBLIOGRAFIA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

LA	Núcleo lateral da amígdala
BLA	Núcleo basolateral da amígdala
CeA	Núcleo central da amígdala
E2	17 β -estradiol
MT	Memória de trabalho
MCD	Memória de curta duração
MLD	Memória de longa duração
GD	Região do giro denteado do hipocampo
CA1	Região CA1 do hipocampo
CA3	Região CA3 do hipocampo
OVX	ovariectomia
Sham	Falsa cirurgia de ovariectomia
OVX óleo	Animal ovariectomizado que recebeu cápsula contendo óleo
OVX E2	Animal ovariectomizado que recebeu cápsula contendo 17 β -estradiol
S	Subículo
ERα	Receptor de estrogênios alfa
ERβ	Receptor de estrogênios beta
TH	Terapia hormonal
IEGs	Genes de expressão imediata
PFA	Paraformaldeído
PBS	Tampão fosfato salina
TBS	Tampão Trizma salina
TBS-T	Tampão Trizma salina com Triton-X
OVX caixa	Animais ovariectomizados que exploraram a caixa vazia
OVX objetos	Animais ovariectomizados que exploraram a caixa com dois objetos iguais
Sham caixa	Animais submetidos à falsa cirurgia de ovariectomia que exploraram a caixa vazia
Sham objetos	Animais submetidos à falsa cirurgia de ovariectomia que exploraram a caixa com dois objetos iguais
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
BNTS	Núcleo do leito da estria terminal

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino da tarefa de reconhecimento de objetos 1, 6 e 12 semanas após cirurgia sham/OVX.	30
Tabela 5.2: Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, após reposição hormonal de cinco semanas.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Classificação das memórias (Bayley e Squire, 2003).	1
Figura 1.2 - Estruturas do lobo temporal medial. Vista lateral do cérebro de rato (A), vista ventral do cérebro de macaco (B) e vista ventral do cérebro humano (C). (Squire et al., 2004).	4
Figura 1.3: Circuito do sistema de memória do lobo temporal medial. (Squire et al., 2004).	5
Figura 1.4: Circuito da interconexão da amígdala com as outras estruturas do lobo temporal medial. (Felten e Shetty, 2009).....	6
Figura 1.5 - Biossíntese dos hormônios ovarianos. (Goodman, 2009).....	8
Figura 4.1 - Implante subcutâneo.....	16
Figura 4.2 – Foto representativa indicando o local de implante da cápsula de reposição hormonal.	17
Figura 4.3 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto. Etapas: habituação, treino e teste.....	18
Figura 4.4 – a, b: hipocampo; c, d: amígdala; e, f: córtex perirrinal. Delimitação das regiões marcadas por c-Fos após aplicação da faixa limite (<i>threshold</i>).	22
Figura 4.5 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 1.....	23
Figura 4.6 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 2.....	24
Figura 4.7 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 3.....	25
Figura 4.8 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 4.....	27
Figura 5.1: Tarefa de reconhecimento de um novo objeto, uma semana após a cirurgia de Ovariectomia (OVX, n=10) / Sham (n=8). ***p<0,001 comparado com 0,5.	31
Figura 5.2 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto seis semanas após a cirurgia de Ovariectomia (OVX, n=10) / Sham (n=8). **p<0,01 comparado com 0,5.32	

Figura 5.3 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto doze semanas após a cirurgia de ovariectomia (OVX, n=10) / Sham (n=8). Índice de reconhecimento ***p<0,001 comparado com 0,5.....	33
Figura 5.4 – Índices de reconhecimento na sessão de teste de animais sham (n=9) e OVX (n=10) em diferentes tempos pós-cirurgia. *p<0,001 comparado com OVX uma semana e #p<0,05 comparado com grupo sham doze semanas.....	34
Figura 5.5 - Padronização da reposição hormonal. Acompanhamento do peso do útero ao longo de cinco semanas. Sham (n=9), OVX óleo (n=4) e OVX E2 (n=4). *p<0,05 comparado com o grupo OVX óleo.....	35
Figura 5.6: Tarefa de reconhecimento de um novo objeto após cinco semanas de reposição hormonal com 17β-estradiol ou óleo após privação hormonal de doze semanas. Sham (n=11), OVX óleo (n=10) e OVX E2 (n=11). *p<0,05 comparado com 0,5.....	36
Figura 5.7 - Comparação dos pesos dos úteros após reposição hormonal com 17β-estradiol ou óleo. Sham (n=10), OVX óleo (n=7), OVX E ₂ (n=10). *p<0,001 (comparado com sham); #p<0,001 (comparado com sham e OVX óleo).....	37
Figura 5.8 - Expressão de c-Fos na região CA1 do hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos. Sham caixa (n=4), Sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=6).	39
Figura 5.9 - Expressão de c-Fos na região CA3 do hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos.	39
Figura 5.10 - Expressão de c-Fos no giro denteado doze semanas após a cirurgia sham/OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos.	40
Figura 5.11: Imagens da imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos no hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX.	40
Figura 5.12 - Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CA1 do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=6), OVX (n=6), *p<0,05.	41
Figura 5.13 - Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CA3 do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=6), OVX (n=6), *p<0,05.	42

Figura 5.14: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região do giro denteado do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=5), OVX (n=6).	42
Figura 5.15 - Expressão de c-Fos no córtex perirrinal doze semanas após a cirurgia sham/OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=4).....	43
Figura 5.16 - Fotos da imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos do córtex perirrinal, doze semanas após a cirurgia sham / OVX.....	44
Figura 5.17 - Correlação entre a expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos no córtex perirrinal, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=5), OVX (n=4).	45
Figura 5.18 - Expressão de c-Fos no núcleo LA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=4).	46
Figura 5.19 - Expressão de c-Fos no núcleo BLA , doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=4), OVX caixa (n=5), OVX objetos (n=5).	46
Figura 5.20 - Expressão de c-Fos no núcleo CeA, doze doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), Sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=5).	47
Figura 5.21 - Fotos da Imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos na amígdala, doze semanas após a cirurgia sham / OVX.....	47
Figura 5.22: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região LA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. ***P<0,001.	48
Figura 5.23: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região BLA, doze semanas após privação hormonal. ***P<0,001.....	48
Figura 5.24: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CeA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=5), OVX (n=5).	49

Figura 5.25 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto após cinco semanas de reposição hormonal após doze semanas da cirurgia ovariectomia/sham. Sham (n=11), OVX óleo (n=10), OVX E2 (n=11). *p<0,05 comparado com 0,5.....	50
Figura 5.26 - Expressão de c-Fos na região CA1 de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=5), OVX óleo objetos (n=5), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). ***P<0,001 (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).	51
Figura 5.27 - Expressão de c-Fos na região CA3 do hipocampo de apósdoze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. ***P<0,001 (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).	52
Figura 5.28 - Expressão de c-Fos na região GD do hipocampo de fêmeas submetidas a 12 semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. ***P<0,001 (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).	52
Figura 5.29 - Fotos da imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos no hipocampo cinco semanas de reposição hormonal após doze semanas de privação hormonal.....	53
Figura 5.30 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região CA1 do hipocampo após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal com 17β-estradiol (n=5) ou óleo (n=5).....	54
Figura 5.31 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região CA3 do hipocampo após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal.....	54
Figura 5.32 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região do GD do hipocampo de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX mais cinco semanas de reposição hormonal com 17β-estradiol (n=5) ou óleo (n=5).	55
Figura 5.33 - Expressão de c-Fos no córtex perirrinal após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). ***P<0,001 (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto). # P<0,001 (comparado com o grupo OVX E2 caixa).	56

Figura 5.34 – Foto representativa da imunohistoquímica de c-Fos no córtex perirrinal de fêmeas após doze semanas de privação hormonal seguido de cinco semanas de reposição hormonal.	56
Figura 5.35 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no córtex perirrinal após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).	57
Figura 5.36 - Foto representativa da imunohistoquímica de c-Fos na amígdala de fêmeas após doze semanas de privação hormonal seguido de cinco semanas de reposição hormonal.	58
Figura 5.37 - Expressão de c-Fos no núcleo LA de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX mais cinco semanas de reposição. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). ***P<0,001 (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto).....	58
Figura 5.38 - Expressão de c-Fos no núcleo BLA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). ***P<0,001 (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto).....	59
Figura 5.39 - Expressão de c-Fos no núcleo CeA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). ***P<0,001 (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto). # P<0,001 (comparado com o grupo OVX E2 caixa)	60
Figura 5.40 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo LA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).	61
Figura 5.41 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo BLA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).	61
Figura 5.42 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo CeA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).	62

RESUMO

O envelhecimento da população parece ter um efeito drástico em mulheres, provavelmente devido à menopausa, que provoca uma redução significativa nos níveis dos esteróides ovarianos por volta dos cinquenta anos de idade. A menopausa está associada com a perda da memória, e estudos têm demonstrado que a terapia estrogênica pode proteger contra essa piora da cognição. Na tentativa de esclarecer os efeitos dos estrogênios na cognição, este trabalho avaliou o efeito da diminuição de 17β -estradiol circulante, através da remoção dos ovários, na memória de reconhecimento de objetos, bem como na ativação de áreas do cérebro como hipocampo, amígdala e córtex perirrinal. Além disso, também foi avaliado o efeito da reposição hormonal, feita após longo período de privação hormonal, sobre a memória e ativação dos mesmos substratos neurais. Foram utilizados camundongos fêmeas de dois meses de idade submetidas à falsa cirurgia (sham) ou a cirurgia de ovariectomia (OVX). Utilizamos a tarefa de reconhecimento de um novo objeto para avaliar o desempenho cognitivo das mesmas uma, seis e doze semanas após o procedimento cirúrgico. Para avaliar o efeito da reposição hormonal, após doze semanas da cirurgia, os animais OVX foram divididos em dois grupos: um que recebeu o implante de cápsulas subcutâneas contendo óleo, e o outro que recebeu o implante de cápsulas subcutâneas contendo 0,18mg de 17β -estradiol. Após cinco semanas, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de um novo objeto. Para avaliar a ativação neuronal em resposta ao aprendizado na tarefa de reconhecimento de um novo objeto, utilizamos o marcador c-Fos, cuja expressão foi avaliada no hipocampo, córtex perirrinal e amígdala. No primeiro protocolo, os animais foram divididos em dois grupos, sham e OVX. Doze semanas pós-cirurgia, cada grupo foi sub-dividido em dois: (1) caixa, onde os camundongos exploraram uma caixa vazia, denominada contexto e (2) onde os animais exploraram dois objetos iguais, dentro do mesmo contexto. Uma hora e meia após, os mesmos foram perfundidos e os cérebros processados para a realização da imunohistoquímica e marcação de c-Fos. No segundo protocolo, todos os animais foram ovariectomizados e doze semanas após divididos em dois grupos: (1) que recebeu implante de óleo e (2) que recebeu implante de 17β -estradiol. Após cinco semanas, os dois grupos foram subdivididos exatamente como no primeiro protocolo anteriormente explicado. Nossos resultados mostraram que animais OVX

apresentam déficit de memória após doze semanas de privação hormonal e a reposição com 17 β -estradiol foi capaz de reverter parcialmente este déficit. Não houve diferença entre os grupos sham e OVX quanto à expressão de c-Fos no hipocampo, córtex perirrinal e núcleos lateral e basolateral da amígdala. No entanto, observamos uma correlação positiva entre o tempo de exploração dos objetos e a expressão de c-Fos em todas as regiões acima citadas, porém, apenas no grupo sham. Além disso, houve maior expressão de c-Fos no núcleo central da amígdala de animais OVX expostos ao contexto quando comparados ao grupo sham caixa. A reposição hormonal aumentou a expressão de c-Fos em todos os substratos neuronais analisados e ainda foi capaz de induzir um aumento no grupo de animais que exploraram os objetos, no córtex perirrinal e no núcleo central da amígdala. Em conjunto, nossos resultados sugerem que os estrogênios são capazes de modificar a ativação de substratos neurais importantes para a memória declarativa, como o córtex perirrinal, além de áreas importantes para respostas neurovegetativas, como o núcleo central da amígdala. Logo, parte dos déficits e benefícios cognitivos atribuídos às flutuações nos níveis de estrogênios podem ser explicados pela sua habilidade em modificar a ativação de substratos neurais necessários para a consolidação, bem como, para a modulação de memórias declarativas.

ABSTRACT

Aging has a drastic effect on women due to menopause that occurs around the age of fifty and causes a significant reduction of ovarian steroids. Menopause is associated with memory loss and studies demonstrate that estrogen therapy can protect against this decrease in cognition. In an attempt to enlighten the effects of estrogens in cognition, this study evaluates the effect of reduced circulating 17β -estradiol, through the removal of the ovary, in object recognition memory, and activation of brain areas such as the hippocampus, amygdala and perirhinal cortex of the brain. Moreover, the effect of hormonal replacement was evaluated, after long period of deprivation, on memory and activation of the same neuronal substrates. Were used two month old female mice subjected to fake surgery (sham) or ovariectomy surgery (OVX). The novel recognition task was used to evaluate the cognition performance of mice one, six and twelve after the surgical procedure. To evaluate the effect of hormonal replacement after twelve weeks of surgery, the animals were divided into two groups: one that received subcutaneous capsules with oil, and other that received capsules containing 0.18 mg of 17β -estradiol. After five weeks, the animals were subjected to the novel object recognition task. To assess neuronal activation in response to learning due to the task, was used c-Fos expression in the hippocampus, perirhinal cortex and amygdala. In the first protocol, the animals were divided in two groups: sham and OVX. Twelve weeks after the surgery, each group was sub-divided in to two groups: (1) box, mice that explored an empty box, named context and (2) animals that explored two equal objects, inside the same context. One hour and a half after, the animals were transcardially perfused and the brains were processed to perform a immunohistochemical procedure and determine the expression of c-Fos. In the second protocol, all the animals were ovariectomized and after twelve weeks split in to two groups: (1) animals that received subcutaneous capsules with oil, and (2) animals that received capsules containing 0.18 mg of 17β -estradiol. After five weeks, the two groups were sub-divided as described at the first protocol. Results show that OVX animals display memory loss after twelve weeks of hormonal deprivation and that hormonal replacement with 17β -estradiol is able to partially revert this deficit. No significant differences were observed in the expression of c-Fos in the hippocampus, perirhinal cortex, basolateral and lateral amygdala for groups sham and OVX. However, a

positive correlation was observed between exploration time of the objects and the expression of c-Fos in all above referred regions just for sham group. Moreover, there was a greater expression of c-Fos in the central nucleus of the amygdala for OVX animals exposed to the empty box compared to the sham group exposed to the same context. The hormonal replacement increased the expression of c-Fos in all the analyzed neural substrates and was able to induce an increase of c-Fos expression in the perirhinal cortex and central nucleus of the amygdala for animals that explored the box with objects. Altogether, the results suggest that estrogens are capable of modifying the activation of declarative memory relevant neural substrates, as the perirhinal cortex, and also important areas for neurovegetative answers, as the central nucleus of the amygdala. Therefore, part of the cognitive benefits and deficits related to the fluctuations of the estrogens levels can be explained by its ability to modify the activation of neural substrates required for consolidation and modulation of declarative memories.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória

O termo memória se refere ao processo mediante o qual adquirimos, formamos, conservamos e evocamos informação. As memórias são formadas nos neurônios através de um complexo código de sinais elétricos e bioquímicos, sendo então armazenadas em redes neurais e podendo ser evocadas pelas mesmas redes ou por outras. São ainda moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e pelos estados de ânimo. As memórias podem ser classificadas em relação à duração em memória de trabalho (MT), memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) e quanto ao conteúdo podem ser classificadas em memórias declarativas e memórias não declarativas (Izquierdo, 2002) (Figura 1.1).

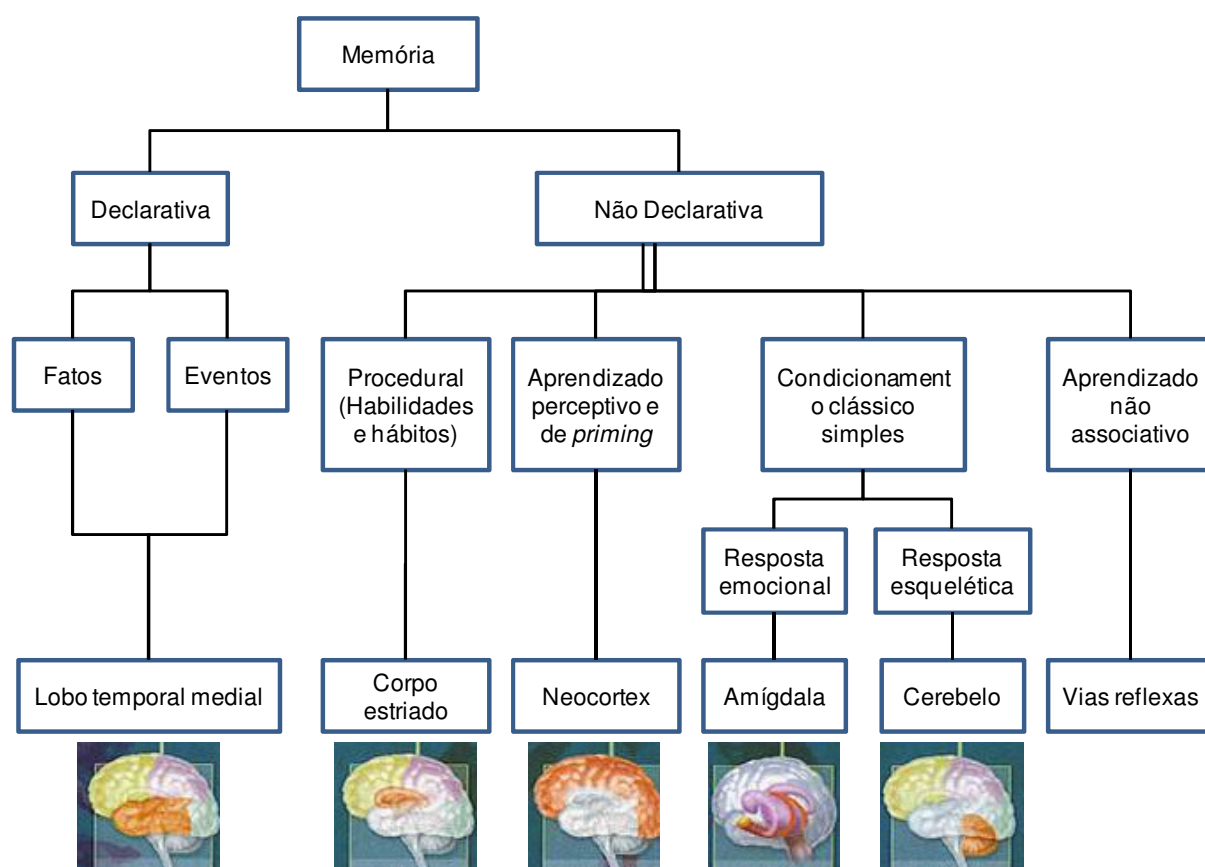


Figura 1.1 - Classificação das memórias (Bayley e Squire, 2003).

1.1.1. Memória de Trabalho (MT)

A MT, também chamada de memória operacional, é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal e é considerada uma memória imediata, devido ao seu tempo de duração de no máximo três minutos e por apresentar poucas alterações bioquímicas (GoldmanRakic, 1996; Izquierdo et al., 1998a). Essa memória serve para “gerenciar a realidade” e determinar o contexto em que os diversos fatos ou acontecimentos ocorrem. Funciona como um gerenciador geral de informações, o qual dá ou não relevância a estas, selecionando assim o que será armazenado ou não e também, funciona como um sistema de controle atencional com o objetivo de manter as informações na memória para uso temporário para realização de operações do dia-a-dia, como por exemplo, compreensão de fatos, raciocínio, resolução de problemas e ações comportamentais (Izquierdo et al., 1998a; Izquierdo, 2002).

1.1.2. Memória de Curta Duração (MCD)

As MCD são memórias que duram segundos a horas e são instáveis, ou seja, são vulneráveis a perturbações como traumatismos cranianos e eletro-choques. Isto se deve provavelmente ao fato de que, nessa fase, não ocorre expressão gênica nem síntese protéica, tornando essa memória susceptível à ação de muitas variáveis. Basicamente, a função da memória de curta duração é manter as informações disponíveis até que estas se consolidem (Izquierdo et al., 1998b; Izquierdo et al., 1998c; Izquierdo e McGaugh, 2000).

1.1.3. Memória de Longa Duração (MLD)

A MLD tem como propriedade fundamental a manutenção da informação estável, utilizando-se de síntese protéica. Apesar de compartilhar as mesmas estruturas neurais e possuir basicamente o mesmo conteúdo de informação que a memória de curta duração, possui mecanismos bioquímicos completamente distintos e ocorre de forma independente e paralela (Izquierdo et al., 1999; Izquierdo, 2002).

1.1.4. Memórias não-declarativas

As memórias não-declarativas são processadas principalmente pelo núcleo caudado e cerebelo e estão relacionadas com capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais. São exemplos dessas memórias: memória de procedimento, sistema de representação perceptivo (priming), condicionamento clássico e aprendizado não associativo (habituação/sensibilização) (Izquierdo, 2002; Bayley e Squire, 2003).

1.1.5. Memórias declarativas

As memórias declarativas são processadas principalmente pelas estruturas do lobo temporal medial e registram fatos, eventos e conhecimentos. As memórias declarativas podem ser divididas em semânticas, que estão relacionadas com conhecimentos gerais, e episódicas que se relacionam com eventos ocorridos. (Izquierdo, 2002; Bayley e Squire, 2003).

A memória episódica foi inicialmente descrita por Tulving (1972) e é tida como um dos principais sistemas de memórias neurocognitivas. É a “memória para eventos pessoalmente experimentados” (autobiográfica) que provê informações sobre o que, quando e onde ocorreu um evento específico.

A memória episódica já foi descrita como estritamente humana, já que preconiza lembrança consciente de uma experiência pessoal única, que pode ser verbalmente explicitada. Como os animais não podem verbalizar experiências, apesar de vivenciarem experiências individuais, acredita-se que os mesmos apresentem uma memória episódica similar aos humanos. Desta forma, os animais apresentariam uma forma implícita de memória episódica. Por exemplo, animais são capazes de modificar seus comportamentos frente a diferentes componentes de um contexto (Dere et al., 2005). Clayton e Dickinson (1998) descreveram evidências claras nas quais os animais possuíam características desse tipo específico de memória humana, porém a descreveu como uma memória semelhante à episódica (“episodic-like memory”) porque não existem formas de identificar se a lembrança em animais é conscientemente acompanhada de recordação.

Uma das formas de se investigar a memória do tipo episódica em animais é através da tarefa de reconhecimento de objetos. Esse paradigma de aprendizado e

memória foi descrito inicialmente por Ennaceur e Delacour (1988), e é baseado na habilidade exploratória natural de roedores expostos a um novo ambiente. Nesse paradigma de aprendizagem, a diferença na exploração entre um objeto previamente conhecido e um objeto novo é dada como um índice de desempenho da memória (Bertaina-Anglade et al., 2006). Em contraste com a maioria dos paradigmas de memória e aprendizado classicamente usados que requerem longos períodos de treinamento do animal, a tarefa de reconhecimento de objetos oferece a possibilidade de obter informação rápida, além de não requerer exposição a um estímulo aversivo e nem restrição hídrica ou alimentar (Dere et al., 2007).

1.2. Substratos neurais para a memória declarativa

1.2.1. O lobo temporal medial

O lobo temporal medial (Figura 1.2) inclui um sistema de estruturas relacionadas anatomicamente que são importantes para a formação da memória declarativa e vários estudos sugerem que lesões desse lobo produzem déficits de memória tanto em humanos (Buffalo et al., 1998), quanto em macacos (Meunier et al., 1993) e em roedores (Mumby e Pinel, 1994; Aggleton et al., 1997).

Esse lobo abrange uma região grande do encéfalo que inclui a amígdala, a formação hipocampal (giro denteado (GD), região CA do hipocampo (CA1, CA2 e CA3), subículo (S)) e os córtices entorrinal, perirrinal e para-hipocampal (Squire e Zolamorgan, 1991; Simons e Spiers, 2003).

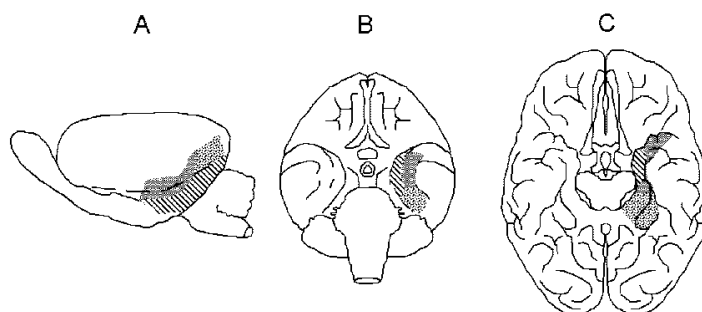


Figura 1.2 - Estruturas do lobo temporal medial. Vista lateral do cérebro de rato (A), vista ventral do cérebro de macaco (B) e vista ventral do cérebro humano (C). (Squire et al., 2004).

O Circuito básico do sistema de memória do lobo temporal medial se dá da seguinte forma: os córtices perirrinal e para-hipocampal recebem amplas projeções de áreas unimodais e polimodais dos lobos frontal, temporal e parietal e projetam-se para o córtex entorrinal, compondo cerca de 2/3 de suas aferências. O córtex entorrinal, por sua vez, é a aferência majoritária do hipocampo e ainda recebe projeções importantes do córtex pré-frontal e parietal posterior (Squire et al., 2004) (Figura 1.3).

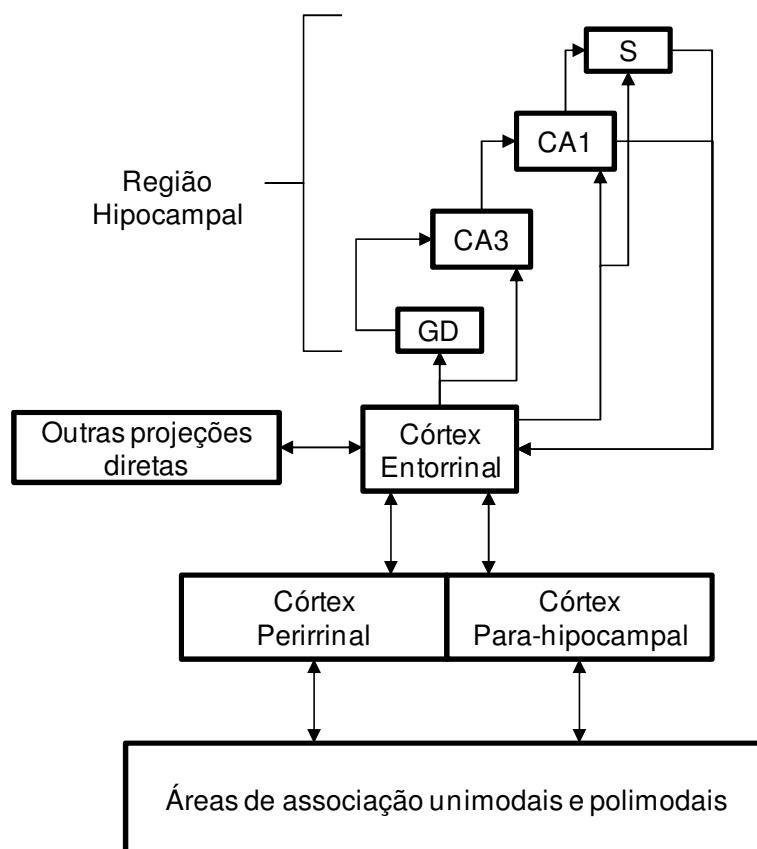


Figura 1.3: Circuito do sistema de memória do lobo temporal medial. (Squire et al., 2004).

A aferência predominante do córtex perirrinal provem de áreas de associação unimodais visuais, no córtex inferior temporal adjacente, uma região importante para processamento visual de objetos. Em contraste, o córtex para-hipocampal recebe informações predominantemente da área de associação visual posterior, do córtex parietal posterior, ambos relacionados a função visuo-espacial, além de receber informações do córtex de associação unimodal auditivo localizado no giro temporal superior (Kesner e Martinez, 2007).

Outra interconexão importante do lobo temporal se dá entre hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex perirrinal. O fluxo de informações entre estas estruturas desempenha papel importante na memória e em vários comportamentos emocionais e motivacionais (Izquierdo et al., 1997; Kesner e Martinez, 2007; Koganezawa et al., 2008), (Figura 1.4).

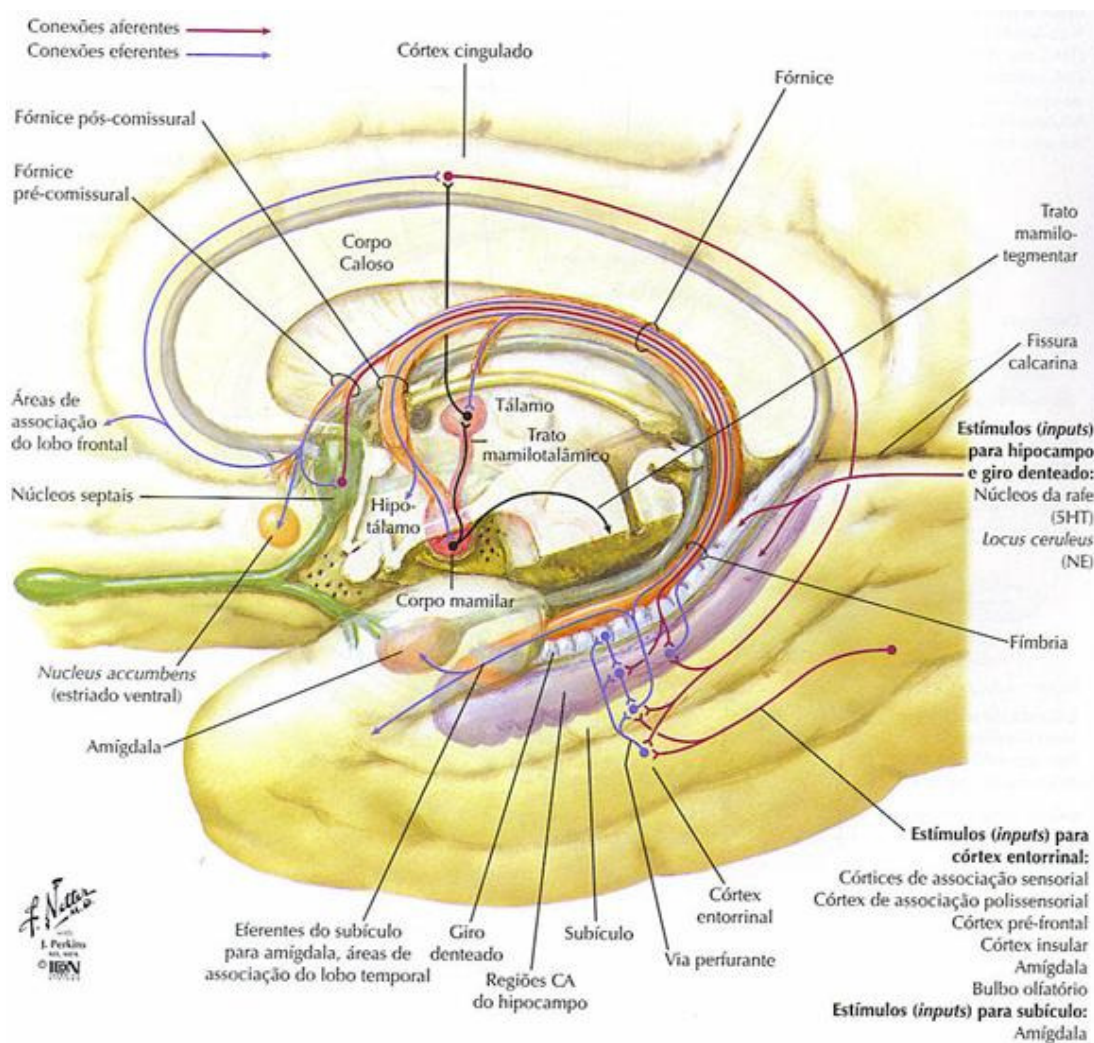


Figura 1.4: Circuito da interconexão da amígdala com as outras estruturas do lobo temporal medial. (Felten e Shetty, 2009).

Achados recentes sugerem que existem divisões funcionais nas áreas relacionadas ao lobo temporal medial. O hipocampo processa principalmente informações espaciais e contextuais (Balderas et al., 2008; Batassa et al., 2010; Levita e Muzzio, 2010), a amígdala informações de origem emocionais e aversivas (Hamann et al., 1999; Bucherelli et al., 2006), o córtex perirrinal principalmente memória de objetos (Pihlajamaki et al., 2004; 2005; Buffalo et al., 2006). Já o córtex

entorrinal processa vários tipos de memória (Suzuki et al., 1997; Galani et al., 1998) e possivelmente integra as informações processadas pela amígdala e hipocampo durante e depois do treino.

A amígdala ou complexo amigdalóide cumpre um papel integrativo em atividades comportamentais, vegetativas e endócrinas. Ela participa seja na percepção, modulação ou integração das funções associadas ao medo e ansiedade, atenção, aprendizado e memória de cunho emocional, além de comportamentos defensivo, reprodutivo, cognitivo e social (Pitkanen et al., 1997; Swanson e Petrovich, 1998) 1998). Ela é formada por um conjunto de núcleos interconectados e localizados na região subcortical do lobo temporal, compondo diferentes sistemas funcionais. São eles: núcleo central (sistema vegetativo), núcleos basolateral anterior e lateral (sistema córtico-frontal), núcleo basolateral medial (sistema olfativo acessório) e demais núcleos da amígdala (sistema olfativo principal) (Pitkanen et al., 1997; Sah et al., 2003).

A memória declarativa é vulnerável ao processo de envelhecimento, como demonstrado por estudos em animais envelhecidos com declínio da memória relacionada ao hipocampo (Driscoll et al., 2003; Bizon et al., 2009) e também em estudos com humanos comparando indivíduos adultos velhos e jovens (Kukolja et al., 2009; Murty et al., 2009; Meulenbroek et al., 2010). Muitas das mudanças bioquímicas, estruturais e funcionais que ocorrem no envelhecimento cerebral de mulheres são influenciadas por mudanças nos níveis dos estrogênios. Concomitantemente, mulheres no período peri e pós-menopausa, muitas vezes, se queixam de perda de memória ou piora da mesma acompanhada por dificuldades de lembrar palavras e números, sendo muito freqüentes as queixas de dificuldade de concentração (Silva e De Sá, 2006; Craig e Murphy, 2007).

1.3. Estrogênios, menopausa e memória

Os estrogênios são hormônios pertencentes ao grupo dos esteróides, derivados do precursor colesterol. São produzidos pelos folículos ovarianos e durante a gestação pela unidade feto-placentária e abrangem três diferentes formas: estradiol, estriol e a estrona. Estradiol é o mais potente deles, seguido pelo estriol e pela estrona (Strauss e Barbieri, 2004).

O colesterol necessário para a síntese de estrogênios (Figura 1.5) é produzido em grande parte pelo fígado, mas pode ser originado de outros tecidos. O colesterol é convertido em pregnenolona, numa reação catalisada pela enzima P-450. A partir da pregnenolona, os estrogênios podem ser sintetizados por duas vias diferentes: (1) conversão da pregnenolona tanto em progesterona ou em 17 α -hidroxipregnenolona e, (2) os estrogênios podem ser formados tanto da androstenediona (para estrona) ou da testosterona (para estradiol) via outra enzima P-450, a enzima do complexo aromatase (P-450 Arom.). A partir desses sítios os estrogênios são liberados na circulação sanguínea (Goodman, 2009).

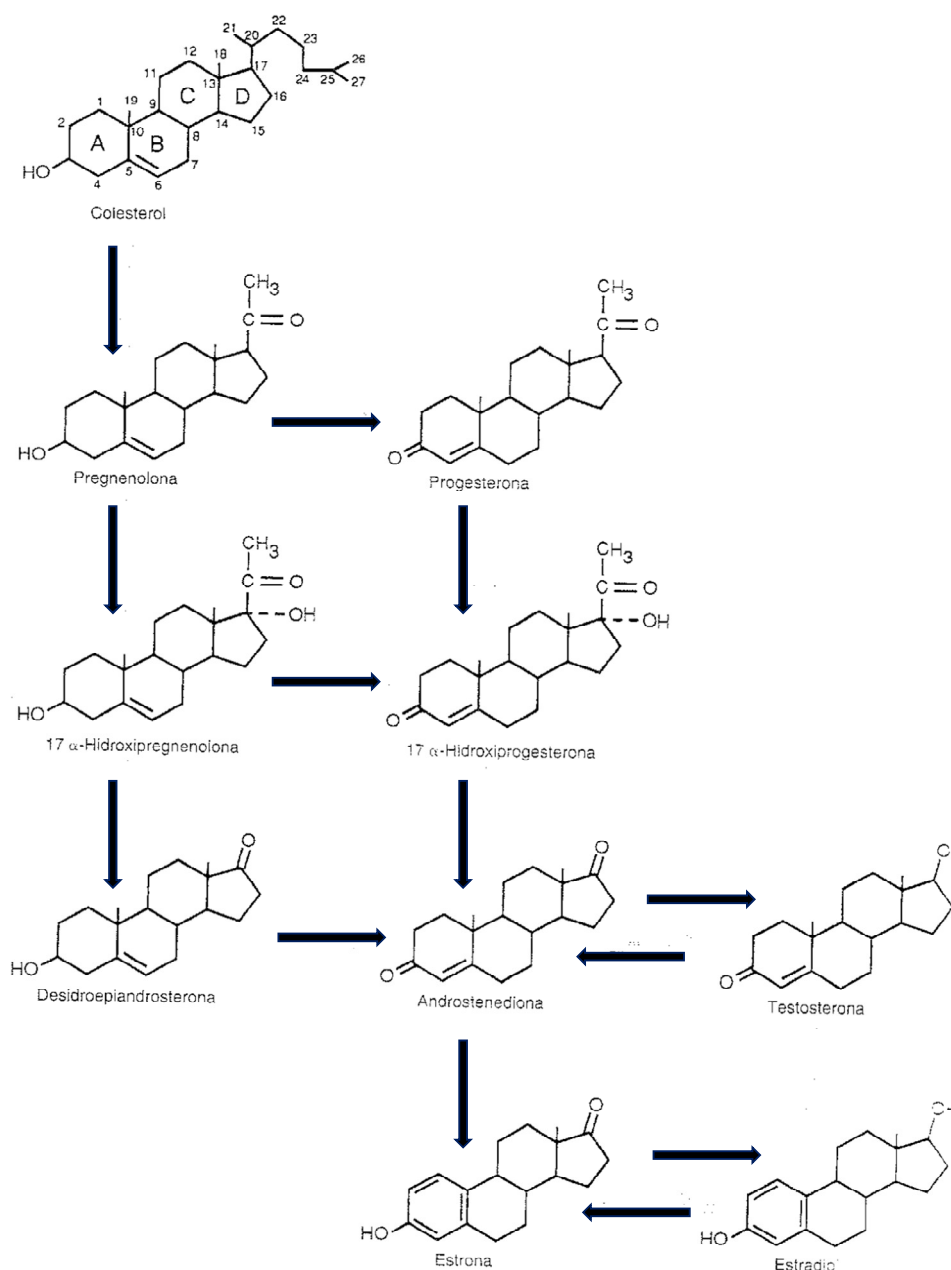


Figura 1.5 - Biossíntese dos hormônios ovarianos. (Goodman, 2009).

Os estrogênios exercem suas ações em células e tecidos alvos ligando-se à estruturas na membrana celular (mecanismo não-genômico) ou ativando receptores intracelulares (mecanismo genômico). Dois tipos de receptores podem ser encontrados em diferentes tecidos e foram caracterizados em ambos os gêneros, são eles, ER α (receptor de estrogênio alfa) e ER β (receptor de estrogênio beta) (Kuiper et al., 1996; McEwen e Alves, 1999). O estradiol se liga com alta e igual afinidade a ambos os receptores, a estrona se liga com mais facilidade ao ER α e o estriol liga-se mais fracamente ao ER β . Os dois subtipos de receptores diferem entre si de acordo com as características específicas e funcionais dos tecidos. ER α é expresso num grau alto ou moderado no útero, testículo, hipófise, ovários, rins e epidídimo, enquanto o ER β é abundante na próstata, ovários, pulmão, bexiga, cérebro, ossos, útero e testículo (Strauss e Barbieri, 2004).

Os ovários são a principal fonte de estrógenos circulantes, mas a biossíntese local desses hormônios pode ocorrer em outros tecidos, como na glândula adrenal, tecido adiposo, cérebro e placenta, a partir do colesterol. O cérebro tem a habilidade de sintetizar hormônios esteróides a partir da síntese local de colesterol independente dos hormônios circulantes da periferia (Naftolin et al., 1996), em regiões como hipocampo e córtex cerebral (Hojo et al., 2004; Fester et al., 2006), abrangendo uma ampla variedade de efeitos sobre o humor e cognição (McEwen e Alves, 1999).

Durante as duas décadas passadas, a combinação da disponibilidade de novas tecnologias médicas e o desenvolvimento de novas pesquisas buscou fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos de ação do estrogênio no sistema nervoso central que pode ser a base de sua possível influência no funcionamento cognitivo. A intensificação dos esforços para desenvolver pesquisas, estimuladas pelas aplicações clínicas potenciais destes resultados, está relacionada ao aumento acentuado na expectativa de vida feminina durante o século passado. Em 1900, a expectativa de vida feminina era de 54 anos, já hoje, as mulheres podem viver em média 83 anos em países industrializados (Singh et al., 1996). Por outro lado, a idade da menopausa espontânea permaneceu estável em aproximadamente 50 anos de idade como era no passado. O fato de que agora as mulheres podem viver mais de um terço de suas vidas após a menopausa novas pesquisas foram incentivadas a fim de descobrir novas maneiras de prevenir os efeitos deletérios da

menopausa que comprometem a qualidade de vida dessas mulheres. (Sherwin, 2003; Strauss e Barbieri, 2004).

A senescência ovariana é um processo gradual que começa em torno dos 35 anos de idade e que culmina na menopausa por volta dos 51 anos de idade. Esse declínio na função ovariana é evidenciado por uma diminuição progressiva na fecundidade e aumento de falhas e irregularidades menstruais na segunda metade da quarta década de vida e dos anos que seguem (Al-Azzawi e Palacios, 2009).

Várias reclamações que levam mulheres na menopausa a procurar por um tratamento são de origem neurológica. Há vários debates em andamento e uma clara falta de consenso se a terapia hormonal (TH) (usualmente contendo estrogênios) poderia ter algum papel na função cognitiva ou na prevenção de declínio cognitivo em mulheres após a menopausa (Sherwin, 2003). A razão para a qual esse tema ainda está sendo investigado, apesar de evidências contrárias, é baseada em vários estudos que vem indicando que os estrogênios positivamente afetam a maioria dos mecanismos implicados no acelerado envelhecimento cognitivo e demência, como por exemplo, no estresse oxidativo, perda sináptica e/ou dendrítica, declínio na função neurotransmissora e apoptose (Hogervorst e Bandelow, 2010).

Estudos têm demonstrado que a terapia estrogênica ou estro-progestativa pode proteger contra a piora da cognição, reduzir o risco da doença de Alzheimer, e ainda que, as usuárias desses hormônios têm desempenho melhor do que as não-usuárias nos testes de memória verbal, espacial e memória de trabalho além de outras funções cognitivas (Duff e Hampson, 2000; Resnick e Henderson, 2002; Maki, 2006). No entanto, resultados do WHIMS (*Women's Health Initiative Memory Study*) indicaram que regimes de TH consistindo de administração crônica de estrogênios equinos conjugados sozinhos ou em conjunto com medroxiprogesterona não melhoram a cognição (Coker et al., 2010). Porém, as mulheres desse estudo apresentavam idade acima de 65 anos ou mais (média de 73 anos), ou seja, o início da intervenção terapêutica deu-se tardiamente.

Vários estudos sugerem que a falta de um consenso sobre os efeitos dos estrogênios na cognição decorrem do fato que os efeitos da TH podem variar de acordo com o tipo de memória avaliada, dosagem, via de administração, periodicidade da reposição hormonal utilizada e da idade da mulher quanto foi iniciada a TH (Korol, 2004).

Na tentativa de esclarecer melhor o papel do estrogênio na cognição, uma importante ferramenta utilizada é o modelo de roedores que são particularmente úteis tanto para o paradigma de memória, quanto na observação da privação/reposição de estrogênio. Similar aos seres humanos (Moffat et al., 2001), roedores machos e fêmeas exibem declínios na memória espacial dependente de hipocampo relacionado à idade (Frick et al., 1995; Markowska, 1999). Além disso, roedores fêmeas, apesar de não exibirem uma menopausa verdadeira, têm seu pool de folículos ovarianos reduzido ao longo da vida (similar ao observado em humanos). Ainda, através da remoção de seus ovários, esses animais, em geral, são amplamente utilizados como modelos para estudo de alterações fisiológicas decorrentes da privação hormonal (McAsey et al., 2006; Walf et al., 2006; Wallace et al., 2006), pois apresentam redução da habilidade cognitiva após ovariectomia (Sherwin, 1994).

Adams et al (2001) e Miranda et al (1999) mostraram que em ratas fêmeas jovens e envelhecidas, o estrogênio aumenta a densidade de espinhas dendríticas no hipocampo, que declina com envelhecimento e com a privação de estrogênio. Ainda outros autores demonstraram que reposição hormonal em ratas aumenta a neurogênese e diminui a morte celular no hipocampo (Barker e Galea, 2008) e melhora significativamente o desempenho em tarefas de memória espacial e de memória de objetos (Inagaki et al., 2010).

1.4. Proteínas marcadoras de ativação neuronal

Uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada para acessar os circuitos neurais alterados durante a aprendizagem e memória é a expressão de genes que são rapidamente transcritos e, particularmente, fatores de transcrição e genes de expressão imediata (IEGs).

IEGs são ativados nos neurônios por vários segundo - mensageiros que iniciam sua transcrição. Um desses IEGs é o proto-oncogene c-Fos . Nos últimos anos, vários estudos usando diferentes modelos animais têm demonstrado uma associação entre aumento na expressão de c-Fos e processos de aprendizado e memória. Esses estudos sugerem que a ativação de c-Fos pode ser usada como um

marcador de atividade neuronal, fornecendo informações importantes a respeito das regiões cerebrais ativadas durante o aprendizado e a memória (Kaczmarek, 1993).

No estudo de Zhu et al (1996) e Wan et al (1999) a análise da marcação por c-Fos pela técnica de imunohistoquímica revelou diferenças na ativação de determinadas regiões cerebrais durante o reconhecimento de objetos. Durante a apresentação de um objeto familiar a expressão de c-Fos foi menor no córtex perirrinal e temporal, bem como no núcleo geniculado lateral ventral do tálamo, do que durante a apresentação de um novo objeto. Outros estudos também demonstraram ativação de c-Fos na amígdala após condicionamento ao medo (McGregor et al., 2004) e no hipocampo após condicionamento ao medo contextual (Strekalova et al., 2003).

Considerando que: (1) a retenção de memórias de longa duração necessita de modificações duradouras nas conexões neuronais, a maioria em decorrência da ativação de programas de expressão gênica que levam à plasticidade sináptica que (2) os hormônios femininos, em especial o estradiol, agem em áreas cerebrais relacionadas ao aprendizado e memória de maneira a produzirem alterações plásticas e que (3) mulheres na menopausa apresentam prejuízos cognitivos, nossa hipótese é de que a ativação de áreas do lobo temporal, avaliada através da expressão de c-Fos, durante a aquisição de uma memória declarativa difere em fêmeas expostas a diferentes níveis circulantes de esteróides ovarianos.

2. JUSTIFICATIVA

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial. No Brasil, o aumento da população idosa será da ordem de 15 vezes entre 1950 e 2025, enquanto o da população como um todo será de não mais que cinco vezes no mesmo período (Kalache et al, 1987, 2007).

A menopausa está associada com a perda da memória (Henderson, 1997) sendo que, cerca de 60% das mulheres no período perimenopáusico apresentam piora da memória, com dificuldades de lembrar palavras, números, esquecer eventos e atos praticados, sendo muito freqüentes as queixas de dificuldade de concentração (Silva e De Sá, 2006).

Efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal na cognição têm sido relatados tanto em humanos quanto em animais. Estudos longitudinais têm demonstrado que mulheres usuárias de estrogênios apresentaram menor declínio cognitivo ao longo do tempo em relação àquelas que nunca usaram (Matthews et al., 1999; Yaffe et al., 2000) e ainda que essas usuárias têm melhor desempenho em tarefas de memória verbal (Jacobs et al., 1998), fluência verbal (Rice et al., 2000) e memória visual (Resnick et al., 1997).

Em relação a estudos em animais, Packard et al (1997), Luine et al (2003) e Rhodes e Frye (2006) confirmaram o efeito do estradiol na melhora da memória utilizando tarefas de memória espacial ou de um novo objeto.

Apesar de muitos estudos demonstrarem o efeito do estrogênio em paradigmas comportamentais, ainda não está completamente elucidado que regiões cerebrais estão envolvidas nas alterações cognitivas promovidas pela privação e/ou reposição hormonal. Além disso, os benefícios da terapia hormonal com estrogênio sobre a cognição ainda são controversos, assim como não se sabe quais os mecanismos de ação envolvidos nesses processos. Logo, com este projeto, poderemos identificar regiões cerebrais recrutadas durante as modificações cognitivas que ocorrem com a privação e/ou reposição de hormônios ovarianos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da privação e/ou reposição de hormônios ovarianos sobre a memória re reconhecimento de objetos, bem como sobre a ativação de regiões do lobo temporal durante o armazenamento desta memória.

3.2. Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da duração da privação hormonal sobre a memória de reconhecimento de objetos;
2. Verificar se a reposição hormonal é capaz de reverter os efeitos deletérios da privação hormonal sobre a memória de reconhecimento de objetos;
3. Verificar a expressão de c-Fos no cérebro de fêmeas ovariectomizadas por doze semanas e submetidas à tarefa de reconhecimento de objetos;
4. Verificar o efeito da reposição hormonal sobre a expressão de c-Fos em fêmeas tratadas com 17β -estradiol e submetidas à tarefa de reconhecimento de objetos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL6 fêmeas, de dois meses de idade, fornecidas pelo biotério central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo cinco animais por gaiola) dentro de estante ventilada, com temperatura constante de 22 ± 1 °C, umidade 40-70% e controle do ciclo claro-escuro 12/12 horas, com alimento e água *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo no 035/2009.

4.2. Cirurgia de Ovariectomia / Sham

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg peso) e xilazina (10mg/Kg peso) por via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região média entre a última costela e a coxa do animal. O ovário foi identificado e somente exposto no caso dos animais sham, e no caso dos animais ovariectomizados, o ovário foi exposto e removido. A pele foi posteriormente suturada. Esse procedimento cirúrgico foi realizado bilateralmente em cada animal. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de Banamine 0,3mg/kg (analgésico e anti-inflamatório) e os mesmos tiveram pelo menos uma semana para se recuperarem da cirurgia.

4.3. Cirurgia de implante subcutâneo

Após doze semanas da cirurgia de ovariectomia/Sham, um grupo de animais recebeu implantes subcutâneos contendo 0,18mg de 17- β estradiol (E2) diluído em óleo de milho ou somente óleo (controle), durante cinco semanas (Heikkinen et al, 2004). O implante consiste de um tubo de silicone (Figura 4.1) poroso de dimensões:

19 mm de comprimento, diâmetro interno (DI) 1,02 mm e diâmetro externo (DE) 2,16 mm (Andrews, Advis e Ojeda, 1981) fechado em suas extremidades com dois parafusos (7 mm de comprimento cada) de aço inox.

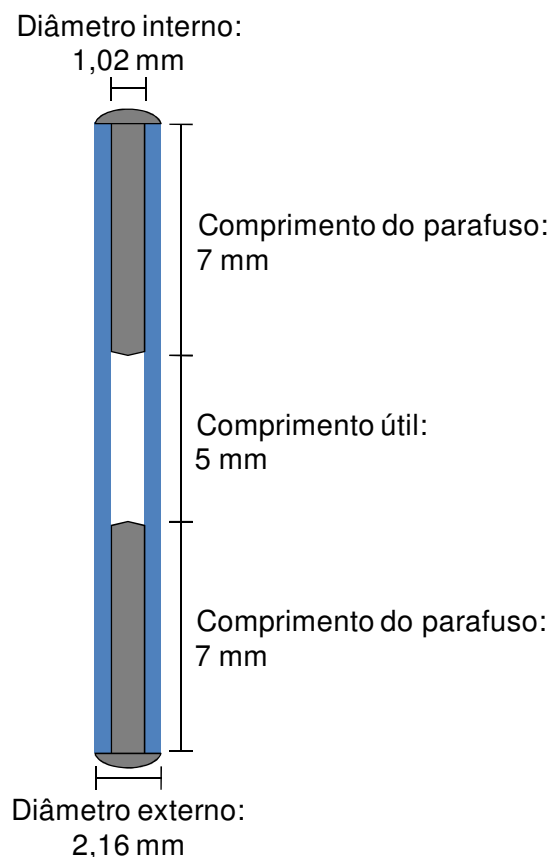


Figura 4.1 - Implante subcutâneo.

Foi calculado o volume para os 5 mm do comprimento útil, para ser preenchido com estradiol ou óleo, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Volume} = \frac{\pi DI^2}{4} \cdot \text{Comprimento útil do tubo} \quad (1)$$

Como resultado do cálculo foi obtido um volume de 4 μ l. Então para cada cápsula foram colocados 0,18 mg em 4 μ l.

Para a colocação dos implantes nos animais, os mesmos receberam anestesia com quetamina (100 mg/Kg peso) e xilazina (10 mg/Kg peso) por via intraperitoneal. Foi feita a tricotomia da região do dorso do animal, em seguida uma pequena incisão e o implante foi colocado na região entre as escápulas (Figura 4.2). Posteriormente

a pele foi suturada. Após a cirurgia os animais receberam uma dose única de Banamine 0,3 mg/kg e os mesmos tiveram pelo menos uma semana para se recuperarem da cirurgia.

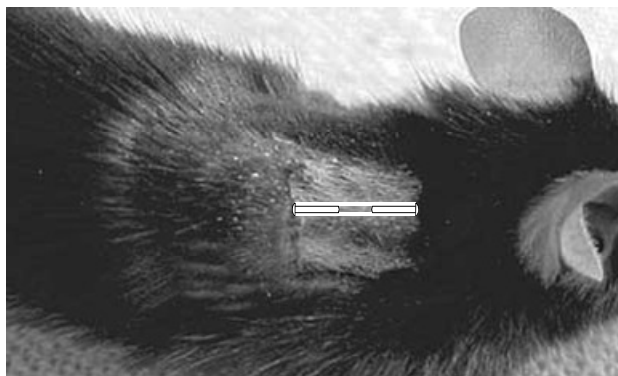


Figura 4.2 – Foto representativa indicando o local de implante da cápsula de reposição hormonal.

Todos os animais que passaram pelo protocolo de reposição hormonal, ao término dos experimentos, foram sacrificados, os úteros foram pesados em balança semi-analítica para controle tanto da eficiência da cirurgia de ovariectomia quanto da reposição hormonal, o sangue foi coletado (método de decapitação), centrifugado o plasma foi recolhido e armazenado a -20°C para posterior dosagem de estradiol.

4.4. Padronização da Terapia de Reposição Hormonal

Como o tubo de silicone para a reposição hormonal não possui uma taxa de liberação constante, foi feito um teste piloto para investigar se haveria hormônio ainda sendo liberado até a quinta semana após o implante do mesmo.

Foram utilizados quarenta camundongos fêmeas C57BL6 com idade de oito semanas de idade. Esses animais foram ovariectomizados (como já descrito anteriormente) e tiveram uma semana para recuperarem da cirurgia. Após esse período, os animais foram submetidos a um novo procedimento cirúrgico para implantação dos tubos de silicone para reposição hormonal, como já descrito anteriormente.

Os animais foram divididos em cinco grupos, cada um deles foi composto de oito animais, sendo quatro com implantes de E2 (0,18mg por cápsula) e quatro com implantes contendo óleo. Os grupos foram sacrificados de um a cinco semanas após o implante dos tubos, sendo cada grupo sacrificado uma semana após o outro. Os úteros foram pesados, o sangue foi coletado (método de decapitação), centrifugado e o plasma foi colhido e armazenado a -20°C para posterior dosagem de estradiol.

4.5. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto – análise comportamental

Cinco dias antes do início da tarefa, os animais foram manuseados diariamente por cinco minutos, para que se habituassem ao experimentador. No dia do experimento, as gaiolas dos animais foram colocadas na sala de comportamento, para que os animais se habituassem ao ambiente, trinta minutos antes do início da tarefa.

A tarefa de reconhecimento de um novo objeto (RO) consistiu de três etapas: habituação, treino e teste, todas com duração de dez minutos cada e intervalo de vinte e quatro horas entre as mesmas (Figura 4.3).

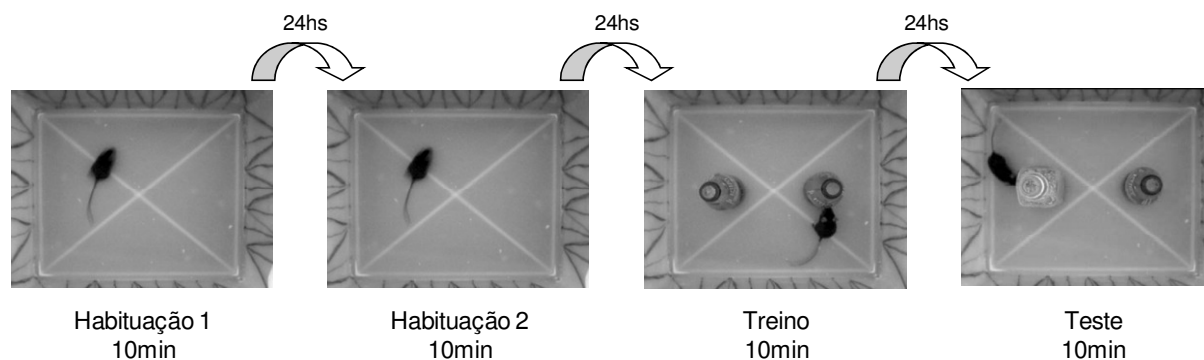


Figura 4.3 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto. Etapas: habituação, treino e teste.

Foram realizados dois dias de habituação ao contexto, onde cada animal foi colocado numa caixa vazia retangular (50cmX40cm) para livre exploração. No treino, os animais foram expostos ao mesmo contexto, porém na presença de dois objetos idênticos colocados dentro da caixa. Na sessão de teste, um dos objetos foi

substituído por um objeto novo. Entre um animal e outro, os objetos e a caixa foram limpos com álcool 70%. O tempo de exploração dos objetos foi mensurado, sendo este considerado quando o animal tocava o objeto com as vibrissas ou focinho. Todas as etapas de cada animal foram filmadas utilizando o programa Debut Video Capture e os vídeos foram editados utilizando o programa VideoPad Video.

Em uma mesma sessão foram usados objetos do mesmo material (vidro ou plástico), para que os animais não os discriminassem através de pistas olfativas, mas com diferentes formas. Os objetos utilizados na tarefa foram criteriosamente selecionados, para evitar a preferência inata dos animais por um material ou objeto particular.

Os resultados das sessões de treino e de teste da tarefa de reconhecimento de um novo objeto foram expressos em índice de reconhecimento calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo}}{\text{Tempo total de exploração dos dois objetos}} \quad (2)$$

Os valores obtidos estão dentro do intervalo de 0 a 1. Um valor igual a 0,5 indica que o tempo de exploração dos dois objetos foi o mesmo e valores acima de 0,5 indicam uma preferência pelo objeto novo.

4.5.1. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto – análise imunohistoquímica

Utilizamos outro grupo de animais para realizar o protocolo de imunohistoquímica, onde os camundongos foram submetidos somente a primeira e segunda fase da tarefa de reconhecimento de um novo objeto. Foram realizados dois dias de habituação ao contexto e no treino, os animais foram expostos ao mesmo contexto, porém na presença de dois objetos idênticos, como descrito anteriormente.

Esse protocolo avaliou a expressão de c-Fos em substratos neurais importantes para a memória e que são impactadas por efeitos dos hormônios femininos e a

correlação do tempo de exploração dos objetos e a expressão de c-Fos, relacionando a entrada direta de informações e a ativação de áreas cerebrais.

4.6. Imunohistoquímica

Uma hora e meia após a fase de treino da tarefa de reconhecimento de um novo objeto (como descrito anteriormente), os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg peso) e xilazina (10mg/Kg peso) e então submetidos à perfusão trans-cardíaca por três minutos com 20ml de tampão fosfato salina (PBS) 0,01M, seguido de sete minutos com 50ml de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) em tampão fosfato 0,01M. Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma bomba de perfusão, com fluxo controlado a 6 ml/minuto.

Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados em PFA 4% por doze horas a 4°C. Após esse período, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose 30% diluída em PBS 0,01M a 4°C e mantidos nesta solução até a saturação (tempo de saturação estimado em 48 horas).

Antes da realização dos cortes, os cérebros foram congelados em isopentana 99%, mantidos numa temperatura entre - 45°C e - 50°C, durante um minuto. Logo após o congelamento, os cérebros foram cortados no criostato modelo 300. Utilizando como referência Paxinos e Franklin (Paxinos e Frankling, 1997) foram realizados cortes coronais com espessura de 40µm desde a coordenada do Bregma -1,06 mm até Bregma – 2,80mm, tomando como referência o início e o final do hipocampo. Os cortes foram armazenados em solução crioprotetora (500 ml tampão fosfato 0,01M, 300 gramas de sacarose, 10 gramas de polivinilpirrolidona, 300ml etilenoglicol, ajustar solução para um litro de água mili-Q) a - 20°C, até a realização da Imunohistoquímica (Watson et al., 1986).

A técnica de Imunohistoquímica foi utilizada para verificar a expressão da proteína c-Fos (Radwanska et al., 2006), utilizando o método *free-floating*. Os cortes foram lavados por três vezes (seis minutos cada) em TBS (tampão Tris salina) 0,01M (24 gramas de Trizma base, 29 gramas de NaCl, completar para um litro de água Mili-Q) para a remoção da solução crioprotetora e posteriormente foram incubados com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) diluído em TBS 0,01M por dez minutos. Em seguida, os cortes foram lavados novamente com TBS 0,01M por três

vezes (seis minutos cada), colocados em solução de bloqueio, utilizando soro NGS (*normal goat serum*) 3% em TBS 0,01M por duas horas e então incubados com o anticorpo primário c-Fos (Santa Cruz, sc-52) na concentração de 1:1000, por pelo menos doze horas e à temperatura ambiente.

No dia seguinte, os cortes foram lavados com TBS-T (0,3% Triton X-100 em TBS 0,01M) por três vezes (seis minutos cada) e posteriormente incubados com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (feito em cabra - Vector laboratórios) em TBS-T na concentração de 1:1000 por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados novamente por três vezes (seis minutos cada) em TBS-T e incubados com o complexo formado pelos reagentes A (avidina DH) e B (peroxidase biotilada) do kit ABC Elite (Vectastain), diluídos 1:500 em TBS-T 0,01M à temperatura ambiente por uma hora. Posteriormente os cortes foram lavados com TBS 0,01M por três vezes (seis minutos cada) e também lavados em tampão acetato (acetato de sódio 0,175M diluído em água deionizada) três vezes por seis minutos. A coloração dos cortes foi feita utilizando uma solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB 0,2mg/ml), sulfato de níquel (25mg/ml) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,083μ/ml de uma solução de H₂O₂ 3%). Após a reação, os cortes foram lavados em tampão acetato.

As fatias foram colocadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas, utilizando entellan.

4.7. Análise de imagens

As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico Axio imager M2, utilizando objetiva com aumento de cinco vezes, e foram tiradas fotos do hipocampo, córtex perirrinal e amígdala para posterior análise. As análises das marcações foram feitas utilizando o programa Image-J.

Para a região do hipocampo foram delimitadas as regiões CA1, CA3 e GD (Figura 4.4 a, b), para a amígdala foram delimitadas as regiões amígdala lateral (LA), amígdala basolateral (BLA) e amígdala central (CeA) (Figura 4.4 c, d) e o córtex perirrinal (Figura 4.4 e, f). Após as delimitações das áreas foi então definida uma faixa limite (*threshold*) entre regiões marcadas e o fundo, compreendendo os cinquenta (50) tons mais escuros em uma escala de 256 tons de cinza. Como

resultado, o fundo era removido, restando apenas marcações, que eram então medidas em relação à área percentual marcada para aquela região delimitada. Foi utilizada uma média de cinco fatias por animal. Inicialmente foi feita uma média das fatias de cada animal e posteriormente foi feita a média das fatias para cada grupo.

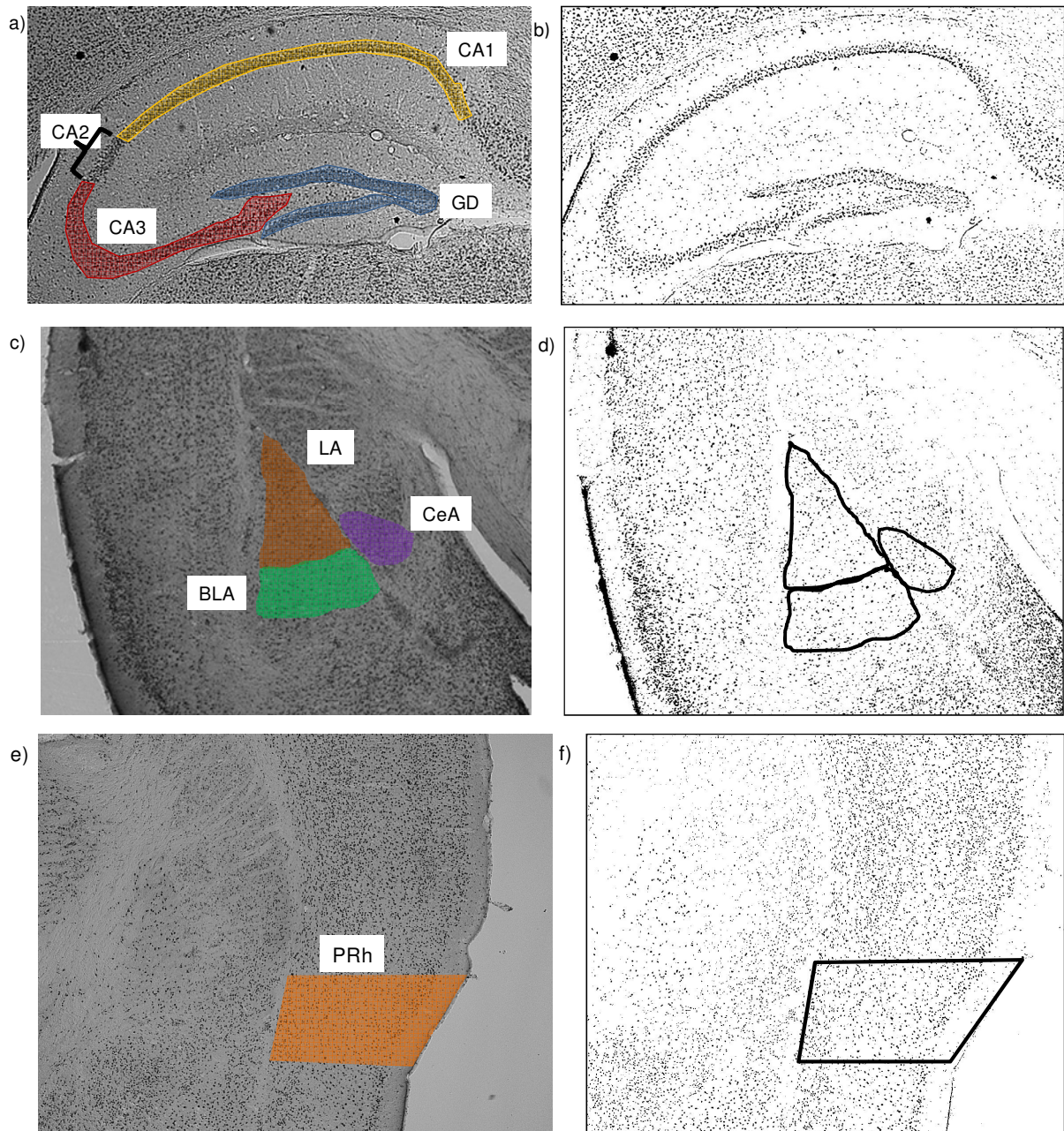


Figura 4.4 – a, b: hipocampo; c, d: amígdala; e, f: córtex perirrinal. Delimitação das regiões marcadas por c-Fos após aplicação da faixa limite (*threshold*).

4.8. Delineamento Experimental

4.8.1. Protocolo 1: Verificar o efeito da duração da privação hormonal sobre a memória de reconhecimento de objetos

No protocolo 1 foram utilizadas dezenove fêmeas C57BL6 com dois meses de idade, as quais foram divididas em dois grupos: sham (submetidas a falsa cirurgia, n=9) e OVX (submetidas a cirurgia de ovariectomia, n=10). Esses animais foram testados na tarefa de reconhecimento de um novo objeto uma, seis e doze semanas após a cirurgia para avaliação cognitiva (Figura 4.5).

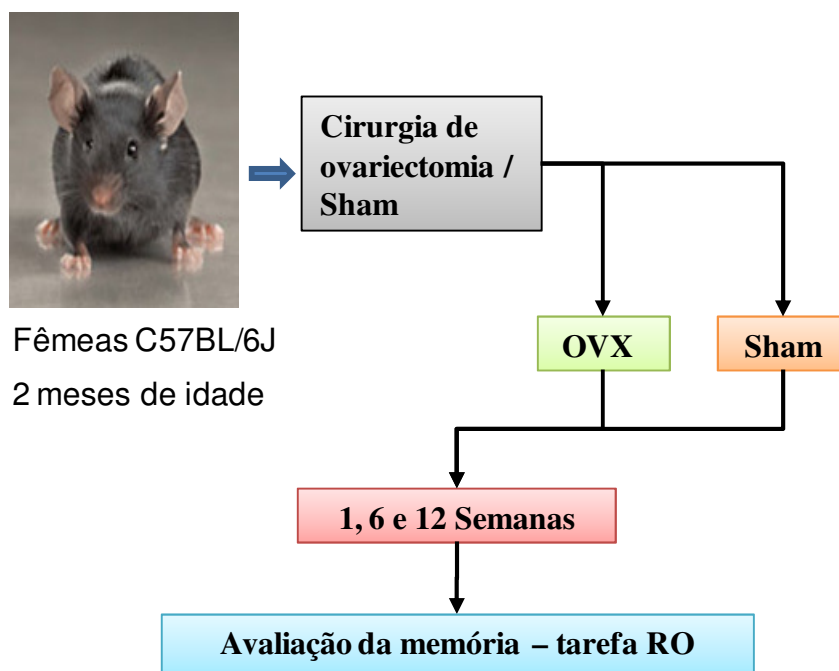


Figura 4.5 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 1.

4.8.2. PROTOCOLO 2: Verificar se a reposição hormonal de 5 semanas reverte o déficit de memória.

No protocolo 2 foram utilizadas trinta e duas fêmeas com dois meses de idade, das quais onze foram submetidas a cirurgia sham (falsa cirurgia) e vinte e uma foram submetidas a ovariectomia. (Figura 4.6).

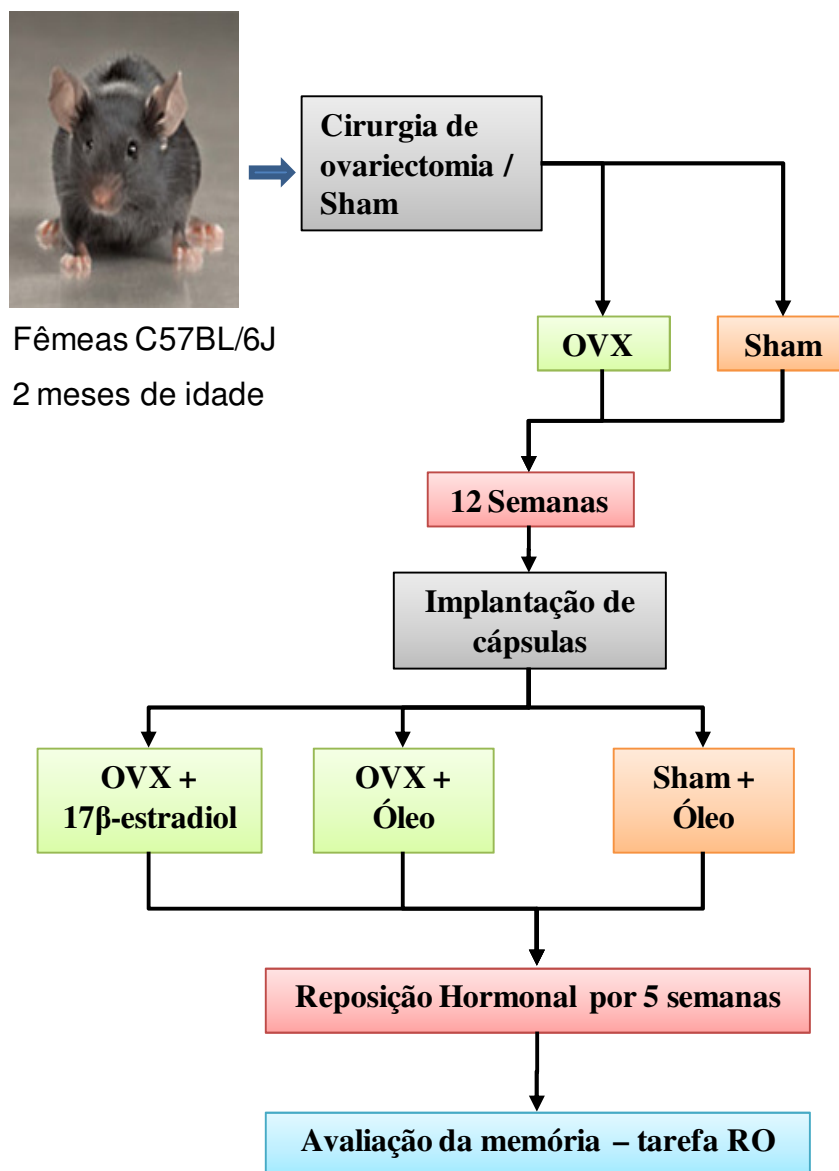


Figura 4.6 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 2.

Doze semanas após a cirurgia os animais foram submetidos a outro procedimento cirúrgico para implantação de cápsulas subcutâneas contendo E2 (0,18mg por cápsula) ou óleo. As fêmeas sham receberam cápsulas de óleo, enquanto as fêmeas ovariectomizadas: onze receberam cápsulas contendo E2 e dez receberam cápsulas de óleo por cinco semanas. Após esse período as mesmas foram testadas na tarefa de reconhecimento de um novo objeto para avaliação cognitiva

4.8.3. PROTOCOLO 3: Verificar a expressão de c-Fos no cérebro de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas.

No protocolo 3 foram utilizadas vinte e quatro fêmeas com dois meses de idade, das quais doze foram submetidas a cirurgia sham (falsa cirurgia) e doze foram submetidas a ovariectomia (Figura 4.7).

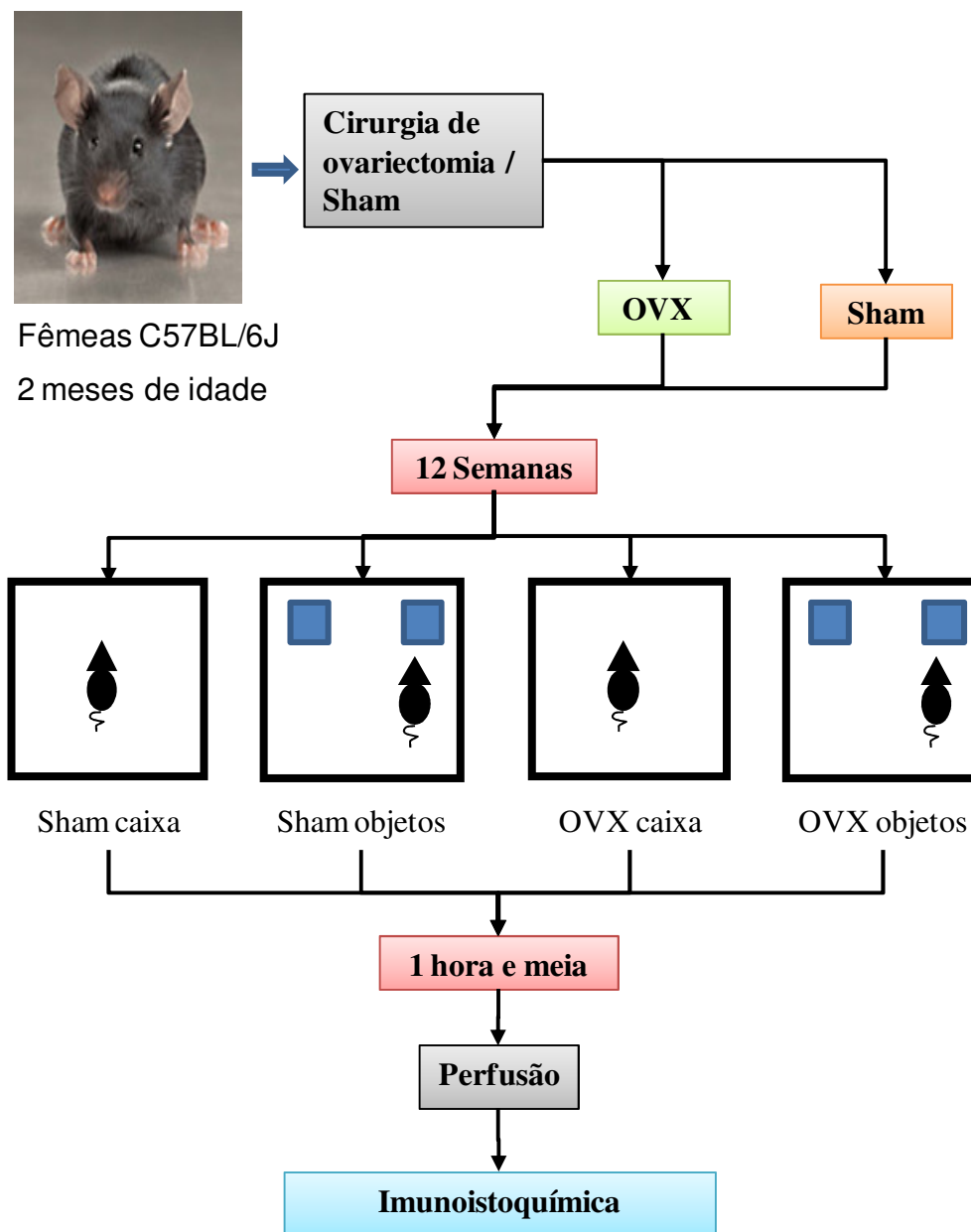


Figura 4.7 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 3.

Doze semanas depois os animais foram submetidos a uma tarefa composta de duas etapas: habituação e treino. Na habituação, cada animal foi colocado em uma caixa retangular vazia (50 cm X 40 cm) para livre exploração durante dez minutos, durante dois dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a habituação foi realizado o treino, no qual os animais dos grupos sham e OVX, foram divididos em dois subgrupos (seis animais cada): animais que exploraram a caixa vazia novamente e animais que exploraram a caixa com dois objetos idênticos, durante 10 minutos. Uma hora e meia após a tarefa os animais foram perfundidos para posteriormente ser realizada a Imunohistoquímica (Figura 4.7).

4.8.4. PROTOCOLO 4: Verificar a expressão de c-Fos no cérebro de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas após terapia de reposição hormonal.

No protocolo 4 foram utilizadas vinte e quatro fêmeas com dois meses de idade, todas submetidas a cirurgia de ovariectomia. Doze semanas após a cirurgia os animais foram submetidos a outro procedimento cirúrgico para implantação de cápsulas subcutâneas. Metade das fêmeas receberam cápsulas de óleo, e a outra metade receberam cápsulas contendo E2 (0,18 mg por cápsula) por cinco semanas. Após esse período os animais foram submetidos mesma tarefa descrita no protocolo 3, sendo que na fase do treino os animais dos grupos OVX óleo e OVX E2, foram divididos em dois subgrupos (seis animais cada): animais que exploraram a mesma caixa vazia novamente e animais que exploraram a caixa com dois objetos idênticos, durante 10 minutos. Uma hora e meia após a tarefa os animais foram perfundidos para posteriormente ser realizada a Imunohistoquímica (Figura 4.8).

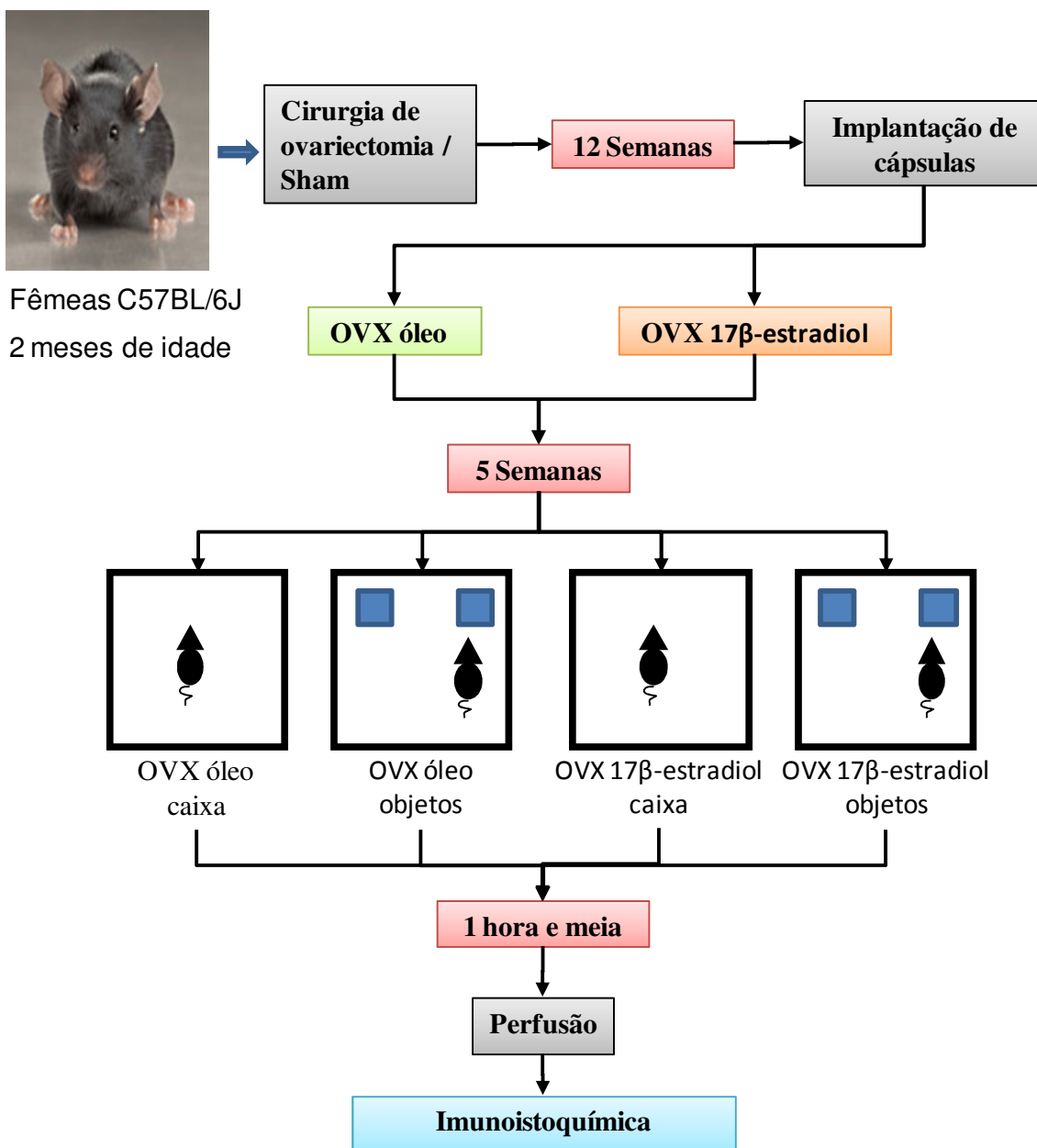


Figura 4.8 – Esquema dos experimentos realizados no Protocolo 4.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cada resultado foi analisado através de testes estatísticos específicos. A seguir são apresentados os testes estatísticos utilizados em cada análise.

- Tarefa de reconhecimento de um novo objeto:

Para comparar os grupos sham e OVX individualmente quanto ao desempenho cognitivo uma, seis e doze semanas após privação de hormônios ovarianos foi utilizado o estatístico Teste-T de uma amostra, no qual os IRs foram comparados com o valor de 0,5.

Para comparar os grupos sham o OVX entre si e ao longo das semanas foi utilizado o teste estatístico ANOVA de duas vias e post-hoc Bonferroni, tendo como fatores a cirurgia sham/OVX e o tempo de privação hormonal.

- Padronização da reposição hormonal:

Primeiramente foi feita uma comparação entre os pesos dos úteros do grupo OVX óleo e OVX E2 de uma a cinco semanas. Para isso foi utilizado o teste estatístico ANOVA de uma via, post-hoc Bonferroni, tendo como fator a presença ou não do estadiol.

Posteriormente foram analisados os pesos dos úteros do grupo OVX E2 em relação ao grupo sham, utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via, post-hoc Dunnett's.

E por fim para avaliar os pesos dos úteros do grupo OVX óleo em relação ao grupo sham foi utilizado o teste estatístico ANOVA de uma via, post-hoc Dunnett's.

- Desempenho cognitivo após reposição hormonal:

Para avaliar o desempenho cognitivo individual dos grupos sham óleo, OVX óleo e OVX E2 após terem submetidos a terapia de reposição hormonal por cinco semanas foi utilizado o teste-T de uma amostra, o qual comparou os IRs com o valor de 0,5.

Para comparar os grupos entre si foi utilizado o teste estatístico ANOVA de uma via, post-hoc Bonferroni.

Para avaliar a eficiência da cirurgia de ovariectomia após terapia de reposição hormonal de cinco semanas seguido de avaliação do desempenho cognitivo, foram comparados os pesos dos úteros dos animais sham óleo, OVX óleo e OVX E2, utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via, post-hoc Dunnetts.

- Expressão de c-Fos :

Para analisar o tempo de exploração dos objetos dos animais após executarem a fase de teste da tarefa de reconhecimento de objetos antes da perfusão, foi utilizado o teste estatístico Teste-T não pareado.

Para analisar a quantificação da marcação de c-Fos na região do hipocampo, córtex perirrinal e amígdala foi utilizado o teste estatístico ANOVA de duas vias e post-hoc Bonferroni, utilizando como fatores a cirurgia sham/OVX e a tarefa (caixa e objetos).

Para analisar a correlação do tempo de exploração dos objetos com a marcação de c-Fos para as regiões do hipocampo, córtex perirrinal e amígdala foi utilizada a correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. Tarefa de reconhecimento de um novo objeto

Para avaliar o efeito do tempo de privação hormonal sobre a memória declarativa episódica verificamos, inicialmente, o desempenho de cada grupo separadamente na tarefa. A análise do desempenho de cada grupo foi feita através do teste-t de uma amostra, usando como referencial o valor de 0,5, ou seja, a média dos valores de cada grupo foi comparada com o valor de 0,5. Logo, IRs (índices de reconhecimento) sendo superiores a 0,5 indica a preferência pelo objeto novo, logo podemos inferir que esta memória está intacta.

Além disso, apesar de todos os animais terem tido a mesma chance de explorar os objetos durante o treino (sessão de dez minutos) precisamos verificar se as intervenções feitas pré-treino não alteraram a capacidade exploratória destes animais. Para isto comparamos o tempo total de exploração durante a sessão de treino entre os grupos.

5.1.1. Uma semana de privação hormonal.

O teste-t de uma amostra revelou que os IRs na sessão de treino não diferiram de 0,5 em ambos os grupos (sham: $t_{(7)}=1,884$, $p=0,1016$ e OVX: $t_{(9)}=2,077$, $p=0,067$) (Figura 5.1, barras claras), logo não houve preferência por um objeto, já que ambos são iguais na sessão de treino. Além disso, não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo total de exploração dos objetos ($t_{(16)}=1,679$, $p=0,1126$) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino da tarefa de reconhecimento de objetos 1, 6 e 12 semanas após cirurgia sham/OVX.

Grupos	Tempo total de exploração (s) *		
	1 semana	6 semanas	12 semanas
Sham	15.66 ± 2.692	34.48 ± 5.788	31.14 ± 5.746
OVX	28.11 ± 6.239	44.46 ± 6.575	35.35 ± 3.142

*Dados expressos como média ± EPM (segundos).

A análise dos IRs durante a sessão de teste revelou que ambos os grupos apresentaram índices de reconhecimento estatisticamente diferentes de 0,5, ou seja, exploraram mais tempo o objeto novo (sham $t(7)=6,775$, $p=0,0003$; OVX $t(9)=15,47$, $p<0,0001$) (Figura 5.1, barras escuras). Nossos resultados mostram que tanto o grupo sham quanto o OVX não apresentaram déficit de memória para esta tarefa, ou seja, uma semana de privação hormonal não é capaz de prejudicar o desempenho na tarefa de reconhecimento de um novo objeto.

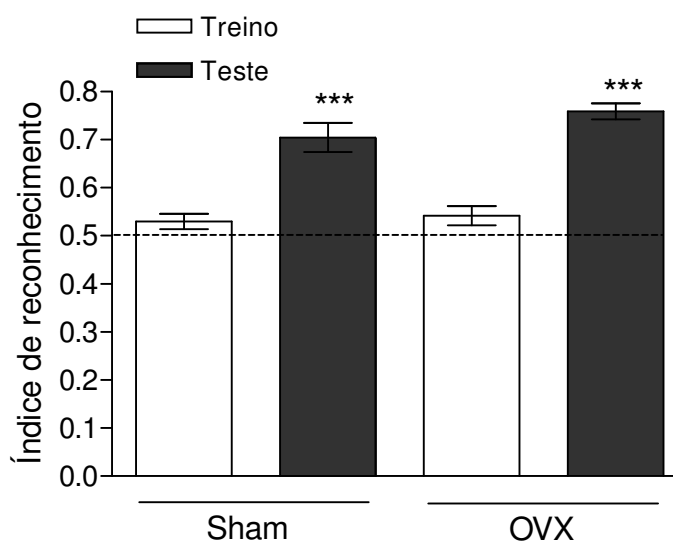


Figura 5.1: Tarefa de reconhecimento de um novo objeto, uma semana após a cirurgia de Ovariectomia (OVX, $n=10$) / Sham ($n=8$). *** $p<0,001$ comparado com 0,5.

5.1.2. Seis semanas de privação hormonal.

O teste-t de uma amostra revelou que os IRs na sessão de treino não diferiram de 0,5 em ambos os grupos (sham: $t_{(8)}=0,6580$, $p=0,52$ e OVX: $t_{(9)}=0,2121$, $p=0,8368$) (Figura 5.2, barras claras), logo não houve preferência por um objeto. Além disso, não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo total de exploração dos objetos ($t_{(17)}=1,228$, $p=0,2749$) (Tabela 5.1).

A análise dos IRs durante a sessão de teste revelou que ambos os grupos apresentaram índices de reconhecimento estatisticamente diferentes de 0,5, ou seja, exploraram mais tempo o objeto novo (sham: $t_{(8)}=4,821$, $p=0,0013$ e OVX: $t_{(9)}=3,959$, $p<0,003$) (Figura 5.2, barras escuras). Nossos resultados mostram que tanto o grupo

sham quanto o OVX não apresentaram déficit de memória para esta tarefa, ou seja, o período de seis semanas de privação hormonal não é capaz de prejudicar o desempenho na tarefa de reconhecimento de um novo objeto.

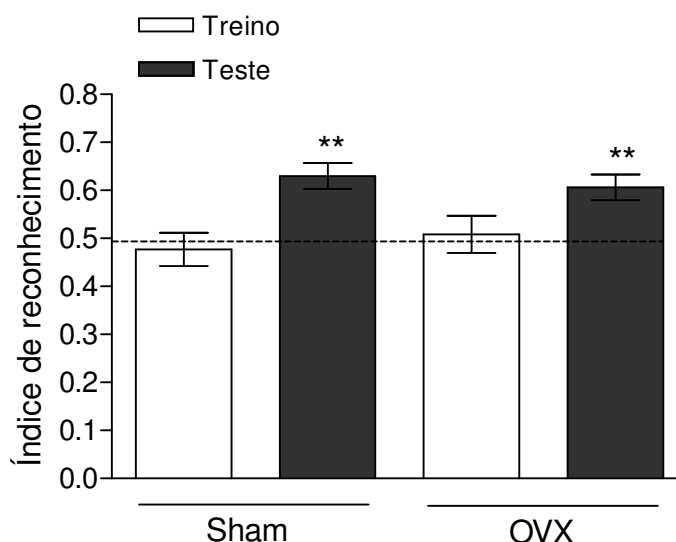


Figura 5.2 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto seis semanas após a cirurgia de Ovariectomia (OVX, n=10) / Sham (n=8). ** $p < 0,01$ comparado com 0,5.

5.1.3. Doze semanas de privação hormonal.

O teste-t de uma amostra revelou que os IRs na sessão de treino não diferiram de 0,5 em ambos os grupos (sham: $t_{(8)}=0,5419$, $p=0,60$ e OVX: $t_{(9)}=0,2917$, $p=0,777$) (Figura 5.3, barras brancas), logo não houve preferência por um objeto. Além disso, não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo total de exploração dos objetos ($t_{(17)}=0,6612$, $p=0,5173$ (Tabela 5.1).

A análise dos IRs durante a sessão de teste revelou que o grupo sham explorou mais tempo o objeto novo ($t_{(8)}=5,9$, $p=0,0004$), enquanto o grupo OVX explorou igualmente os dois objetos ($t_{(9)}=1,338$, $p=0,2139$) (Figura 5.2, barras escuras). Nossos resultados mostram que somente o grupo sham não apresentou déficit de memória para esta tarefa, ou seja, a privação hormonal por doze semanas promove redução no desempenho cognitivo na tarefa de reconhecimento de um novo objeto.

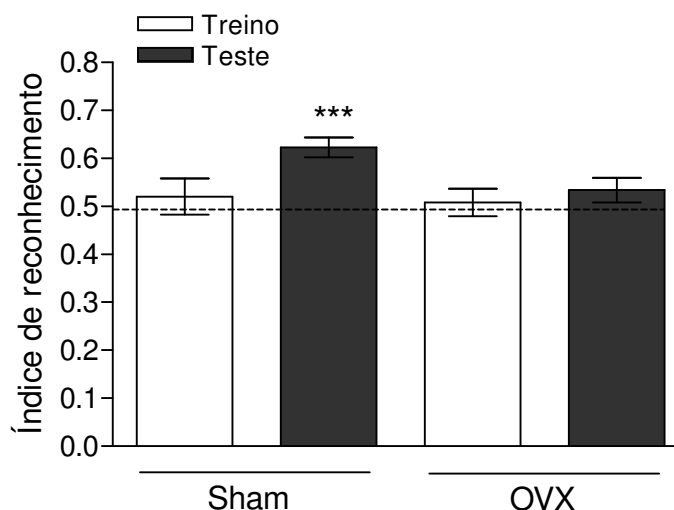


Figura 5.3 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto doze semanas após a cirurgia de ovariectomia (OVX, n=10) / Sham (n=8). Índice de reconhecimento
 *** $p < 0,001$ comparado com 0,5.

5.1.4. Comparação do desempenho cognitivo entre os grupos e ao longo do tempo

Para verificar o efeito da cirurgia e do tempo sobre a tarefa de reconhecimento de objetos, utilizamos ANOVA de duas vias. Observamos uma interação entre os fatores ($F_{(2,50)}=4,199$, $p=0,0206$), que foram, então, separadamente analisados. A ANOVA de medida repetida demonstrou que não houve efeito do tempo sobre o desempenho cognitivo dos animais do grupo sham ($F_{(2,29)}=-33,75$, $P=1,0$) (Figura 5.4, quadrados claros). No entanto, ao analisarmos o grupo OVX, verificamos um efeito do tempo sobre o desempenho cognitivo destes animais ($F_{(2,29)}=24,90$, $P < 0,0001$), sendo os grupos seis e doze semanas estatisticamente diferentes do grupo uma semana ($P < 0,001$) (Figura 5.4, quadrados escuros). A comparação entre os grupos através do teste t revelou que não há diferença entre os grupos uma semana ($t_{(16)}=1,669$, $p=0,1146$) e seis semanas ($t_{(17)}=0,6194$, $p=0,5434$) após a cirurgia. No entanto houve diferença entre os grupos doze semanas pós-cirurgia ($t_{(17)}=2,660$, $p=0,0165$). Nossos resultados mostram que além de somente no grupo OVX ter havido um efeito tempo-dependente da privação

hormonal, doze semanas de privação hormonal são suficientes para prejudicar a memória de reconhecimento de um novo objeto (Figura 5.4).

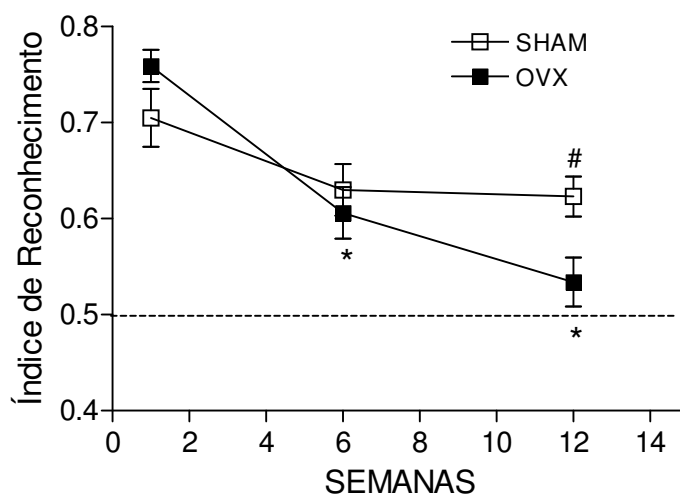


Figura 5.4 – Índices de reconhecimento na sessão de teste de animais sham (n=9) e OVX (n=10) em diferentes tempos pós-cirurgia. * $p < 0,001$ comparado com OVX uma semana e # $p < 0,05$ comparado com grupo sham doze semanas.

5.2. Padronização da reposição hormonal

Antes de avaliar se a terapia de reposição hormonal seria efetiva em reverter o déficit de memória encontrado em fêmeas ovariectomizadas avaliadas doze semanas pós-cirurgia, executamos um protocolo para padronizar a terapia de reposição hormonal através de implantes subcutâneos. Optamos pelo período de cinco semanas de reposição hormonal, já que este período tem mostrado efeitos promnésicos (Xu e Zhang, 2006). A Figura 5.5. mostra os pesos dos úteros dos grupos sham, OVX óleo e OVX E2 ao longo de cinco semanas. Comparando os pesos dos úteros entre os grupos OVX óleo e OVX E2 foi observada diferença estatisticamente significativa para todas as semanas analisadas (uma semana: $t_{(6)}=3,930$, $p=0,007$; duas semanas: $t_{(6)}=4,339$, $p=0,0049$; três semanas: $t_{(6)}=17,66$, $p < 0,0001$; quatro semanas: $t_{(6)}=7,115$, $p < 0,0004$ e cinco semanas: $t_{(6)}=8,617$, $p < 0,0001$). Quando comparamos o grupo OVX óleo, de todas as semanas, com o grupo sham observamos diferença para todos os grupos ($F_{(5,28)}=19,23$, $P < 0,0001$). Ao comparar os grupos OVX E2, de todas as semanas, com o grupo sham foi

observado diferença também para todos os grupos ($F_{(4,24)}=4,641$, $p=0,0082$), exceto para o grupo OVX E2 uma semana.

Nossos resultados mostram que o peso dos úteros do grupo OVX E2 manteve-se constante ao longo das semanas, o que sugere que houve a liberação constante e gradual de estradiol ao longo das cinco semanas.

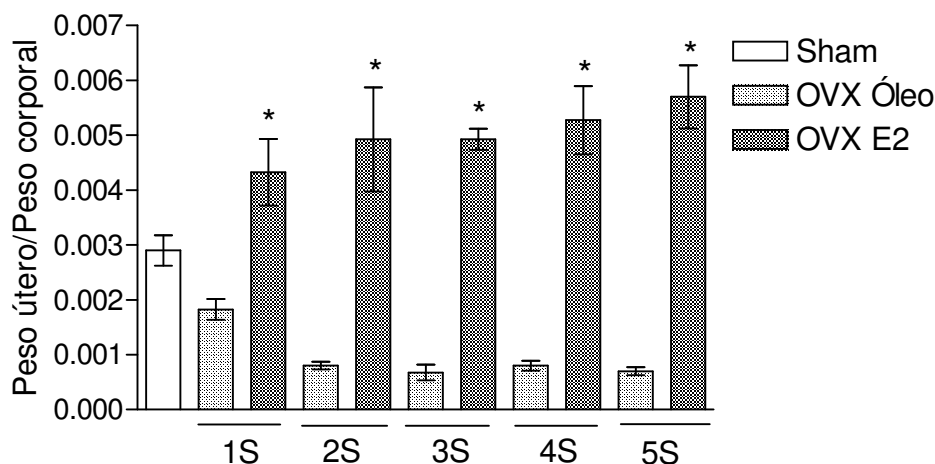


Figura 5.5 - Padronização da reposição hormonal. Acompanhamento do peso do útero ao longo de cinco semanas. Sham (n=9), OVX óleo (n=4) e OVX E2 (n=4).

* $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX óleo.

5.3. Desempenho cognitivo após reposição hormonal

Para verificar se a terapia de reposição hormonal seria capaz de reverter o déficit de memória causado pela privação hormonal, submetemos fêmeas à cirurgia sham ou ovariectomia. Doze semanas depois estas fêmeas receberam implantes contendo óleo (sham óleo e OVX óleo) ou 17- β estradiol (OVX E2) por cinco semanas e então foram submetidas à tarefa de reconhecimento de um novo objeto.

Durante a sessão de treino, nenhum dos grupos apresentou IR diferente de 0,5 (sham: $t_{(11)}=0,9986$, $p=0,3394$; OVX óleo: $t_{(9)}=0,7133$, $p=0,4938$; OVX E2: $t_{(9)}=0,7133$, $p=0,4938$) (Figura 5.6, barras claras). Além disso, não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino ($F_{(2,32)}=0,1319$, $P=0,8769$) (Tabela 5.2).

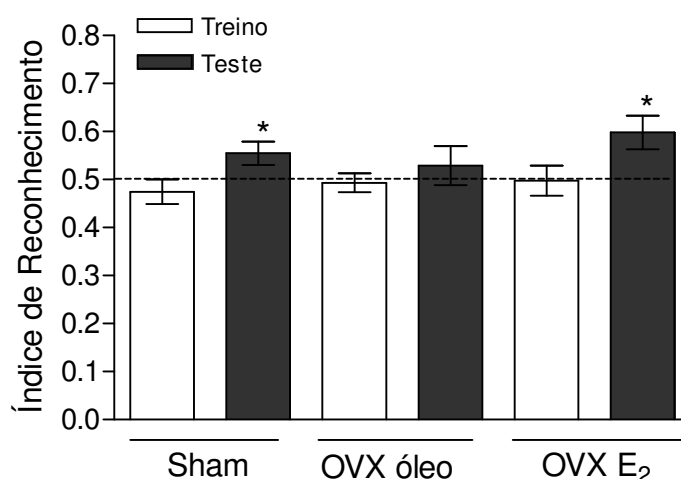


Figura 5.6: Tarefa de reconhecimento de um novo objeto após cinco semanas de reposição hormonal com 17β -estradiol ou óleo após privação hormonal de doze semanas. Sham (n=11), OVX óleo (n=10) e OVX E₂ (n=11). *p<0,05 comparado com 0,5.

Tabela 5.2: Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino da tarefa, após reposição hormonal de cinco semanas.

Grupos	Tempo total de exploração (s) *
Sham	69.23 ± 10.20
OVX óleo	62.45 ± 9.945
OVX E ₂	67.31 ± 7.972

*Dados expressos como média ± EPM (segundos).

Durante a sessão de teste os grupos sham e OVX E₂ exploraram mais tempo o objeto novo (sham: $t_{(11)}=2,242$, $p=0,0465$; OVX E₂: $t_{(10)}=2,808$, $p=0,01$), enquanto o grupo OVX óleo explorou igualmente os dois objetos ($t_{(9)}=0,067$, $p=0,9479$) (Figura 5.6, barras escuras). Apesar do grupo OVX E₂ ter sido capaz de reconhecer o novo objeto, a análise de variância uma via não mostrou diferença estatística entre os grupos ($F_{(2,32)}=1,076$, $p=0,3538$).

Nossos resultados mostram que somente o grupo sham e o grupo OVX E₂ não apresentaram déficit de memória para esta tarefa, ou seja, a reposição hormonal de cinco semanas foi capaz de reverter o déficit de memória causado pela privação hormonal de doze semanas para esse tipo de memória avaliada, apesar do resultado não ter-se mostrado tão robusto (Figura 5.6).

5.3.1. Verificação da eficiência da reposição hormonal após os experimentos comportamentais

Para verificar a eficácia da reposição hormonal durante cinco semanas após término dos experimentos, comparamos os pesos dos úteros dos animais sham, OVX óleo e OVX E2. Foi observada diferença entre os grupos ($F_{(2,26)}=86,13$, $p<0,0001$), sendo todos os grupos diferentes entre si ($P<0.001$) (Figura 5.7).

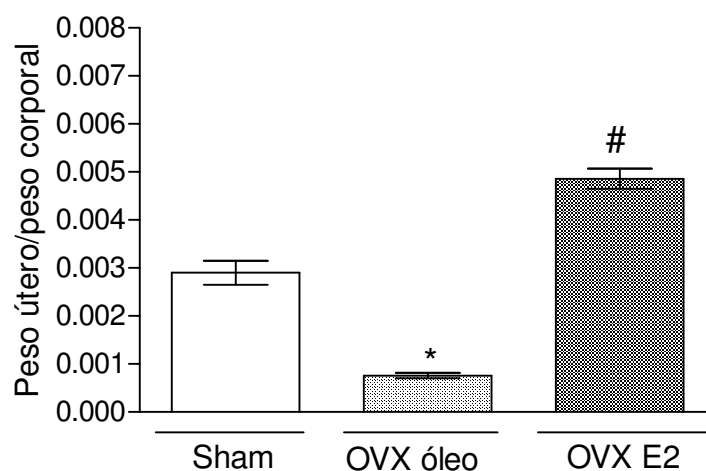


Figura 5.7 - Comparação dos pesos dos úteros após reposição hormonal com 17β-estradiol ou óleo. Sham (n=10), OVX óleo (n=7), OVX E₂ (n=10). * $p<0,001$ (comparado com sham); # $p<0,001$ (comparado com sham e OVX óleo).

Nossos resultados mostram que dezessete semanas de ovariectomia diminuí o peso do útero em comparação ao grupo de animais que ciclaram normalmente (sham). Além disso, a terapia de reposição utilizada em nosso trabalho foi capaz de induzir aumento no peso do útero para valores superiores ao de uma fêmea que está ciclando normalmente (sham), confirmando que a reposição hormonal foi eficiente.

5.4. Expressão de c-Fos após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos em fêmeas submetidas a doze semanas de privação hormonal

Seguindo o objetivo de verificar que substratos neurais estariam envolvidos no déficit de memória induzido pela privação hormonal de doze semanas, avaliamos a expressão de c-Fos, como marcador de atividade neuronal, em resposta ao treino na tarefa de reconhecimento de objetos. Escolhemos substratos neurais recrutados pela tarefa de reconhecimento de objetos, como o hipocampo e o córtex perirrinal. Além disso, também analisamos a expressão de c-Fos na amígdala, que além de fazer parte do conjunto de estruturas do lobo temporal, é uma região altamente relacionada à modulação de memórias.

Não houve diferença entre os animais sham que exploraram os objetos (sham objetos) ($n=5$; $28 \pm 10,19s$) e animais OVX que exploraram os objetos (OVX objetos) ($n=6$; $29,1 \pm 6,52s$) quanto ao tempo total de exploração dos objetos ($t_{(10)}=0,09131$, $p=0,9290$).

5.4.1. Expressão de c-Fos no hipocampo

Para verificar a ativação hipocampal em resposta à sessão de treino na tarefa de reconhecimento de objetos, analisamos a expressão de c-Fos nas regiões CA1 (Figura 5.8 e 5.11), CA3 (Figura 5.9 e 5.11) e GD (Figura 5.10 e 5.11) do hipocampo de fêmeas ovariectomizadas por doze semanas.

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o treino (caixa versus objeto) e a cirurgia (sham versus OVX) mostrou não haver interação entre os fatores ($F(1,16)=1,756$, $P=0,2038$). No entanto, não houve efeito principal nem da cirurgia ($F(1,16)=3,141$, $P=0,0954$), nem do treino ($F(1,16)=0,2213$, $P=0,6444$) na expressão de c-Fos na região CA1 do hipocampo (Figura 5.8).

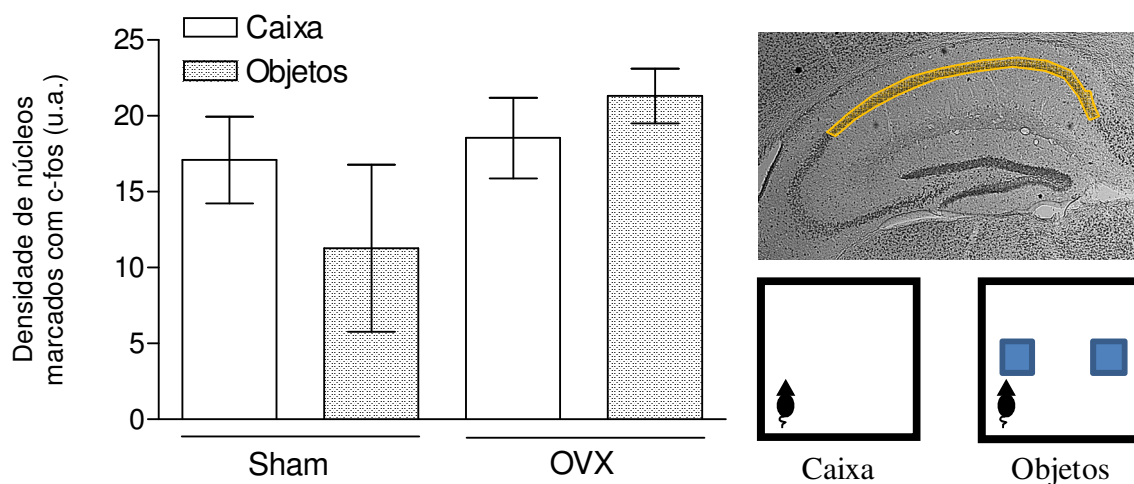


Figura 5.8 - Expressão de c-Fos na região CA1 do hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos.

Sham caixa (n=4), Sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=6).

Não houve interação entre os fatores ($F(1,16)=1,029$, $P=0,3255$) na expressão de c-Fos na região CA3 do hipocampo. Além disso, não houve efeito do treino ($F(1,16)=0,1803$, $P=0,6768$). No entanto, observamos um efeito principal da cirurgia ($F(1,16)=4,814$, $P=0,0433$), apesar da análise post-hoc de Bonferroni não ter mostrado diferença significativa entre os grupos (Figura 5.9).

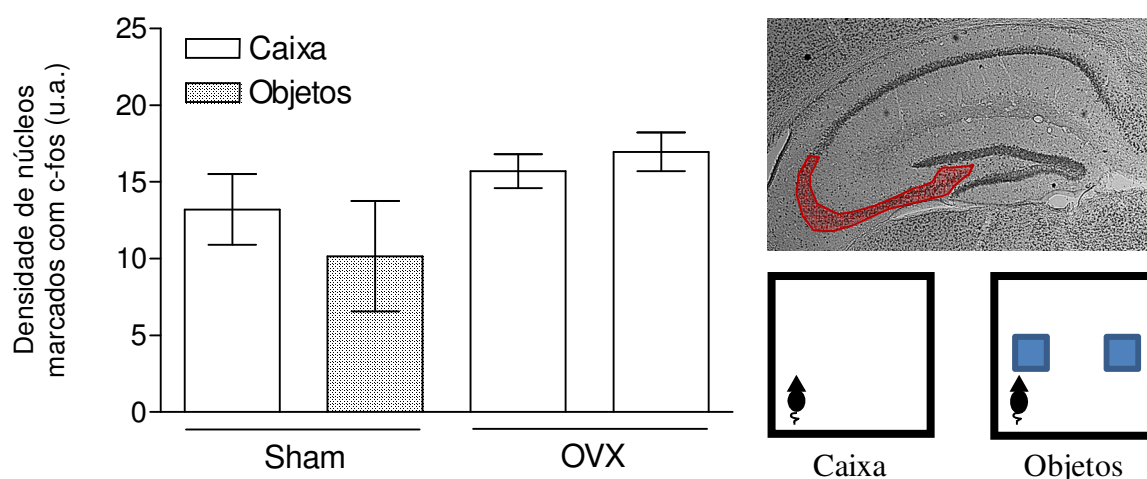


Figura 5.9 - Expressão de c-Fos na região CA3 do hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos.

A análise da expressão de c-Fos no giro denteado (GD) demonstrou uma tendência à interação entre os fatores ($F(1,15)=3,901$, $P=0,0670$), no entanto, não

houve diferença em relação à cirurgia ($F(1,15)=0,2719$, $P=0,6096$) ou ao treino ($F(1,15)=0,1382$, $P=0,7153$) (Figura 5.10).

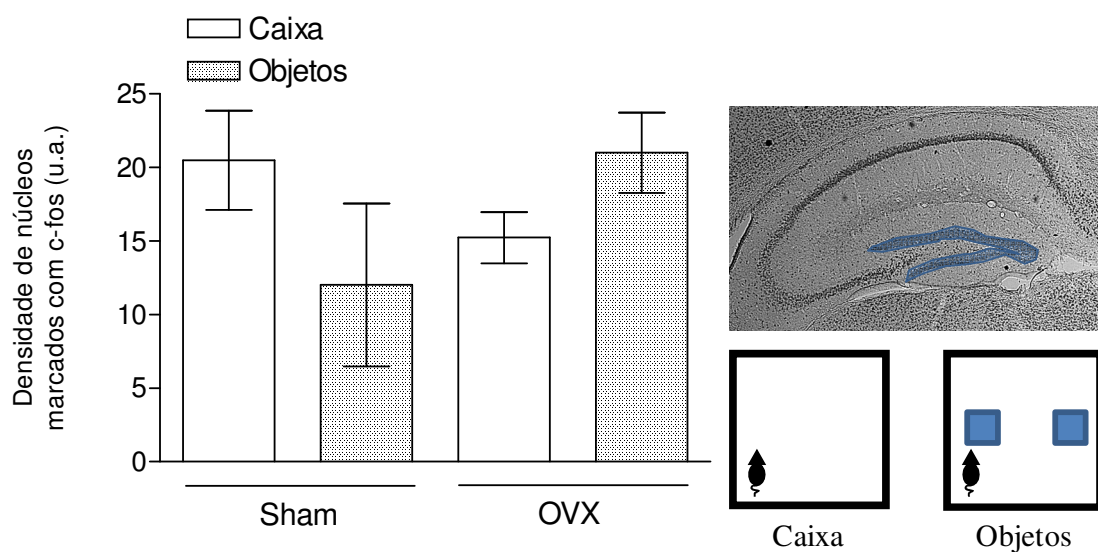


Figura 5.10 - Expressão de c-Fos no giro dentado doze semanas após a cirurgia sham/OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos.

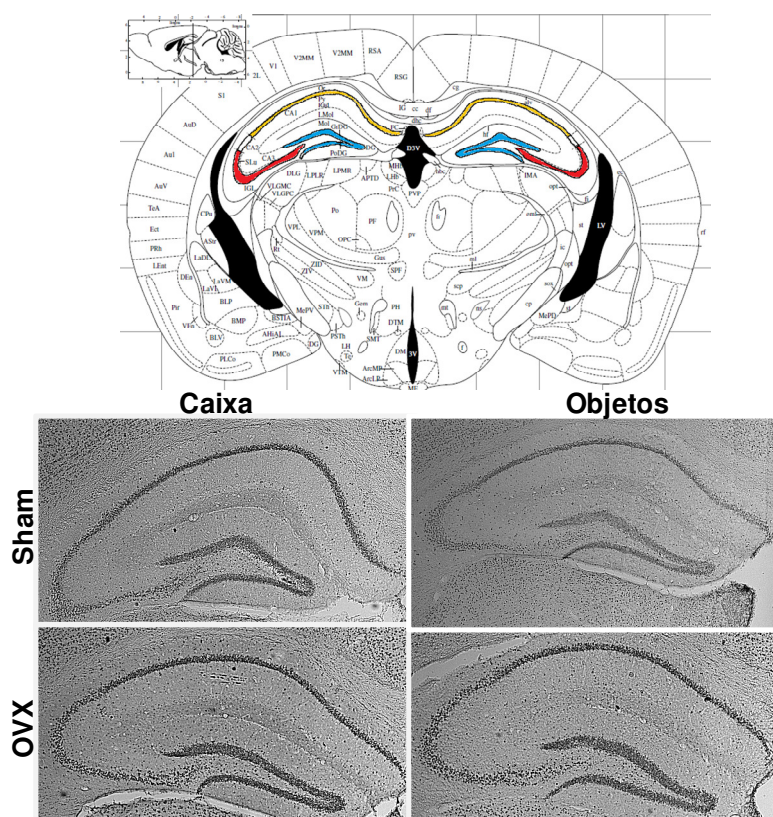


Figura 5.11: Imagens da imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos no hipocampo doze semanas após a cirurgia sham / OVX.

Nossos resultados indicam de uma maneira geral que não houve efeito do treino ou da cirurgia na expressão de c-Fos no hipocampo de camundongos fêmeas normo-ciclistas ou ovariectomizadas por doze semanas. Apesar deste resultado aparentemente negativo, uma das características marcante dos dados foi a alta dispersão dos mesmos. Como nosso objetivo principal era o de relacionar os resultados comportamentais com os de expressão de c-Fos, os animais foram submetidos à sessão de treino, exatamente igual a que utilizamos nos protocolos comportamentais, ou seja, dez minutos totais. Conseqüentemente, apesar de não ter havido diferença quanto à média do tempo total de exploração entre os grupos sham objeto e OVX objeto, nem todos os animais exploraram os objetos a mesma quantidade de tempo. Portanto, decidimos verificar se existe correlação entre o tempo de exploração de objetos e a expressão de c-Fos nos grupos sham e OVX.

5.4.2. Correlação entre a expressão de c-Fos no hipocampo e o tempo de exploração dos objetos

A Figura 5.12 demonstra que houve correlação entre a expressão de c-Fos em CA1 e o tempo de exploração para os animais sham ($R=0,92$, $p=0,008$), no entanto, não houve correlação para o grupo OVX ($R=0,59$, $p=0,21$).

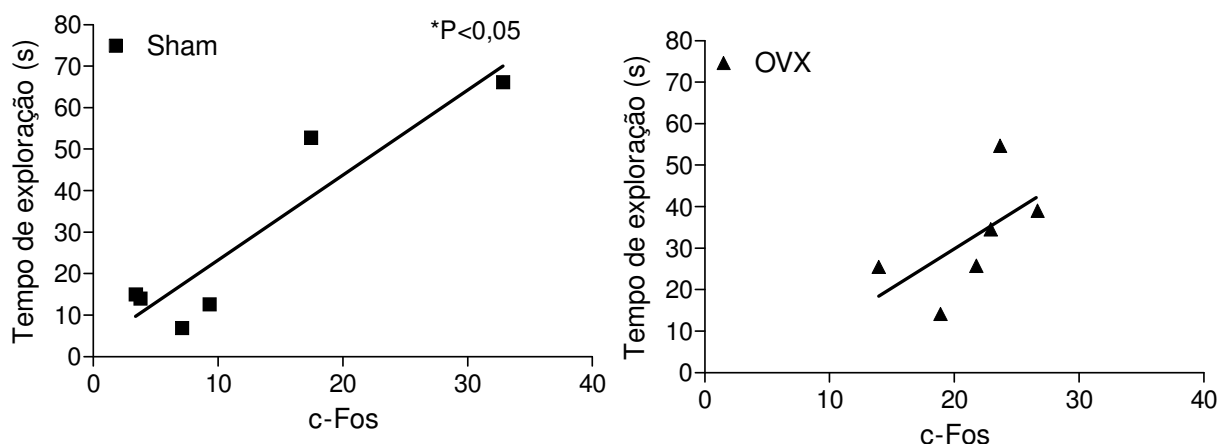


Figura 5.12 - Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CA1 do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX.

Sham (n=6), OVX (n=6), $*p < 0,05$.

Quanto à região CA3 observamos novamente correlação entre expressão de c-Fos e tempo de exploração para o grupo sham ($R=0,86$, $p=0,02$), mas não para o grupo OVX ($R=0,25$, $p=0,62$) (Figura 5.13).

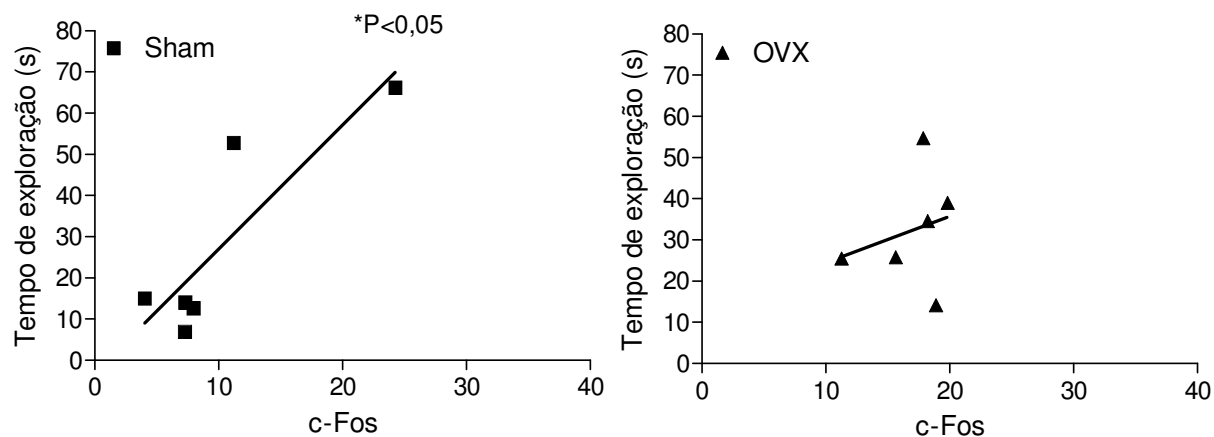


Figura 5.13 - Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CA3 do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham ($n=6$), OVX ($n=6$), $*p < 0,05$.

Já a análise do GD revelou uma tendência à correlação para o grupo sham ($R=0,86$, $p=0,05$), o que não ocorreu no grupo OVX ($R=0,42$, $p=0,39$) (Figura 5.14).

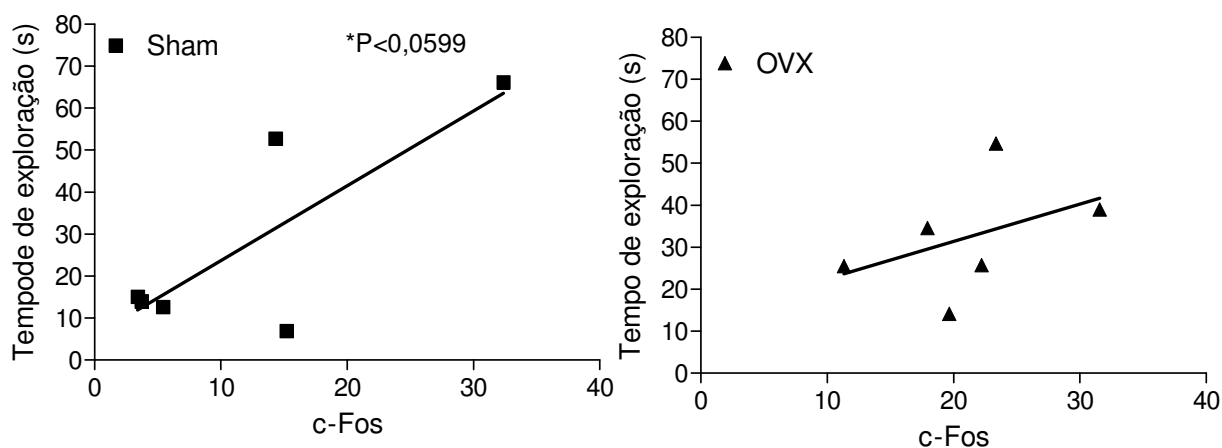


Figura 5.14: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região do giro denteado do hipocampo, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham ($n=5$), OVX ($n=6$).

Em conjunto, nossos resultados mostram que existe uma correlação entre a ativação hipocampal e o tempo de exploração de objetos, apenas no grupo de fêmeas normo-ciclantes, sendo esta correlação ausente nas fêmeas submetidas à privação de hormônios ovarianos durante doze semanas.

5.4.3. Expressão de c-Fos no córtex perirrinal

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o treino (caixa versus objeto) e a cirurgia (sham versus OVX) mostrou não haver interação entre os fatores ($F(1,13)=1,264$, $P=0,28$). Além disso, não houve efeito principal do treino ($F(1,13)=0,627$, $P=0,24$), enquanto a análise do efeito principal da cirurgia revelou uma tendência ($F(1,13)=4,505$, $P=0,05$) (Figura 5.15 e 5.16).

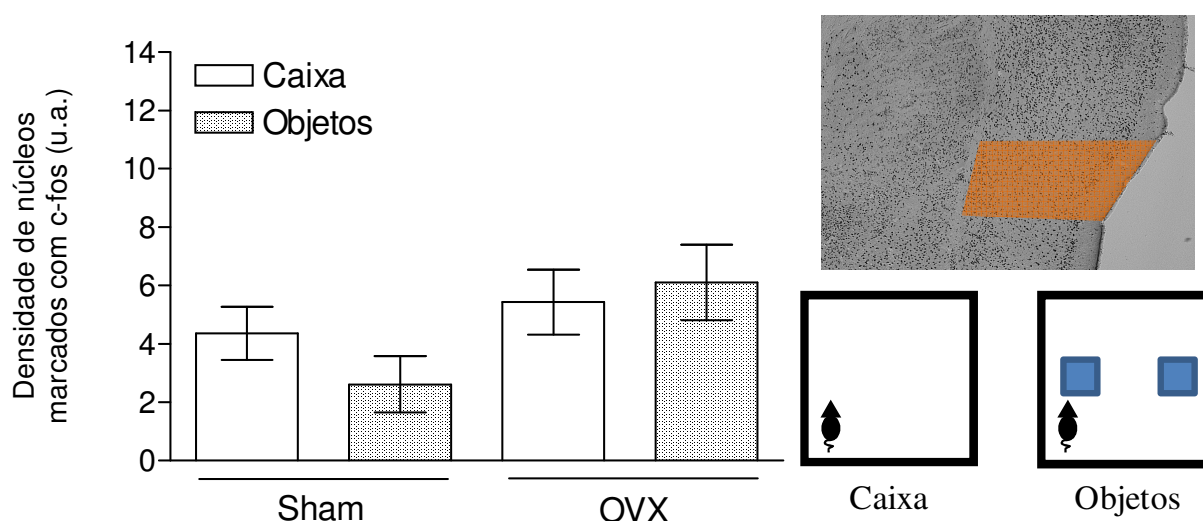


Figura 5.15 - Expressão de c-Fos no córtex perirrinal doze semanas após a cirurgia sham/OVX, uma hora e meia após a exposição à caixa ou aos objetos. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=4).

A Figura 5.17 demonstra que houve correlação entre a expressão de c-Fos no córtex perirrinal e o tempo de exploração nos animais sham ($R=0,95$, $p=0,01$), no entanto, não houve correlação no grupo OVX ($R=0,45$, $p=0,21$).

Nossos resultados mostram que existe uma correlação entre a ativação do córtex perirrinal e o tempo de exploração de objetos, apenas no grupo de fêmeas normociclantes, sendo esta correlação ausente nas fêmeas submetidas à privação de hormônios ovarianos durante doze semanas.

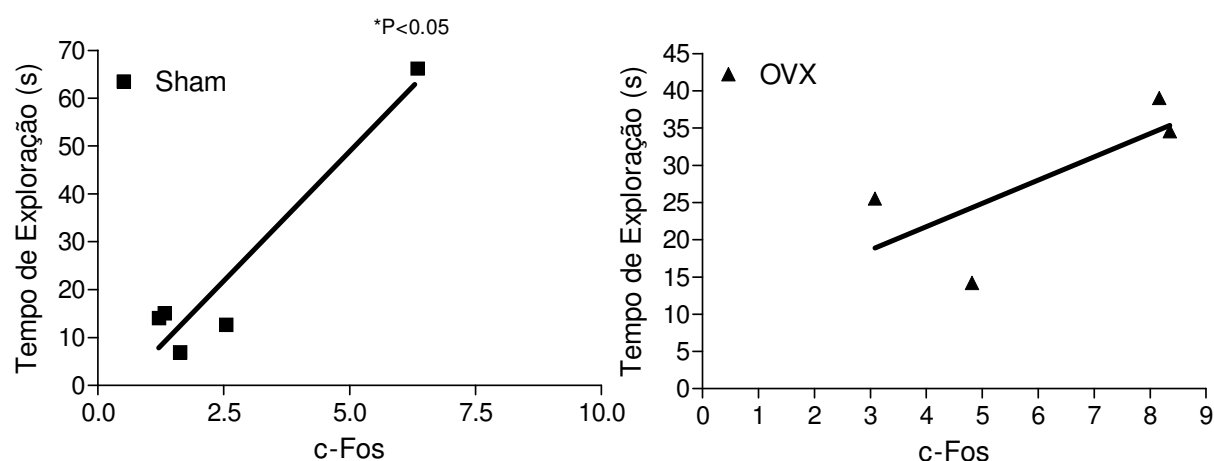


Figura 5.17 - Correlação entre a expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos no córtex perirrinal, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=5), OVX (n=4).

5.4.5. Expressão de c-Fos na amígdala

Para verificar a ativação da amígdala em resposta à sessão de treino na tarefa de reconhecimento de objetos, analisamos a expressão de c-Fos nos núcleos lateral (LA; figura 5.18 e 5.21), basolateral (BLA; figura 5.19 e 5.21) e central (CeA; figura 5.20 e 5.21) da amígdala de fêmeas sham ou ovariectomizadas por doze semanas.

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o treino (caixa versus objeto) e a cirurgia (sham versus OVX) mostrou não haver interação entre os fatores ($F(1,14)=0,74$, $P=0,40$). Além disso, não houve efeito principal nem da cirurgia ($F(1,14)=3,433$, $P=0,08$), nem do treino ($F(1,14)=0,80$, $P=0,38$) na expressão de c-Fos no núcleo LA da amígdala (Figura 5.18).

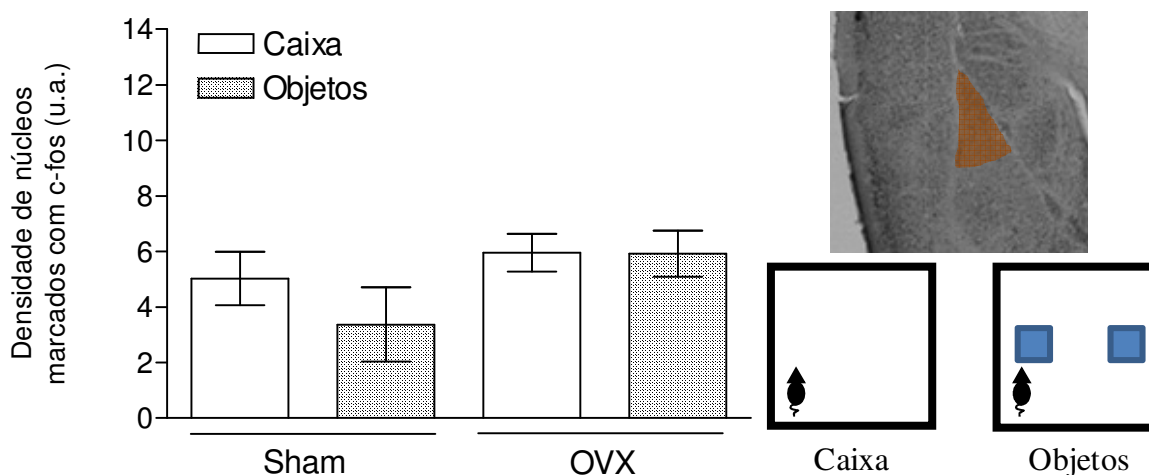


Figura 5.18 - Expressão de c-Fos no núcleo LA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=4).

Não houve interação entre os fatores ($F(1,14)=0,29$, $P=0,59$) na expressão de c-Fos no núcleo BLA da amígdala. Além disso, não houve efeito principal do treino ($F(1,14)=2,10$, $P=0,16$). No entanto, observamos um efeito principal da cirurgia ($F(1,14)=5,41$, $P=0,03$), apesar da análise post-hoc de Bonferroni não ter mostrado diferença significativa entre os grupos (Figura 5.19).

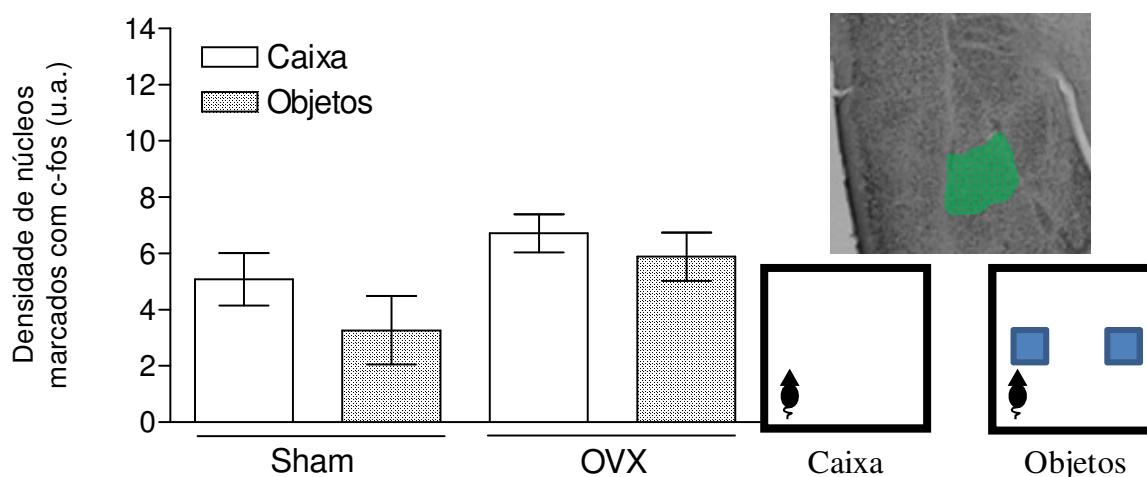


Figura 5.19 - Expressão de c-Fos no núcleo BLA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), sham objetos (n=4), OVX caixa (n=5), OVX objetos (n=5).

A análise da expressão de c-Fos no núcleo central da amígdala (CeA) demonstrou não haver interação entre os fatores ($F(1,14)=0,29$, $P=0,59$). Não observamos efeito principal do treino ($F(1,14)=2,10$, $P=0,16$), no entanto verificamos um efeito principal

da cirurgia ($F(1,14)=5,41$, $P=0,03$), cuja análise post-hoc de Bonferroni revelou haver diferença significativa entre os grupos sham caixa e OVX caixa (Figura 5.20).

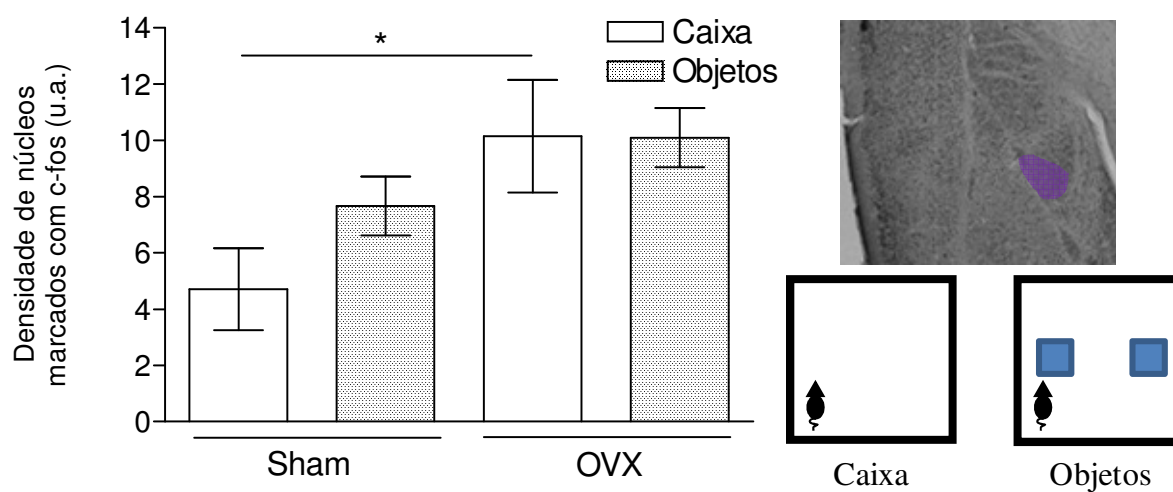


Figura 5.20 - Expressão de c-Fos no núcleo CeA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham caixa (n=4), Sham objetos (n=5), OVX caixa (n=4), OVX objetos (n=5).

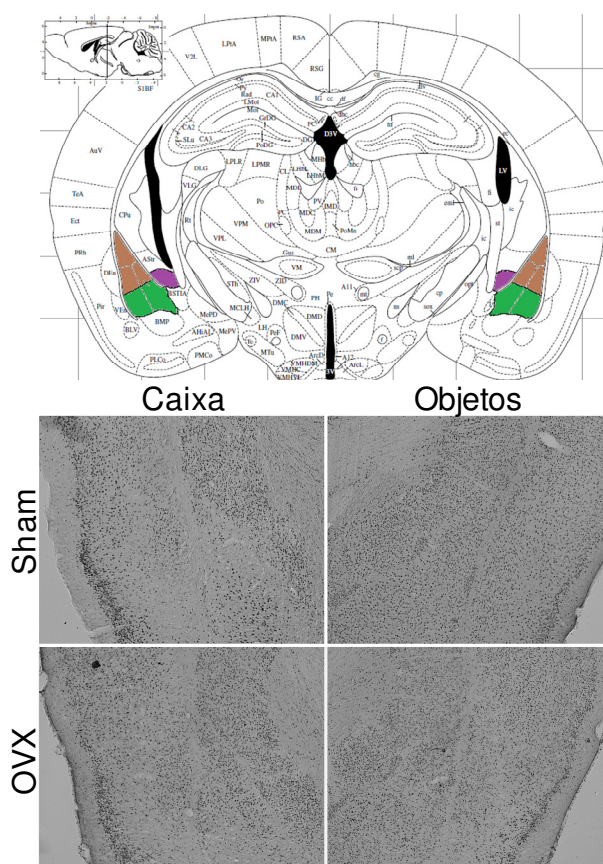


Figura 5.21 - Fotos da Imunohistoquímica representativas da expressão de c-Fos na amígdala, doze semanas após a cirurgia sham / OVX.

5.4.6. Correlação entre a expressão de c-Fos na amígdala e o tempo de exploração dos objetos

Da mesma forma que no hipocampo e no perirrinal, decidimos verificar se existe correlação entre o tempo de exploração de objetos e a expressão de c-Fos na amígdala. A Figura 5.22 demonstra que houve correlação entre a expressão de c-Fos no núcleo LA e o tempo de exploração nos animais sham ($n=4$, $R=0,9751$ $p=0,0002$), no entanto, não houve correlação no grupo OVX ($n=5$, $R=0,1004$, $p=0,5407$). Da mesma forma, observamos correlação entre expressão de c-Fos e tempo de exploração no núcleo BLA de animais sham ($R=0.9672$, $p=0,0004$) o que não ocorreu no grupo OVX ($R=0,2409$, $p=ns$) (Figura 5.23).

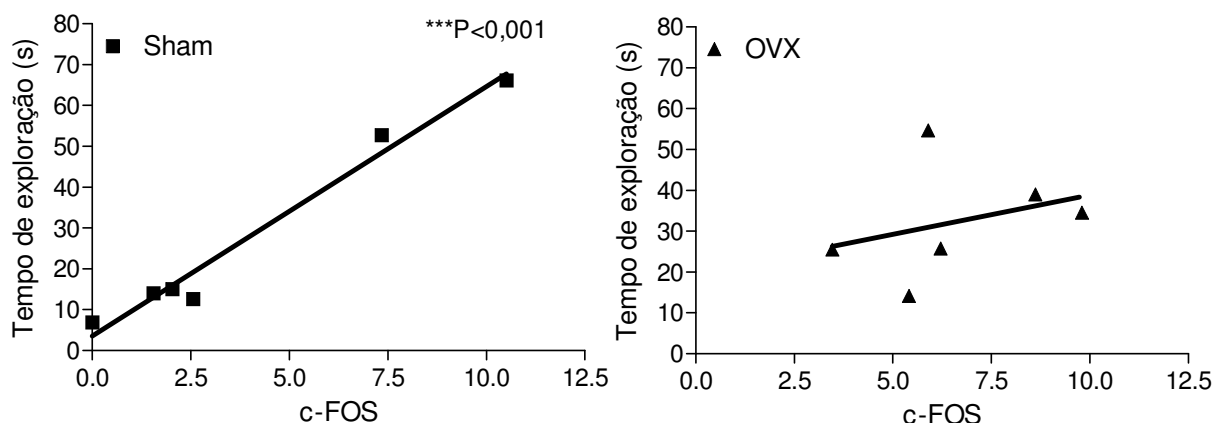


Figura 5.22: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região LA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. *** $P<0,001$.

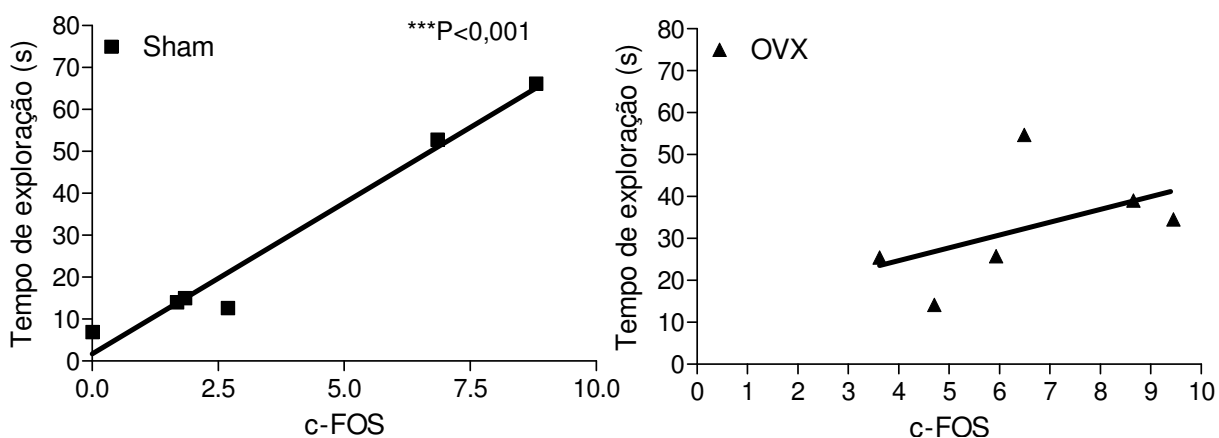


Figura 5.23: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região BLA, doze semanas após privação hormonal. *** $P<0,001$.

Interessantemente, ao analisarmos a correlação entre o tempo de exploração e a expressão de c-Fos no núcleo CeA, não houve significância nem no grupo sham ($R=-0.34$, $p=ns$), nem no grupo OVX ($R=0.39$, $p=ns$).

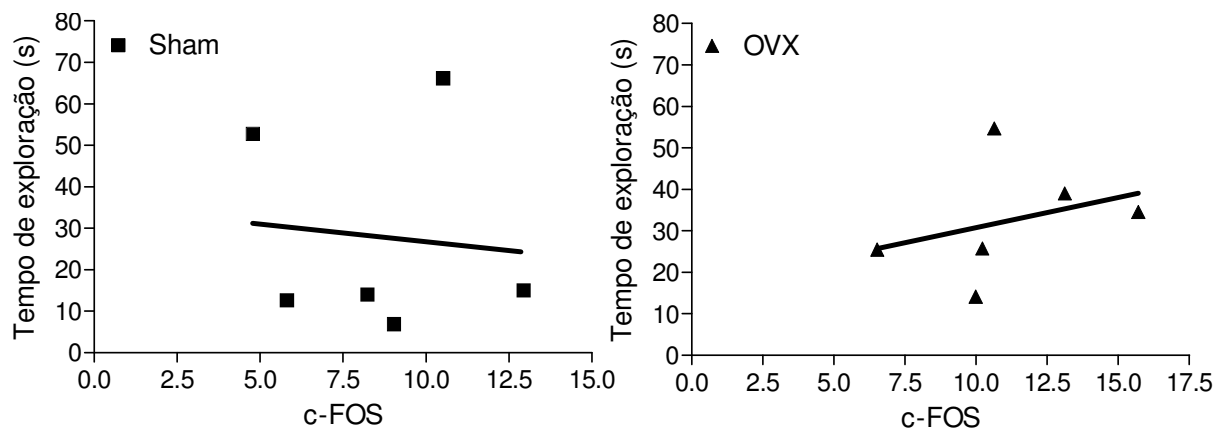


Figura 5.24: Correlação da expressão de c-Fos e do tempo de exploração dos objetos para a região CeA, doze semanas após a cirurgia sham/OVX. Sham (n=5), OVX (n=5).

Nossos resultados mostram que existe correlação entre a ativação dos núcleos LA e BLA da amígdala e o tempo de exploração de objetos, apenas no grupo de fêmeas normo-ciclantes, sendo esta correlação ausente nas fêmeas submetidas à privação de hormônios ovarianos durante doze semanas. Além disso, não houve correlação entre a ativação do núcleo CeA e o tempo de exploração de objetos em ambos os grupos, sham e OVX.

5.5. Expressão de c-Fos em fêmeas submetidas a doze semanas de ovariectomia seguido de cinco semanas de reposição hormonal

Mostramos anteriormente, que os animais submetidos à privação hormonal de doze semanas, seguidas de cinco semanas de reposição hormonal com 17β -estradiol apresentaram uma recuperação da memória de reconhecimento de objetos (Figura 5.25).

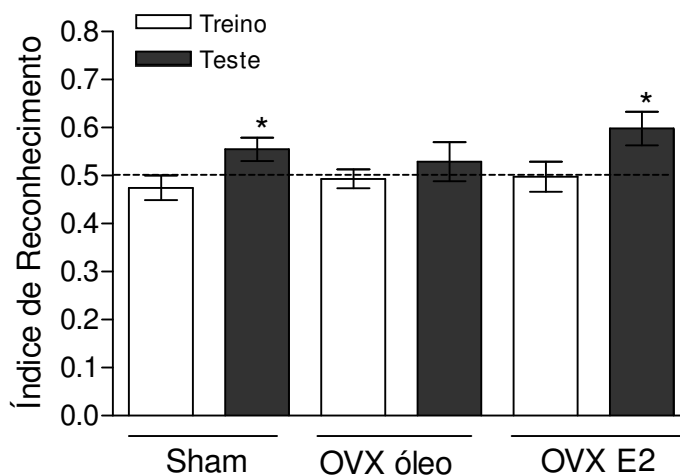


Figura 5.25 - Tarefa de reconhecimento de um novo objeto após cinco semanas de reposição hormonal após doze semanas da cirurgia ovariectomia/sham. Sham (n=11), OVX óleo (n=10), OVX E2 (n=11). * $p < 0,05$ comparado com 0,5.

Seguindo o objetivo de verificar que substratos neurais estariam envolvidos no efeito promnésico do 17β -estradiol, avaliamos a expressão de c-Fos, como marcador de atividade neuronal, em resposta ao treino na tarefa de reconhecimento de objetos. Novamente, escolhemos substratos neurais recrutados pela tarefa de reconhecimento de objetos, como o hipocampo e o córtex perirrinal. Além disso, também analisamos a expressão de c-Fos na amígdala, que além de fazer parte do conjunto de estruturas do lobo temporal, é uma região altamente relacionada à modulação de memórias.

Apesar da média de tempo de exploração dos grupos ser aparentemente diferente, a dispersão dos dados foi alta, logo não houve diferença entre os animais OVX óleo que exploraram os objetos (OVX óleo objetos) (n=6; $21,41 \pm 17,41s$) e animais OVX E2 que exploraram os objetos (OVX E2 objetos) (n=6; $8,94 \pm 7,78s$) quanto ao tempo total de exploração dos objetos ($t_{(8)}=1,462$, $p=0,1819$).

5.5.1. Expressão de c-Fos no hipocampo

Para verificar a ativação hipocampal em resposta à sessão de treino na tarefa de reconhecimento de objetos, analisamos a expressão de c-Fos nas regiões CA1 (Figura 5.26 e 5.29), CA3 (Figura 5.27 e 5.29) e GD (Figura 5.28 e 5.29) do

hipocampo de fêmeas ovariectomizadas por doze semanas suplementadas com cinco semanas de reposição hormonal.

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o treino (caixa versus objeto) e o tratamento (óleo versus E2) mostrou não haver interação entre os fatores ($F(1,17)=0,01$, $P=0,89$) na região CA1. Também não observamos efeito principal do treino ($F(1,17)=0,52$, $P=0,47$) na expressão de c-Fos na região CA1 do hipocampo. No entanto, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,17)=74,82$, $P<0,0001$) e a análise post-hoc de Bonferroni demonstrou uma diferença significativa entre os grupos OVX óleo e OVX E2 (Figura 5.24).

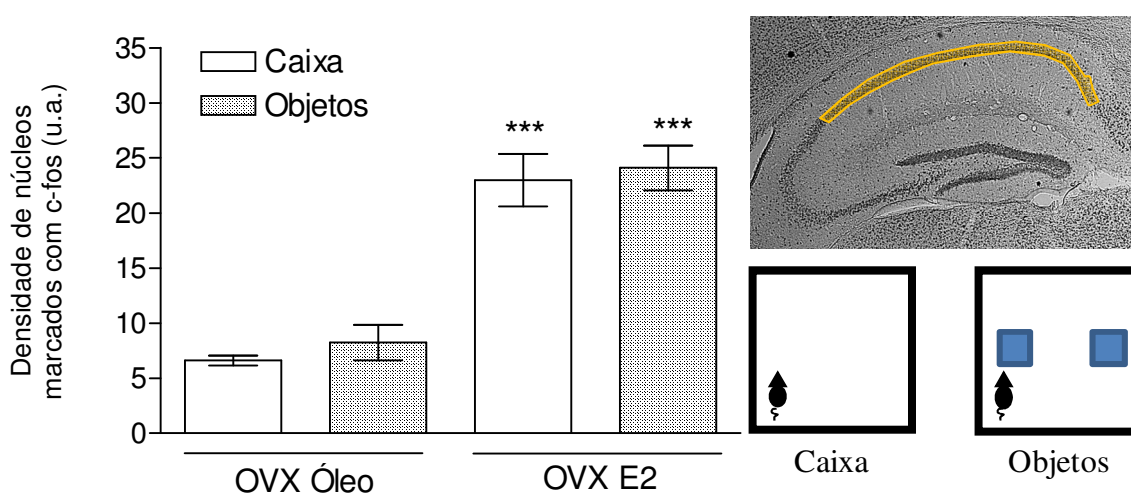


Figura 5.26 - Expressão de c-Fos na região CA1 de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=5), OVX óleo objetos (n=5), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5).

*** $P<0,001$ (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).

A análise da expressão de c-Fos na região CA3 demonstrou não haver interação entre os fatores ($F(1,17)=0,15$, $P=0,69$), além de não haver efeito principal do treinamento ($F(1,17)=0,69$, $P=0,41$). No entanto, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,17)=39,57$, $P<0,0001$), cuja análise post-hoc revelou diferença significativa entre os grupos OVX E2 (caixa e objeto) e OVX óleo (caixa e objeto) (Figura 5.27).

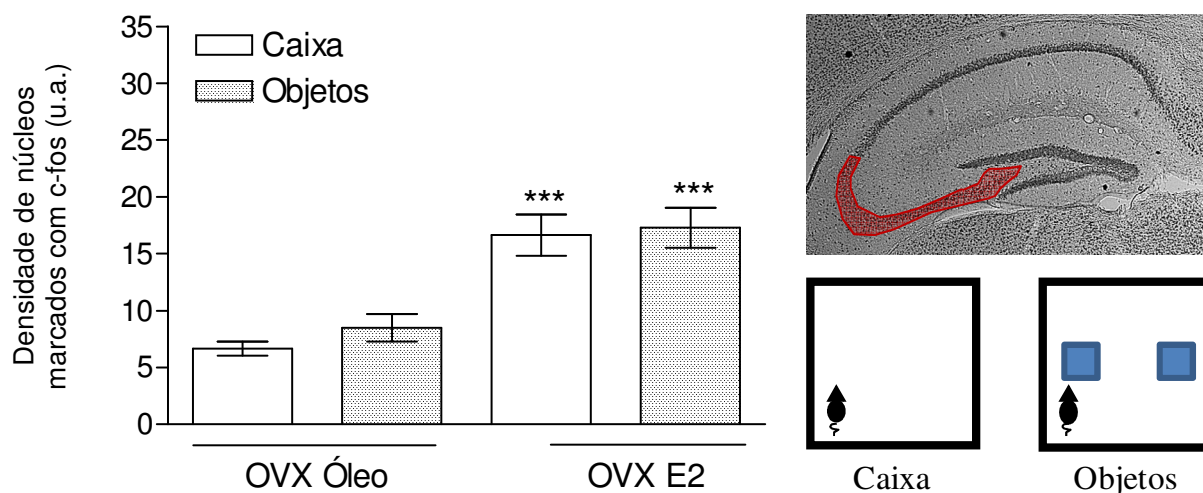


Figura 5.27 - Expressão de c-Fos na região CA3 do hipocampo após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. *** $P < 0,001$ (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).

A análise da expressão de c-Fos no GD do hipocampo demonstrou não haver interação entre os fatores ($F(1,17)=0,15$, $P=0,69$), além de não haver efeito principal do treinamento ($F(1,17)=0,69$, $P=0,41$). No entanto, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,17)=39,57$, $P < 0,0001$), cuja análise post-hoc revelou diferença significativa entre os grupos OVX E2 (caixa e objeto) e OVX óleo (caixa e objeto) (Figura 5.28).

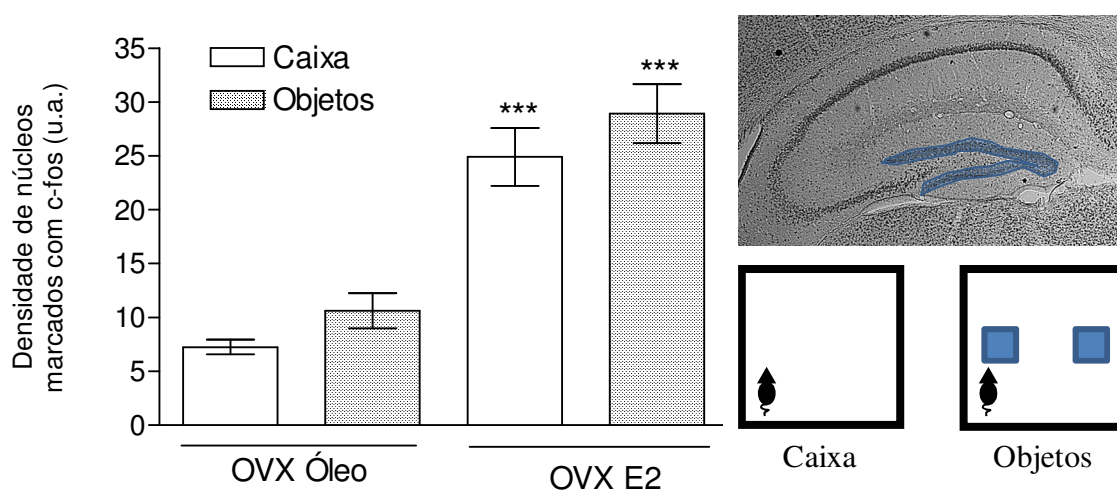


Figura 5.28 - Expressão de c-Fos na região GD do hipocampo de fêmeas submetidas a 12 semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. *** $P < 0,001$ (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto).

5.5.2. Correlação entre a expressão de c-Fos no hipocampo e o tempo de exploração dos objetos

A análise de correlação de Pearson revelou não haver correlação entre as variáveis na região CA1 do hipocampo em ambos os grupos OVX óleo ($R=-0.22$, $p=0,71$) e OVX E2 ($R=0.54$, $p=0.34$) (Figura 5.30). O mesmo ocorreu na região CA3 (OVX óleo, $R= -0,39$, $p=ns$; OVX E2, $R=0,15$, $p=0,34$) (Figura 5.31) e GD do hipocampo (OVX óleo, $R= -0,39$, $p=0,51$; OVX E2, $R=0,106$, $p=0,91$) (Figura 5.32).

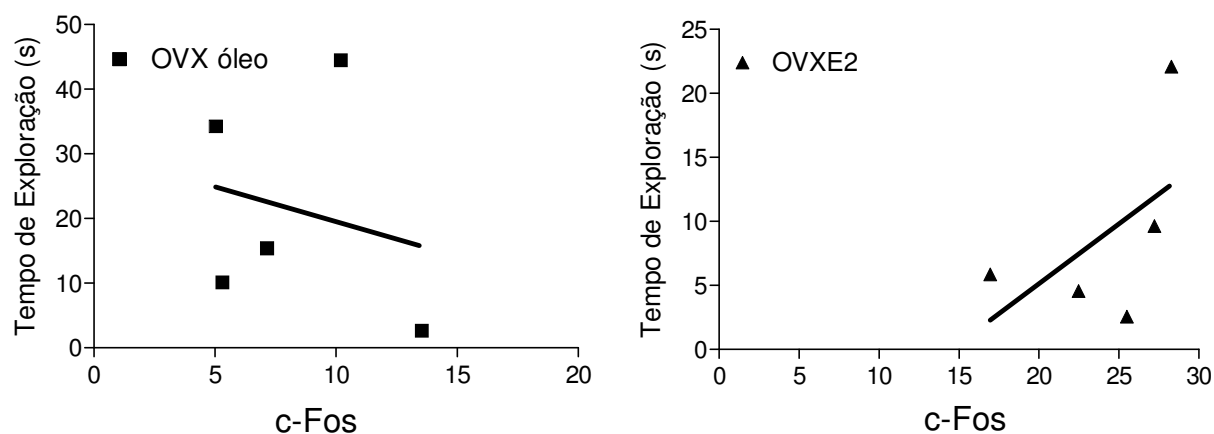


Figura 5.30 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região CA1 do hipocampo após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal com 17β -estradiol ($n=5$) ou óleo ($n=5$).

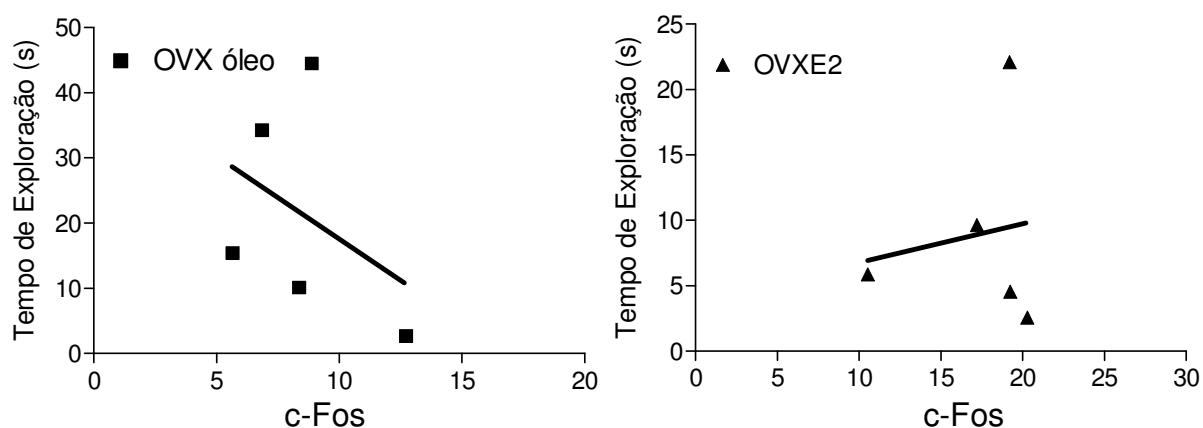


Figura 5.31 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região CA3 do hipocampo após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal.

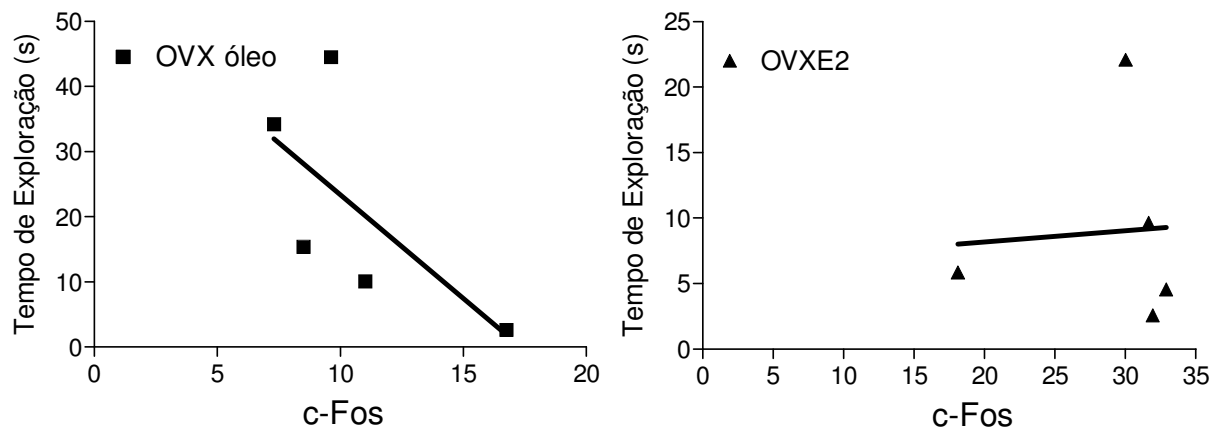


Figura 5.32 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos na região do GD do hipocampo de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX mais cinco semanas de reposição hormonal com 17β -estradiol ($n=5$) ou óleo ($n=5$).

Nossos resultados mostram que além de não haver correlação entre o tempo de exploração de objetos e ativação hipocampal em fêmeas privadas de hormônios ovarianos por dezessete semanas, o que corrobora nossos resultados anteriores com apenas doze semanas de OVX, o regime de reposição hormonal utilizado aqui não foi capaz de re-estabelecer a correlação existente entre as variáveis já citadas, como observamos em fêmeas que ciclam normalmente.

5.5.3. Expressão de c-Fos no córtex perirrinal

A ANOVA de duas vias mostrou interação entre as variáveis tempo de exploração de objetos e tratamento com E2 ($F(1,19)=9,623$, $p=0,005$), logo os fatores foram analisados separadamente. Ambos os grupos tratados com E2 foram diferentes dos grupos tratados com óleo ($t(10)=9,84$ e $t(9)=10,66$, $p<0,0001$). Além disso, observamos um efeito treino-dependente apenas no grupo OVX E2 ($t(9)=5,06$, $p=0,0007$). Nossos resultados demonstram que o tratamento com E2 foi capaz de aumentar a expressão de c-Fos no córtex perirrinal de fêmeas e que o treino na tarefa de reconhecimento de objetos ativou o córtex perirrinal de fêmeas tratadas com E2, o que não ocorreu nas fêmeas tratadas com óleo ($t(10)=1,11$, $p=0,29$) (Figura 5.33, 5.34).

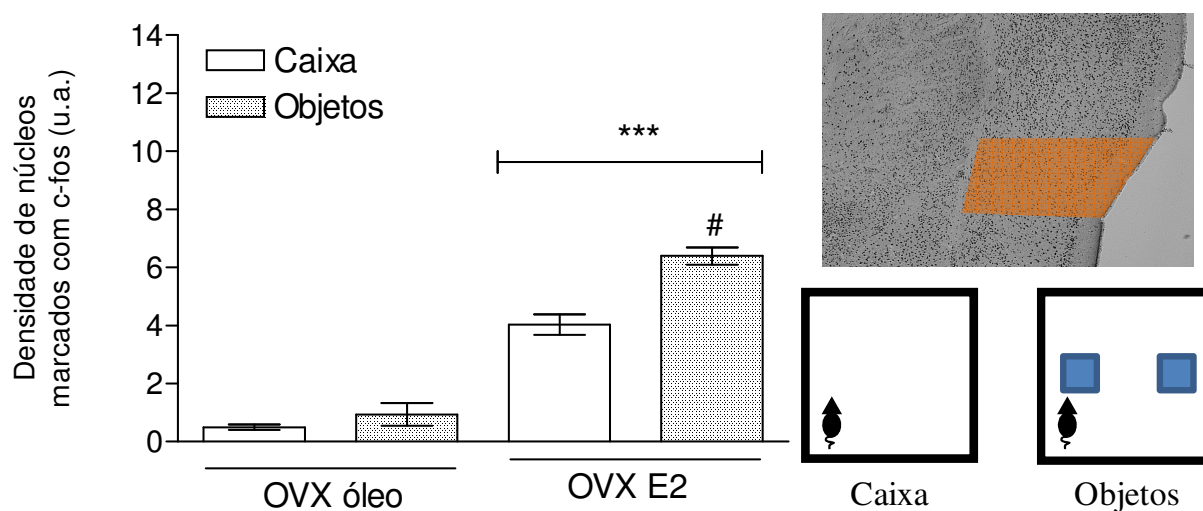


Figura 5.33 - Expressão de c-Fos no córtex perirrinal após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). *** $P < 0,001$ (OVX E2 versus OVX óleo para caixa e objeto). # $P < 0,001$ (comparado com o grupo OVX E2 caixa).

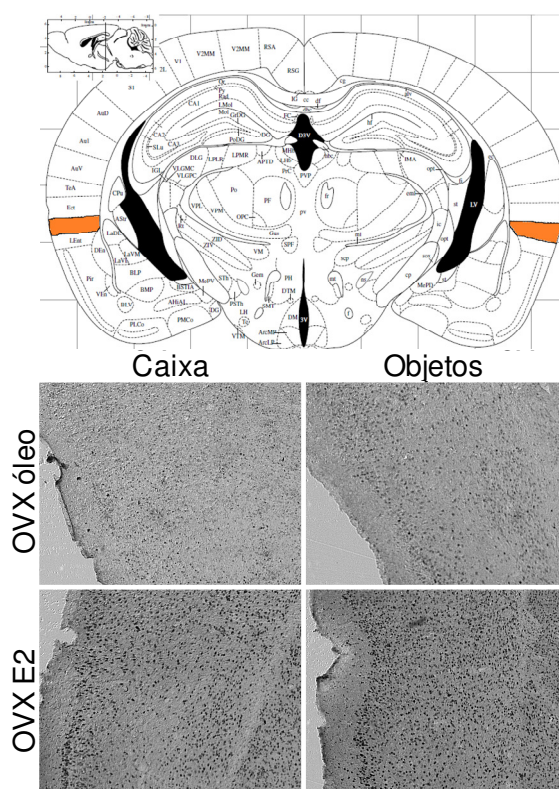


Figura 5.34 – Foto representativa da imunohistoquímica de c-Fos no córtex perirrinal de fêmeas após doze semanas de privação hormonal seguido de cinco semanas de reposição hormonal.

5.5.4. Correlação entre a expressão de c-Fos no córtex perirrinal e o tempo de exploração dos objetos

A análise de correlação de Pearson revelou não haver correlação entre as variáveis no córtex perirrinal, em ambos os grupos OVX óleo ($R=-0.59$, $p=0,20$) e OVX E2 ($R=0.004$, $p=0.99$) (Figura 5.35). Nossos resultados mostram que além de não haver correlação entre o tempo de exploração de objetos e ativação perirrinal em fêmeas privadas de hormônios ovarianos por dezessete semanas, o que corrobora nossos resultados anteriores com apenas doze semanas de OVX, o regime de reposição hormonal utilizado aqui não foi capaz de restabelecer a correlação existente entre as variáveis já citadas, como observamos em fêmeas normo-ciclantes.

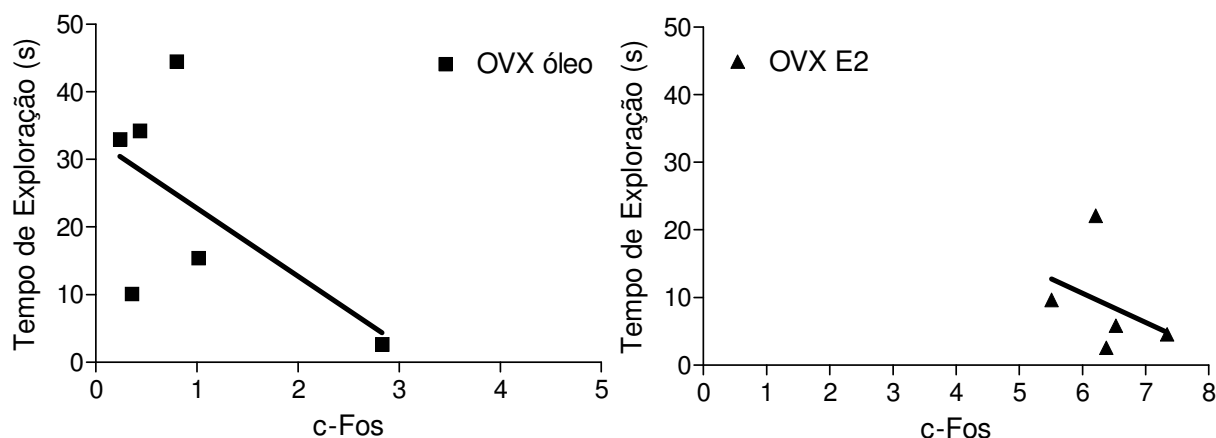


Figura 5.35 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no córtex perirrinal após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).

5.5.5. Expressão de c-Fos na amígdala

Nossos resultados demonstraram não haver interação entre os fatores, quando a região analisada foi o núcleo LA ($F(1,19)=0,60$, $p=0,44$). Porém, observamos um efeito principal do treino ($F(1,19)=6,06$, $p=0,02$), apesar da análise post-hoc não ter demonstrado diferença entre os grupos. No entanto, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,19)=72,14$, $p<0,0001$), sendo os grupos óleo estatisticamente diferentes dos grupos E2 ($p<0,001$) (Figura 5.36 e 5.37).

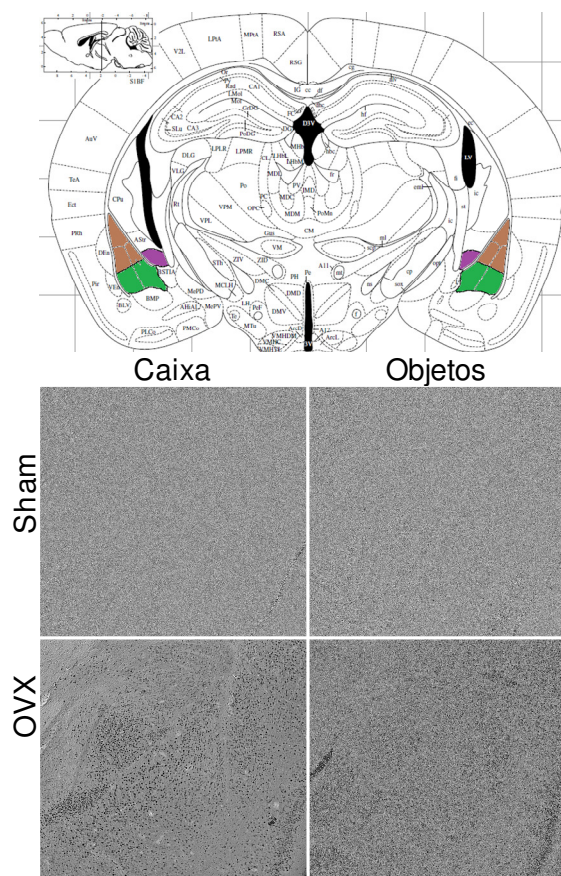


Figura 5.36 - Foto representativa da imunohistoquímica de c-Fos na amígdala de fêmeas após doze semanas de privação hormonal seguido de cinco semanas de reposição hormonal.

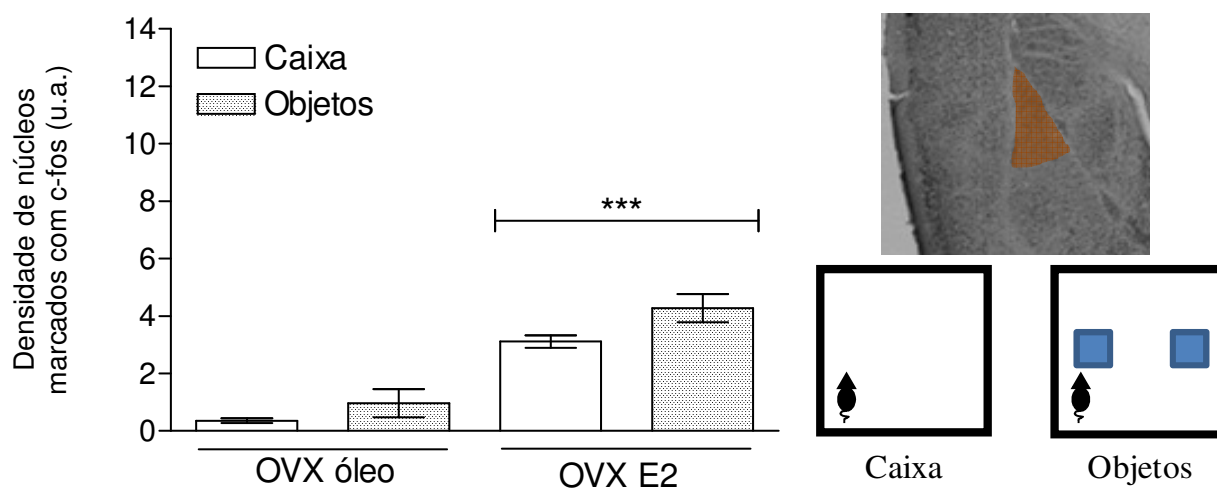


Figura 5.37 - Expressão de c-Fos no núcleo LA de fêmeas submetidas a doze semanas de OVX mais cinco semanas de reposição. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). *** $P < 0,001$ (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto).

A análise da expressão de c-Fos no núcleo BLA revelou ausência de interação entre os fatores ($F(1,19)=0,007$, $p=0,93$). No entanto, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,19)=60,79$, $p<0,0001$), sendo os grupos óleo estatisticamente diferentes dos grupos E2 ($p<0,001$). Além disso, houve uma tendência ao efeito principal do treinamento ($F(1,19)=4,22$, $P=0,05$) (Figura 5.36 e 5.38).



Figura 5.38 - Expressão de c-Fos no núcleo BLA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). *** $P<0,001$ (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto).

Quando analisamos o núcleo CeA, observamos um efeito principal do tratamento ($F(1,18)=44,96$, $p<0,0001$), cuja análise post-hoc revelou serem diferentes os grupos óleo dos grupos E2 ($p<0,01$). Também observamos um efeito principal do treinamento ($F(1,18)=10,24$, $p=0,005$), cuja a análise post-hoc revelou serem diferentes entre si apenas os grupos tratados com E2 ($P<0,05$). Além disso, não observamos interação entre os fatores ($F(1,18)=1,12$, $p=0,3027$), (Figura 5.36 e 5.39).

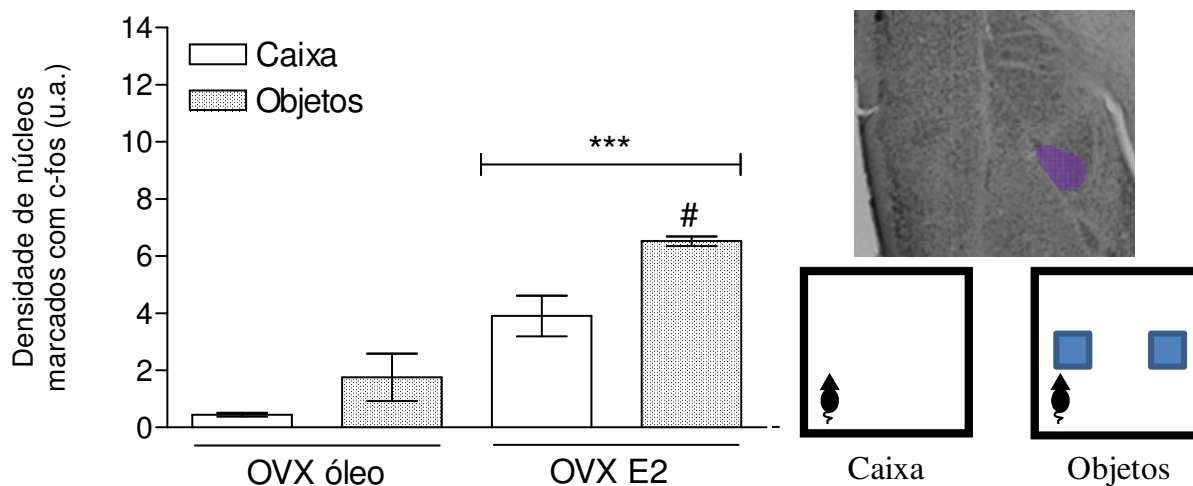


Figura 5.39 - Expressão de c-Fos no núcleo CeA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição. OVX óleo caixa (n=6), OVX óleo objetos (n=6), OVX E2 caixa (n=6), OVX E2 objetos (n=5). *** $P < 0,001$ (OVX E2 vs OVX óleo para caixa e objeto). # $P < 0,001$ (comparado com o grupo OVX E2 caixa)

Nossos resultados em conjunto mostram que o tratamento com 17β -estradiol foi capaz de induzir um aumento na expressão de c-Fos nos três núcleos da amígdala analisados (LA, BLA e CeA). Além disso, observamos apenas um efeito treino-específico na expressão de c-Fos no núcleo CeA da amígdala de fêmeas submetidas à reposição hormonal.

5.5.6. Correlação entre a expressão de c-Fos na amígdala e o tempo de exploração dos objetos

A análise de correlação de Pearson revelou não haver correlação entre as variáveis no núcleo LA, em ambos os grupos OVX óleo ($R = -0,49$, $p = 0,31$) e OVX E2 ($R = -0,57$, $p = 0,30$) (Figura 5.40). O mesmo aconteceu quando a região analisada foi o núcleo BLA (OVX óleo: $R = -0,41$, $p = 0,41$; OVX E2: $R = -0,69$, $p = 0,19$), (Figura 5.41).

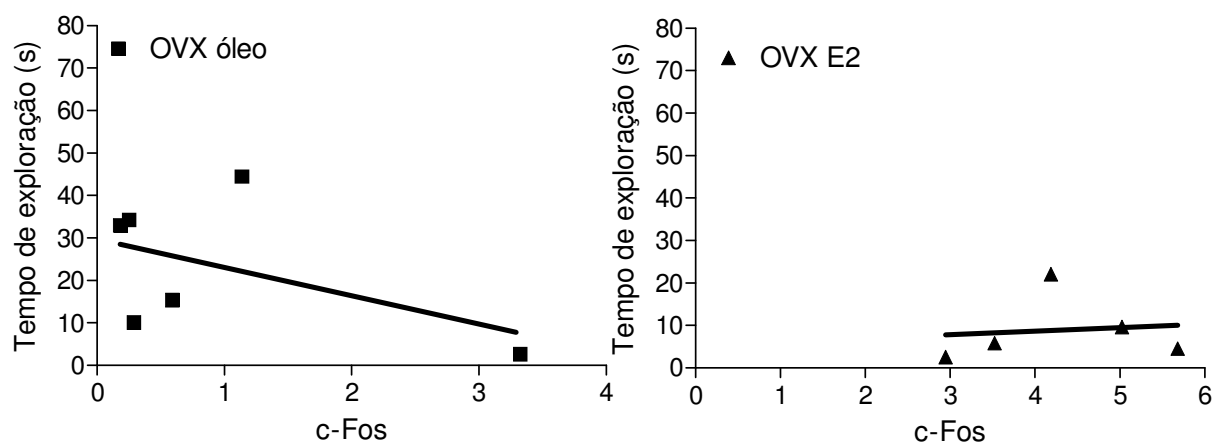


Figura 5.40 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo LA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).

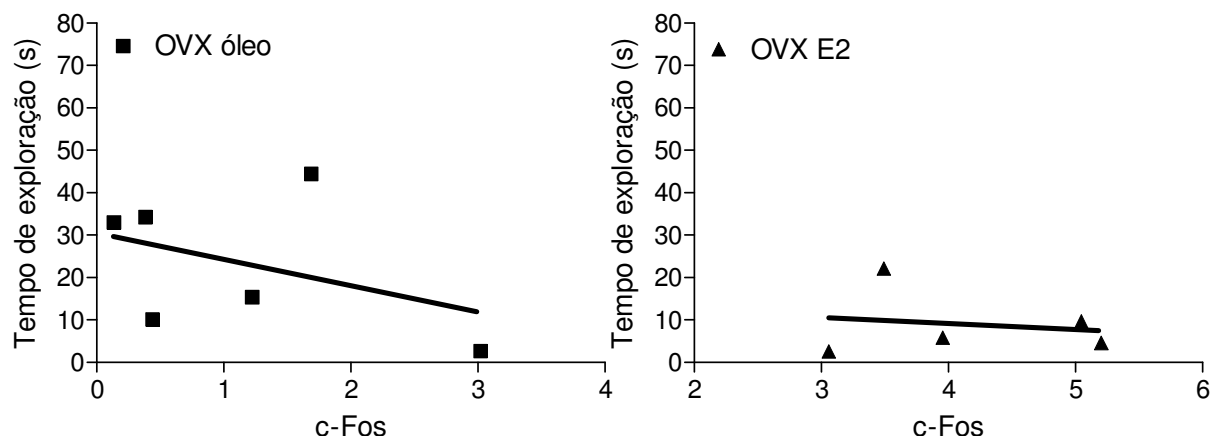


Figura 5.41 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo BLA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).

No entanto, no núcleo CeA houve uma correlação negativa entre as variáveis no grupo tratado com E2 ($R=-0,9809$, $p=0,01$), mas não no grupo OVX óleo ($R=-0,69$, $p=0,12$), (Figura 5.42).

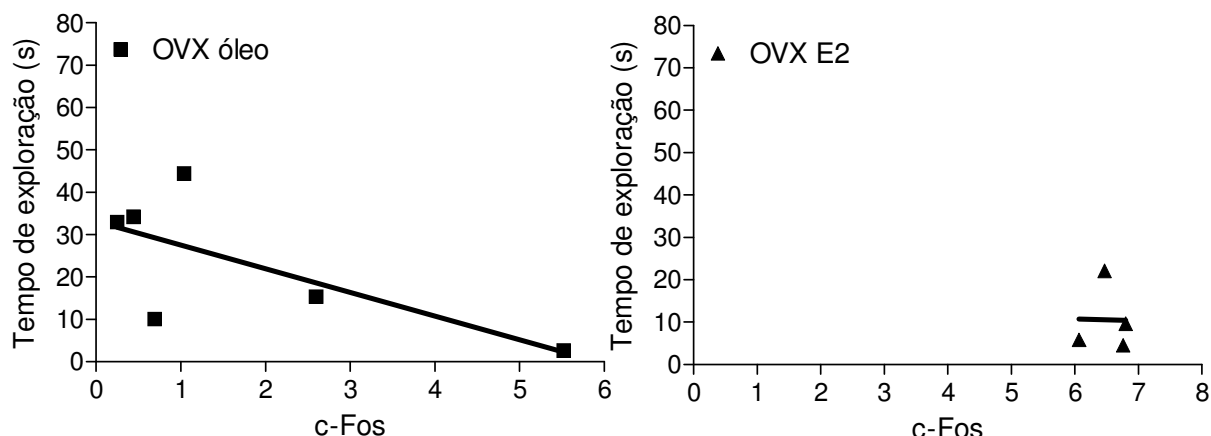


Figura 5.42 - Correlação entre a expressão de c-Fos e o tempo de exploração dos objetos no núcleo CeA após doze semanas de OVX seguido de cinco semanas de reposição hormonal. OVX óleo (n=6), OVX E2 (n=5).

Nossos resultados mostram que não houve correlação entre as variáveis nos núcleos LA, BLA e CeA de fêmeas ovariectomizadas por doze semanas e suplementadas por mais cinco semanas com óleo, o que corrobora os resultados de fêmeas ovariectomizadas por doze semanas. Além disso, a reposição hormonal, nos núcleos LA e BLA, não foi capaz de re-estabelecer a correlação entre as variáveis, como observado nas fêmeas sham, ou seja, normo-ciclantes. Quanto ao núcleo CeA, onde não observamos correlação positiva entre as variáveis nas fêmeas sham, em fêmeas submetidas à terapia de reposição hormonal observamos uma correlação negativa.

6. DISCUSSÃO

O efeito da privação de hormônios ovarianos sobre a memória tem sido amplamente estudado e possivelmente este seja o motivo de tantas controvérsias, já que os protocolos utilizados variam de estudo para estudo. Aqui nós avaliamos o efeito tempo-dependente da privação de hormônios ovarianos, através da ovariectomia, e nossos resultados demonstraram um déficit de memória de reconhecimento de objetos expressivo, apenas doze semanas pós-cirurgia. Nossos resultados corroboram dados da literatura que mostram que períodos prolongados de privação de hormônios ovarianos induzem déficits de memória em tarefas como labirinto em T, labirinto radial e labirinto em Y (Heikkinen et al., 2004; Carroll et al., 2007), mas contradizem outros que mostram que períodos inferiores a doze semanas são capazes de induzir déficits de memória (Wallace et al., 2006; Sarkaki et al., 2008). Além disso, doze semanas de ovariectomia parece não prejudicar a memória espacial (Wilson et al., 1999; Yamada et al., 1999). Estas diferenças podem ser explicadas pelas discrepâncias metodológicas adotadas durante estes estudos, que utilizaram animais, idades, tarefas e protocolos diferentes.

Nossos resultados da reposição hormonal após cinco semanas em fêmeas ovariectomizadas por doze semanas demonstraram que o estradiol administrado cronicamente permitiu que os animais reconhecessem o objeto novo na sessão de teste, apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos. Há vários estudos relatando melhora do desempenho em várias tarefas após terapia de reposição hormonal em fêmeas ovariectomizadas (Heikkinen et al., 2002; Fernandez e Frick, 2004; Frye et al., 2005; Gresack e Frick, 2006; Xu e Zhang, 2006; Voytko et al., 2008; Frye e Koonce, 2009).

No entanto, evidências suportam a hipótese que a terapia de reposição de estrogênios pode perder sua habilidade de afetar ou até mesmo não promover efeito robusto no desempenho da tarefa de memória, após um longo período de privação hormonal (Daniel et al., 2006) ou com idade avançada. Heikkinen et al (2004) utilizaram um grupo de camundongos fêmeas jovens e velhas e outro grupo ovariectomizadas por dois e dezoito meses, e demonstraram que a terapia de reposição hormonal com estradiol durante quarenta dias foi capaz de melhorar o desempenho em ambos os grupos, mas o efeito foi menos robusto no grupo com privação hormonal de longa duração e no grupo de animais velhos. Além disso,

McLaughlin et al (2008) demonstraram que estradiol administrado dez semanas após ovariectomia foi menos efetivo em aumentar a densidade de espinhas dendríticas na região CA1 do hipocampo comparado com estradiol administrado imediatamente após ovariectomia. Esses achados corroboram o estudo de Gibbs (2000) que mostrou que a responsividade do cérebro ao tratamento com estrogênios declina entre três e dez meses depois da ovariectomia. Estes resultados parecem ser corroborados com estudos em humanos que relatam que a terapia de reposição hormonal iniciada durante ou logo após a menopausa exerce efeitos positivos na função cognitiva em mulheres, enquanto a iniciação tardia do tratamento foi associada com prejuízo ou não demonstraram efeito sobre a cognição (Zandi et al., 2002; Henderson et al., 2005; MacLennan et al., 2006). Assim o fato dos nossos resultados não apresentarem diferença estatisticamente significativa nem do grupo sham nem do grupo OVX E2 em relação ao grupo OVX óleo pode ser justificado pelo fator idade e pela ovariectomia de longa duração.

Identificar estruturas cerebrais e circuitos ativados durante os processos de formação e armazenamento da memória são atualmente um dos maiores objetivos no campo da neurobiologia do aprendizado e memória. Aliado a isto está à necessidade de se identificar que substratos neurais estão envolvidos nos efeitos mnemônicos dos hormônios femininos. Em nosso trabalho, verificamos a expressão de c-Fos em substratos neurais impactados tanto pela memória de reconhecimento de objetos quanto pelos estrogênios. Para tal, utilizamos fêmeas sham-operadas e ovariectomizadas por doze semanas. Partindo da hipótese de que os efeitos deletérios da privação hormonal afetariam a aquisição de novas informações, refletindo, então, num déficit de discriminação entre um objeto familiar e um objeto novo, avaliamos a ativação do hipocampo, córtex perirrinal e amígdala após a sessão de treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

Nossos resultados mostraram não haver diferença treino ou cirurgia-dependentes, no hipocampo e no córtex perirrinal. De fato, nem todos os tipos de aprendizado são capazes de induzir um aumento na expressão de c-Fos hipocampal (Mendez-Lopez et al., 2009). Alguns estudos indicam que sua expressão no hipocampo aumenta com a complexidade espacial da tarefa (Vann et al., 2000), com novos rearranjos espaciais de um estímulo familiar (Wan et al., 1999; Jenkins et al., 2004) e que a exposição a um novo item individual não promove esse aumento (Wan et al., 1999). Além disso, achados na literatura tem apontado que o

hipocampo e o córtex perirrinal desempenham um papel direto na discriminação de itens relacionados à familiaridade e novidade (Wan et al., 1999), arranjos espaciais (Gaffan e Parker, 1996; Gilbert e Kesner, 2002) e sequências temporais (Hunsaker et al., 2008), ou seja, quando há confrontação entre um estímulo familiar e um novo. Logo, é possível que não tenhamos visto diferença entre o grupo contexto (caixa) e o treinado (objetos) porque o recrutamento do hipocampo e do córtex perirrinal pode ser mais expressivo no momento da discriminação entre o objeto familiar e o novo, que ocorre apenas na sessão de teste. Logo, podemos sugerir que o déficit de memória encontrado no protocolo comportamental não deve estar relacionado com a fase de aquisição da informação, ou seja, os hormônios ovarianos podem não ter influência nessa etapa. Os animais OVX, talvez, estejam aptos a adquirir uma informação nova, mas não conseguem evocar a informação adquirida.

Em se tratando da tarefa de reconhecimento de um novo objeto, quando o animal está efetivamente explorando os dois objetos idênticos, informações sensoriais estão sendo geradas a respeito da forma, tonalidade, cheiro, espessura e disposição espacial do objeto, entre outras. Essas informações sensoriais são então codificadas e armazenadas em circuitos neurais que no momento do teste são reativados para que o animal possa discriminar o objeto novo do familiar. Recentemente foi demonstrado que em ratos naives existe uma correlação positiva entre o tempo de exploração efetiva dos objetos no treino e o desempenho do animal na sessão de teste, ou seja, animais que exploram mais os objetos durante o treino apresentam um desempenho melhor no teste (Albasser et al., 2010). Em nosso trabalho, utilizamos como protocolo de treino a exploração espontânea de objetos durante dez minutos. Apesar das médias de exploração dos grupos Sham e OVX não terem sido estatisticamente diferentes, a dispersão dos dados foi grande. Assim, se existe correlação entre as variáveis: exploração de objetos e desempenho na tarefa haveria correlação entre o tempo de exploração de objetos e a ativação neuronal em áreas relacionadas à formação da memória de objetos? Nossos resultados demonstraram que em animais sham, ou seja, fêmeas com níveis normais de hormônios ovarianos, houve correlação positiva entre expressão de c-Fos no hipocampo e córtex perirrinal e exploração de objetos, o que aponta para uma relação direta entre entrada de informação sensorial e ativação destas áreas. Como nestes animais a memória de reconhecimento de objetos está intacta, podemos inferir que a ativação destas áreas pode estar subsidiando a codificação neural dos

objetos explorados. Interessantemente, o mesmo não ocorreu com animais OVX, os quais apresentam déficit de memória de reconhecimento de objetos. Podemos inferir com estes resultados que a privação de hormônios ovarianos prejudica a ativação neuronal hipocampal e perirrinal, em resposta à exploração de objetos, o que poderia comprometer a codificação dos objetos explorados. Corroborando esta idéia está o fato de que em animais com lesão no córtex perirrinal, não há correlação entre o tempo de exploração de objetos e o desempenho na tarefa (Albasser et al., 2010).

Devido à alta presença de receptores de estradiol na amígdala (Merchenthaler et al., 2004) e seu papel na percepção, modulação e integração de funções associadas com medo, ansiedade, atenção, aprendizado e memória de cunho emocional (Adamec e Morgan, 1994; Rasia-Filho et al., 2000; Goosens e Maren, 2001), também analisamos a expressão de c-Fos na amígdala de fêmeas sham e OVX em resposta ao treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

A amígdala não é preferencialmente ativada na tarefa de reconhecimento de um novo objeto, já que esta tarefa avalia o comportamento exploratório natural dos roedores e é considerada a tarefa que oferece menos estresse possível ao animal, pois não utiliza de reforço negativo (por exemplo, um choque), nem privação de água ou alimento (Dere et al., 2007). No estudo de Hannesson et al (2008) os autores demonstraram que a amígdala não teve influência na tarefa de reconhecimento de objetos e nem na tarefa de memória espacial.

Nossos resultados demonstraram que não houve ativação dos núcleos LA e BLA dependente da cirurgia ou do treinamento, o que de certa forma corrobora os estudos acima citados que indicam que esta tarefa não recruta preferencialmente a amígdala. No entanto, demonstramos haver uma correlação positiva entre o tempo de exploração dos objetos e a expressão de c-Fos nestes dois núcleos. De fato, os núcleos LA e BLA são as principais aferências da amígdala, recebendo projeções talâmicas sensoriais e de córtices associativos polimodais (Sah et al., 2003). Logo, é esperado que quanto maior seja a exploração dos objetos, maior será a ativação destes núcleos. Interessantemente, isso é verdadeiro para o grupo de animais sham, mas não para os animais OVX, o que corrobora os resultados de correlação encontrados no hipocampo e córtex perirrinal.

O núcleo CeA, por sua vez, controla a maior via eferente da amígdala (Sah et al., 2003) e tem projeções descendentes para regiões envolvidas em respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas a estímulos emocionais (Gray et al.,

1993; Marcilhac e Siaud, 1997). Em nosso trabalho observamos um aumento na expressão de c-Fos no núcleo CeA da amígdala de fêmeas OVX, em comparação às fêmeas sham, ou seja, o grupo OVX exposto ao contexto apresentou níveis de expressão de c-Fos similares ao grupo OVX exposto ao contexto e objetos, porém apresentou níveis estatisticamente maiores quando comparado ao grupo sham caixa.

O CeA é um núcleo importante nas respostas comportamentais de medo e ansiedade e tem um papel crucial na regulação da responsividade ao estresse do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Laflamme et al., 1998; Osterlund et al., 1998; Shughrue e Merchenthaler, 2001). Estudos com lesões nesse núcleo relatam uma diminuição em comportamentos do tipo ansiedade e diminuição nas respostas neuroendócrinas a vários tipos de estressores (Kopchia et al., 1992; Feldman et al., 1994).

Alguns achados na literatura têm demonstrado a relação entre a ovariectomia de longa duração e o estresse e a ansiedade. O período de doze semanas de ovariectomia em ratas induz comportamentos do tipo-ansiedade mais pronunciados do que os períodos de três ou seis semanas (Picazo et al., 2006), enquanto que o período de vinte semanas aumenta a susceptibilidade a estímulos estressores (Lagunas et al., 2010).

Nossos resultados, juntamente com dados da literatura sugerem que o animal, privado de hormônios ovarianos por doze semanas, pode estar sofrendo uma modulação exacerbada do núcleo central da amígdala, o que poderia exacerbar comportamentos do tipo-ansiedade no momento do treino, que em última instância podem prejudicar a memória destes animais. De fato, sabe-se que o aumento de estímulo emocional induzido por estresse afeta negativamente processos de aprendizado e memória dependentes de hipocampo (Kim et al., 2001; Conrad et al., 2003; Vasconcellos et al., 2003; Wright e Conrad, 2005). Em humanos, Soetanto et al (2010) relataram que altos níveis de ansiedade estão associados com diminuição da densidade de espinhas dendríticas na região CA3 do hipocampo. Além disso, outros estudos sugerem que altos níveis de cortisol promovem déficit na memória declarativa dependente de hipocampo (Kirschbaum et al., 1996; Sapolsky et al., 2000).

Desordens relacionadas à ansiedade são freqüentemente acompanhadas por disfunção no eixo HPA que resulta em elevação crônica de glicocorticóides. Os

glicocorticóides (GCs) são hormônios esteróides adrenais secretados em resposta ao estresse e desempenham um papel em lidar com sucesso em situações de maior estresse, por exemplo, em escapar de um predador. Eles mobilizam estoque de energia, aumentam o tônus cardiovascular, entre outras ações. No entanto, prolongada exposição à GCs podem promover uma variedade de alterações patológica como hipertensão, imunossupressão, déficits reprodutivos e efeitos não desejáveis também no sistema nervoso. O hipocampo e o núcleo central da amígdala são considerados um alvo para os GCs apresentando grandes quantidades de receptores de corticosteróides (Morimoto et al., 1996; Sapolsky et al., 2000). Assim, a ovariectomia de longa duração promove ativação da amígdala central, esta por sua vez pode agir modulando o eixo HPA acessando o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) indiretamente via lateral BNST e promover aumento nos níveis de corticosteróides os quais agindo sobre o hipocampo promovendo influências inibitórias no mesmo e por fim desencadeando déficit de memória. Estudos demonstram que os glicocorticóides ao promover déficit de memória em tarefas relacionadas ao hipocampo, também promovem alterações plásticas no mesmo, como diminuição da LTP, diminuição da excitabilidade neuronal e perda de espinhas dendríticas (Woolley et al., 1990; Joels e Dekloet, 1992; Mesches et al., 1999).

Podemos sugerir, que os animais OVX apresentem comportamento de ansiedade induzido pela modulação exacerbada do CeA e esse é um possível mecanismo pelo qual os animais OVX apresentariam déficit de memória evidenciado pelos protocolos comportamentais.

Realizamos, também, em nosso trabalho, experimentos que visaram verificar o efeito da reposição hormonal sobre a expressão de c-Fos em áreas relacionada à tarefa de reconhecimento de objetos. Nossos resultados demonstraram que a administração crônica de 17- β estradiol durante cinco semanas, em fêmeas ovariectomizadas por doze semanas, foi capaz de aumentar a expressão de c-Fos em todos os substratos neuronais avaliados, sugerindo uma ação desse hormônio no circuito de memória do lobo temporal como um todo.

Observamos de uma maneira geral, que o 17 β -estradiol, quando administrado agudamente, pode representar um estímulo indutor de expressão de c-Fos no hipocampo (Rudick e Woolley, 2000) área pré-óptica, núcleo ventromedial do hipotálamo e área dois do córtex cingulado (Dominguez-Salazar et al., 2006). No

entanto, existem poucos dados na literatura que avaliam a expressão de c-Fos pós-tratamento crônico com estradiol, que foi o que realizamos em nosso trabalho. O tratamento de macacas, ovariectomizadas por dez dias, com implantes contendo estradiol, durante três dias, foi capaz de aumentar a expressão de c-Fos no córtex frontal, independente do estímulo (Wang et al., 2004). Em outro trabalho, os autores verificaram um aumento na expressão de c-Fos no núcleo do leito da estria terminal (BNST) de ratas OVX, tratadas com estradiol durante duas semanas, independente do estímulo, que no caso deste trabalho, foi a privação de sono (Deurveilher et al., 2008). Logo, acreditamos que o tratamento realizado em nosso trabalho foi capaz de aumentar a expressão constitutiva de c-Fos, através de um efeito crônico do 17β -estradiol sobre os substratos neurais analisados.

Além do aumento na expressão de c-Fos promovido pelo tratamento com 17β -estradiol, nossos resultados demonstraram a ausência de efeito treino-específico na ativação hipocampal. No entanto, verificamos um efeito treino-específico da expressão de c-Fos no córtex perirrinal, apenas nas fêmeas que receberam a reposição hormonal.

O córtex perirrinal e o hipocampo são importantes substratos neuronais da memória declarativa e estudos recentes têm demonstrado divisões funcionais em relação a esses substratos. Em particular o córtex perirrinal parece ter uma função mais importante na percepção e em tarefas de reconhecimento de objetos (Murray e Bussey, 1999; Winters et al., 2004), pois recebe projeções diretas de áreas de associação unimodais visuais, no córtex inferior temporal adjacente, uma região importante para processamento visual de objetos (Squire et al., 2004). Já o hipocampo está mais relacionado com tarefas espaciais (Aggleton et al., 1997; Winters et al., 2004). No estudo de Winters et al (2004) utilizando ratos com lesões bilaterais tanto no hipocampo quanto no córtex perirrinal em tarefas de memória espacial e memória de reconhecimento de objetos, mostrou que ratos com lesões hipocampais tiveram prejuízo mais acentuado na tarefa de memória espacial, enquanto ratos com lesões no córtex perirrinal prejuízo maior na tarefa de reconhecimento de objetos.

O hipocampo e o córtex perirrinal são reciprocamente conectados, ambos via córtex entorrinal. Jo e Lee (2010) demonstraram que essas duas regiões (hipocampo e perirrinal) têm íntimas interações funcionais entre si, sendo estas

indispensáveis quando objetos e suas localizações espaciais precisam ser processadas ao mesmo tempo.

Os córtices perirrinal e para-hipocampal recebem amplas projeções de áreas unimodais e polimodais dos lobos frontal, temporal e parietal e projetam-se para o córtex entorrinal. Este, por sua vez, é a aferência majoritária do hipocampo. Surpreendentemente, vários achados na literatura tem demonstrado que a projeção do córtex perirrinal para o entorrinal apresenta alto nível de inibição, indicando que essa estrutura funciona como um filtro ou um portão que controla bidirecionalmente a transferência de informação entre o neocórtex e o hipocampo. Constituinto assim um poderoso sistema inibitório que funciona selecionando informações que são relevantes (de Curtis e Pare, 2004; Woodhall et al., 2005). Além disso, alguns estudos tem demonstrado que estímulos de conteúdo emocional relevantes podem facilitar a passagem de tráfico de informações através desse portão inibitório (Ongur e Price, 2000; Baxter e Murray, 2002).

A partir desses relatos podemos sugerir que o estradiol atuando via receptores no hipocampo e entorrinal ou mesmo atuando na amígdala via seus receptores aumentando a relevância emocional do estímulo, pode ser capaz de desativar este sistema inibitório, fazendo com que uma informação a princípio irrelevante, como exploração dos dois objetos iguais pudesse tornar-se relevante. Podendo ser evidenciado pelo fato de ter aumentado a marcação de c-Fos no córtex perirrinal para o grupo que explorou os objetos após reposição hormonal.

Além disso, o fato do córtex perirrinal ser muito importante em tarefas relacionadas à discriminação de objetos pode justificar o fato que encontramos diferença nesse substrato após reposição hormonal e não encontramos no hipocampo, estrutura esta mais relacionada com discriminação espacial.

Dados da literatura mostram que reposição hormonal com estrogênios é capaz de reverter o comportamento de ansiedade após privação hormonal de longo prazo. Então esperávamos que houvesse uma diminuição da marcação da amígdala central após reposição hormonal com E2. No entanto nossos resultados mostram que reposição hormonal de cinco semanas de estradiol não foi capaz de diminuir a marcação de c-Fos no núcleo central da amígdala dos animais OVX, sugerindo que o estradiol não foi capaz de reverter o possível quadro de ansiedade de fêmeas privadas de hormônios ovarianos por dezessete semanas. Walf e Frye (2006) demonstraram que administração de estradiol pode reverter o quadro de ansiedade

em fêmeas ovariectomizadas, mas a magnitude dessa resposta é influenciada pela dosagem e regime de utilização.

Alguns estudos relataram que ratas que receberam doses muito altas ou muito baixas de estradiol geralmente tem pouco ou nenhum efeito em diminuir a ansiedade. Já doses que produzem fisiológicos níveis de E2 têm diminuído a ansiedade. No entanto outro fator que influencia no sucesso dessa reversão é o tempo de reposição hormonal. (Galea et al., 2002) e Okada et al (1997) mostraram que a administração subcrônica (três a sete dias) de E2, dentro de níveis fisiológicos é capaz de diminuir o comportamento de ansiedade. No entanto a administração crônica (quatro semanas) de E2, em níveis fisiológicos, aumenta comportamento ansioso de ratas e camundongos fêmeas OVX ou não promove efeito algum.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a privação de hormônios ovarianos promove declínio cognitivo em camundongos fêmeas após doze semanas e a reposição com 17 β -estradiol de longo prazo é capaz de reverter esse déficit na memória declarativa episódica.

Os estrogênios são capazes de modular substratos neurais importantes para a memória declarativa, como hipocampo, córtex perirrinal e amígdala, além de áreas importantes para respostas neurovegetativas, como o núcleo central da amígdala, sendo então capaz de modular o circuito neural desempenhando um importante papel no processo de aprendizado e memória.

8. BIBLIOGRAFIA

Adamec RE, Morgan HD (1994) The Effect Of Kindling Of Different Nuclei In The Left And Right Amygdala On Anxiety In The Rat. *Physiology & Behavior* 55:1-12.

Adams MR, Shah RA, Janssen WGM, Morrison JH (2001) Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8071-8076.

Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ (1997) Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Research Bulletin* 43:279-287.

Al-Azzawi F, Palacios S (2009) Hormonal changes during menopause. *Maturitas* 63:135-137.

Albasser MM, Poirier GL, Aggleton JP (2010) Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *European Journal of Neuroscience* 31:134-147.

Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F (2008) The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory* 15:618-624.

Barker JM, Galea LAM (2008) Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152:888-902.

Batassa EM, Costanzi M, Sarauli D, Scardigli R, Barbato C, Cogoni C, Cestari V (2010) RISC activity in hippocampus is essential for contextual memory. *Neuroscience Letters* 471:185-188.

Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience* 3:563-573.

Bayley PJ, Squire LR (2003) The medial temporal lobe and declarative memory. *International Congress Series* 1250:245-259.

Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C (2006) The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54:99-105.

Bizon JL, LaSarge CL, Montgomery KS, McDermott AN, Setlow B, Griffith WH (2009) Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. *Neurobiology of Aging* 30:646-655.

Bucherelli C, Baldi E, Mariottini C, Passani MB, Blandina P (2006) Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning & Memory* 13:426-430.

Buffalo EA, Reber PJ, Squire LR (1998) The human perirhinal cortex and recognition memory. *Hippocampus* 8:330-339.

Buffalo EA, Bellgowan PSF, Martin A (2006) Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learning & Memory* 13:638-643.

Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2007) Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroscience* 27:13357-13365.

Clayton NS, Dickinson A (1998) Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395:272-274.

Coker LH, Espeland MA, Rapp SR, Legault C, Resnick SM, Hogan P, Gaussoin S, Dailey M, Shumaker SA (2010) Postmenopausal hormone therapy and cognitive outcomes: The Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 118:304-310.

Conrad CD, Grote KA, Hobbs RJ, Ferayorni A (2003) Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. *Neurobiology of Learning and Memory* 79:32-40.

Craig MC, Murphy DG (2007) Oestrogen, cognition and the maturing female brain. *Journal of Neuroendocrinology* 19:1-6.

Daniel JM, Hulst JL, Berbling JL (2006) Estradiol replacement enhances working memory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a long-term period of ovarian hormone deprivation. *Endocrinology* 147:607-614.

de Curtis M, Pare D (2004) The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus. *Progress in Neurobiology* 74:101-110.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2005) Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols* 16:10-19.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31:673-704.

Dominguez-Salazar E, Shetty S, Rissman EF (2006) Rapid neural fos responses to oestradiol in oestrogen receptor alpha beta double knockout mice. *Journal of Neuroendocrinology* 18:195-202.

Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherland RJ (2003) The aging hippocampus: Cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral Cortex* 13:1344-1351.

Duff SJ, Hampson E (2000) A beneficial effect of estrogen on working memory in postmenopausal women taking hormone replacement therapy. *Hormones and Behavior* 38:262-276.

Ennaceur A, Delacour J (1988) A New One-Trial Test For Neurobiological Studies Of Memory In Rats .1. Behavioral-Data. *Behavioural Brain Research* 31:47-59.

Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J (1994) Differential Effect Of Amygdaloid-Lesions On Crf-41, Acth And Corticosterone Responses Following Neural Stimuli. *Brain Research* 658:21-26.

Felten DL, Shetty A (2009) *Netter's Atlas of Neuroscience*, 2^a Edition.

Fernandez SA, Frick KA (2004) Chronic oral estrogen affects memory and neurochemistry in middle-aged female mice. *Behavioral Neuroscience* 118:1340-1351.

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Bottner M, Jarry H, Rune GM (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *Journal of Neurochemistry* 97:1136-1144.

Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, Olton DS, Price DL (1995) Age-Related Spatial Reference And Working-Memory Deficits Assessed In The Water Maze. *Neurobiology of Aging* 16:149-160.

Frye CA, Koonce CJ (2009) Post-training administration of estrogen and/or androgens with actions at ERalpha and/or ERbeta to male rats can improve performance in the object recognition task. *Open Neuropsychopharmacology Journal* 2:1876-5238.

Frye CA, Rhodes ME, Dudek B (2005) Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain Research* 1036:101-108.

Gaffan D, Parker A (1996) Interaction of perirhinal cortex with the fornix-fimbria: Memory for objects and "object-in-place" memory. *Journal of Neuroscience* 16:5864-5869.

Galani R, Weiss I, Cassel JC, Kelche C (1998) Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behavioural Brain Research* 96:1-12.

Galea LAM, Lee TTY, Kostaras X, Sidhu JA, Barr AM (2002) High levels of estradiol impair spatial performance in the Morris water maze and increase 'depressive-like' behaviors in the female meadow vole. *Physiology & Behavior* 77:217-225.

Gibbs RB (2000) Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiology of Aging* 21:107-116.

Gilbert PE, Kesner RP (2002) Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behavioral Neuroscience* 116:63-71.

Goldman-Rakic PS (1996) Regional and cellular fractionation of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13473-13480.

Goodman HM (2009) Basic Medical Endocrinology. In: *Basic Medical Endocrinology (Third Edition)*, pp 1-51. San Diego: Academic Press.

Goosens KA, Maren S (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning & Memory* 8:148-155.

Gray TS, Piechowski RA, Yracheta JM, Rittenhouse PA, Bethea CL, Vandekar LD (1993) Ibotenic Acid Lesions In The Bed Nucleus Of The Stria Terminalis Attenuate Conditioned Stress-Induced Increases In Prolactin, Acth And Corticosterone. *Neuroendocrinology* 57:517-524.

Gresack JE, Frick KM (2006) Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 84:112-119.

Hamann SB, Ely TD, Grafton ST, Kilts CD (1999) Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nature Neuroscience* 2:289-293.

Hannesson DK, Pollock MS, Howland JG, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME (2008) Amygdaloid kindling is anxiogenic but fails to alter object recognition or spatial working memory in rats. *Epilepsy & Behavior* 13:52-61.

Heikkinen T, Puolivali J, Tanila H (2004) Effects of long-term ovariectomy and estrogen treatment on maze learning in aged mice. *Experimental Gerontology* 39:1277-1283.

Heikkinen T, Puolivali J, Liu L, Rissanen A, Tanila H (2002) Effects of ovariectomy and estrogen treatment on learning and hippocampal neurotransmitters in mice. *Hormones and Behavior* 41:22-32.

Henderson V (1997) Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease. *Am J Med* 103:11S-18S.

Henderson VW, Benke KS, Green RC, Cupples LA, Farrer LA, Grp MS (2005) Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer's disease risk: interaction with age. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 76:103-105.

Hogervorst E, Bandelow S (2010) Sex steroids to maintain cognitive function in women after the menopause: A meta-analysis of treatment trials. *Maturitas* 66:56-71.

Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WGM, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:865-870.

Hunsaker MR, Rosenberg JS, Kesner RP (2008) The Role of the Dentate Gyrus, CA3a,b, and CA3c for Detecting Spatial and Environmental Novelty. *Hippocampus* 18:1064-1073.

Inagaki T, Gautreaux C, Luine V (2010) Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Hormones and Behavior* 58:415-426.

Izquierdo I (2002) *Memória*. Porto Alegre: Artmed.

Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology* 11:517-534.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research* 103:1-11.

Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Souza TME (1998a) Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory* 69:219-224.

Izquierdo I, Barros DM, Souza TME, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998b) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393:635-636.

Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience* 9:786-793.

Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Souza TME, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH (1998c) Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behavioural Pharmacology* 9:421-427.

Jacobs DM, Tang MX, Stern Y, Sano M, Marder K, Bell KL, Schofield P, Dooneief G, Gurland B, Mayeux R (1998) Cognitive function in nondemented older women who took estrogen after menopause. *Neurology* 50:368-373.

Jenkins TA, Amin E, Pearce JM, Brown MW, Aggleton JP (2004) Novel spatial arrangements of familiar visual stimuli promote activity in the rat hippocampal formation but not the parahippocampal cortices: A c-Fos expression study. *Neuroscience* 124:43-52.

Jo YS, Lee I (2010) Perirhinal cortex is necessary for acquiring, but not for retrieving object–place paired association. *Learning & Memory* 17:97-103.

Joels M, Dekloet ER (1992) Control Of Neuronal Excitability By Corticosteroid Hormones. *Trends in Neurosciences* 15:25-30.

Kaczmarek L (1993) Molecular-Biology Of Vertebrate Learning - Is c-Fos A New Beginning. *Journal of Neuroscience Research* 34:377-381.

Kesner RP, Martinez JL (2007) *Neurobiology of Learning and Memory*, 1^a Edition: Academic Press.

Kim JJ, Lee HJJ, Han JS, Packard MG (2001) Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *Journal of Neuroscience* 21:5222-5228.

Kirschbaum C, Wolf OT, May M, Wippich W, Hellhammer DH (1996) Stress- and treatment-induced elevations of cortisol levels associated with impaired declarative memory in healthy adults. *Life Sciences* 58:1475-1483.

Koganezawa N, Taguchi A, Tominaga T, Ohara S, Tsutsui KI, Witter MP, Iijima T (2008) Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. *Neuroscience Research* 61:172-181.

Kopchia KL, Altman HJ, Commissaris RL (1992) Effects Of Lesions Of The Central Nucleus Of The Amygdala On Anxiety-Like Behaviors In The Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43:453-461.

Korol DL (2004) Role of estrogen in balancing contributions from multiple memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory* 82:309-323.

Kuiper G, Enmark E, Peltola-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5925-5930.

Kukolja J, Thiel CM, Wilms M, Mirzazade S, Fink GR (2009) Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory. *Neurobiology of Aging* 30:630-645.

Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER alpha and ER beta) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of Neurobiology* 36:357-378.

Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM (2010) Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Hormones and Behavior* In Press, Corrected Proof.

Levita L, Muzzio IA (2010) Role of the hippocampus in goal-oriented tasks requiring retrieval of spatial versus non-spatial information. *Neurobiology of Learning and Memory* 93:581-588.

Luine VN, Jacome LF, Maclusky NJ (2003) Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology* 144:2836-2844.

MacLennan AH, Henderson VW, Paine BJ, Mathias J, Ramsay EN, Ryan P, Stocks NP, Taylor AW (2006) Hormone therapy, timing of initiation, and cognition in women aged older than 60 years: the REMEMBER pilot study. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society* 13:28-36.

Maki PM (2006) Hormone therapy and cognitive function: Is there a critical period for benefit? *Neuroscience* 138:1027-1030.

Marcilhac A, Siaud P (1997) Identification of projections from the central nucleus of the amygdala to the paraventricular nucleus of the hypothalamus which are immunoreactive for corticotrophin-releasing hormone in the rat. *Experimental Physiology* 82:273-281.

Markowska AL (1999) Sex dimorphisms in the rate of age-related decline in spatial memory: Relevance to alterations in the estrous cycle. *Journal of Neuroscience* 19:8122-8133.

Matthews K, Cauley J, Yaffe K, Zmuda JM (1999) Estrogen replacement therapy and cognitive decline in older community women. *Journal of the American Geriatrics Society* 47:518-523.

McAsey ME, Cady C, Jackson LM, Li MA, Randall S, Nathan BP, Struble RG (2006) Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: Brain apolipoprotein E and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Experimental Neurology* 197:197-205.

McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews* 20:279-307.

McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004) Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: Region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *Journal of Neuroscience* 24:4134-4144.

McLaughlin KJ, Bimonte-Nelson H, Neisewander JL, Conrad CD (2008) Assessment of estradiol influence on spatial tasks and hippocampal CA1 spines: Evidence that the duration of hormone deprivation after ovariectomy compromises 17 beta-estradiol effectiveness in altering CA1 spines. *Hormones and Behavior* 54:386-395.

Mendez-Lopez M, Mendez M, Lopez L, Arias JL (2009) Sexually dimorphic c-Fos expression following spatial working memory in young and adult rats. *Physiology & Behavior* 98:307-317.

Merchenthaler I, Lane MV, Numan S, Dellovade TL (2004) Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: In vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *Journal of Comparative Neurology* 473:270-291.

Mesches MH, Fleshner M, Heman KL, Rose GM, Diamond DM (1999) Exposing Rats to a Predator Blocks Primed Burst Potentiation in the Hippocampus In Vitro. *The Journal of Neuroscience* 19:5.

Meulenbroek O, Kessels RPC, de Rover M, Petersson KM, Rikkert M, Rijpkema M, Fernandez G (2010) Age-effects on associative object-location memory. *Brain Research* 1315:100-110.

Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M, Murray EA (1993) Effects On Visual Recognition Of Combined And Separate Ablations Of The Entorhinal And Perirhinal Cortex In Rhesus-Monkeys. *Journal of Neuroscience* 13:5418-5432.

Miranda P, Williams CL, Einstein G (1999) Granule cells in aging rats are sexually dimorphic in their response to estradiol. *Journal of Neuroscience* 19:3316-3325.

Moffat GJ, Burns A, Van Miller J, Joiner R, Ashby J (2001) Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34:182-187.

Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research* 26:235-269.

Mumby DG, Pinel JPJ (1994) Rhinal Cortex Lesions And Object Recognition In Rats. *Behavioral Neuroscience* 108:11-18.

Murray EA, Bussey TJ (1999) Perceptual-mnemonic functions of the perirhinal cortex. *Trends in Cognitive Sciences* 3:142-151.

Murty VP, Sambataro F, Das S, Tan HY, Callicott JH, Goldberg TE, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Mattay VS (2009) Age-related Alterations in Simple Declarative Memory and the Effect of Negative Stimulus Valence. *Journal of Cognitive Neuroscience* 21:1920-1933.

Naftolin F, Horvath TL, Jakab RL, Leranth C, Harada N, Balthazart J (1996) Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain - An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology* 63:149-155.

Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, Inukai T (1997) Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17 beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 73:93-96.

Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex* 10:206-219.

Osterlund M, Kuiper G, Gustafsson JA, Hurd YL (1998) Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research* 54:175-180.

Packard MG, Teather LA (1997) Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport* 8:3009-3013.

Paxinos G, Frankling KBJ (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2^a Edition: Academic Press.

Picazo O, Estrada-Camarena E, Hernandez-Aragon A (2006) Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *European Journal of Pharmacology* 530:88-94.

Pihlajamaki M, Tanila H, Kononen M, Hanninen T, Aronen HJ, Soininen H (2005) Distinct and overlapping fMRI activation networks for processing of novel identities and locations of objects. *European Journal of Neuroscience* 22:2095-2105.

Pihlajamaki M, Tanila H, Kononen M, Hanninen T, Hamalainen A, Soininen H, Aronen HJ (2004) Visual presentation of novel objects and new spatial arrangements of objects differentially activates the medial temporal lobe subareas in humans. *European Journal of Neuroscience* 19:1939-1949.

Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences* 20:517-523.

Radwanska K, Valjent E, Trzaskos J, Caboche J, Kaczmarek L (2006) Regulation of cocaine-induced activator protein 1 transcription factors by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroscience* 137:253-264.

Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M (2000) Functional activities of the amygdala: an overview. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 25:14-23.

Resnick SM, Henderson VW (2002) Hormone therapy and risk of Alzheimer disease. *Jama-Journal of the American Medical Association* 288:2170-2172.

Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB (1997) Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory - A possible protective effect? *Neurology* 49:1491-1497.

Rhodes ME, Frye CA (2006) ER beta-selective SERMs produce mnemonic-enhancing effects in the inhibitory avoidance and water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 85:183-191.

Rice MM, Graves AB, McCurry SM, Gibbons LE, Bowen JD, McCormick WC, Larson EB (2000) Postmenopausal estrogen and estrogen-progestin use and 2-year rate of cognitive change in a cohort of older Japanese American women - The Kame Project. *Archives of Internal Medicine* 160:1641-1649.

Rudick CN, Woolley CS (2000) Estradiol induces a phasic fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus* 10:274-283.

Sah P, Faber ESL, De Armentia ML, Power J (2003) The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews* 83:803-834.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21:55-89.

Sarkaki A, Amani R, Badavi M, Safahani M, Aligholi H (2008) Effect of Ovariectomy on Reference Memory Version of Morris Water Maze in Young Adult Rats. *Iranian Biomedical Journal* 12.

Sherwin BB (1994) Sex-Hormones And Psychological Functioning In Postmenopausal Women. *Experimental Gerontology* 29:423-430.

Sherwin BB (2003) Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocrine Reviews* 24:133-151.

Shughrue PJ, Merchenthaler I (2001) Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 436:64-81.

Silva ACJSR, De Sá MFS (2006) Efeitos dos esteróides sexuais sobre o humor e a cognição. 33.

Simons JS, Spiers HJ (2003) Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Reviews Neuroscience* 4:637-648.

Singh GK, Kochanek KD, MacDorman MF (1996) Advance report of final mortality statistics, 1994. *Monthly vital statistics report* 45.

Soetanto A, Wilson RS, Talbot K, Un A, Schneider JA, Sobiesk M, Kelly J, Leurgans S, Bennett DA, Arnold SE (2010) Association of Anxiety and Depression With Microtubule-Associated Protein 2-and Synaptopodin-Immunolabeled Dendrite and Spine Densities in Hippocampal CA3 of Older Humans. *Archives of General Psychiatry* 67:448-457.

Squire LR, Zolamorgan S (1991) The Medial Temporal-Lobe Memory System. *Science* 253:1380-1386.

Squire LR, Stark CEL, Clark RE (2004) The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 27:279-306.

Strauss JF, Barbieri RL (2004) *Reproductive endocrinology*, 5^a Edition: Elsevier Saunders.

Strekalova T, Zorner B, Zacher C, Sadovska G, Herdegen T, Gass P (2003) Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain and Behavior* 2:3-10.

Suzuki WA, Miller EK, Desimone R (1997) Object and place memory in the macaque entorhinal cortex. *Journal of Neurophysiology* 78:1062-1081.

Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends in Neurosciences* 21:323-331.

Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. *Organization of memory*. New York: Academic press:381-403.

Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000) Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *Journal of Neuroscience* 20:2711-2718.

Vasconcellos APS, Tabajara AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaz C (2003) Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiology & Behavior* 79:143-149.

Voytko ML, Higgs CJ, Murray R (2008) Differential effects on visual and spatial recognition memory of a novel hormone therapy regimen of estrogen alone or

combined with progesterone in older surgically menopausal monkeys. *Neuroscience* 154:1205-1217.

Walf AA, Frye CA (2006) A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology* 31:1097-1111.

Walf AA, Rhodes ME, Frye CA (2006) Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 86:35-46.

Wallace M, Luine V, Arellanos A, Frankfurt M (2006) Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Research* 1126:176-182.

Wan HM, Aggleton JP, Brown MW (1999) Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *Journal of Neuroscience* 19:1142-1148.

Wang J, Cheng CM, Zhou J, Smith A, Weickert CS, Perlman WR, Becker KG, Powell D, Bondy CA (2004) Estradiol alters transcription factor gene expression in primate prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Research* 76:306-314.

Watson RE, Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE (1986) Use Of Cryoprotectant To Maintain Long-Term Peptide Immunoreactivity And Tissue Morphology. *Peptides* 7:155-159.

Wilson IA, Puolivali J, Heikkinen T, Riekkinen P (1999) Estrogen and NMDA receptor antagonism: effects upon reference and working memory. *European Journal of Pharmacology* 381:93-99.

Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *Journal of Neuroscience* 24:5901-5908.

Woodhall GL, Bailey SJ, Thompson SE, Evans DLP, Jones RSG (2005) Fundamental differences in spontaneous synaptic inhibition between deep and superficial layers of the rat entorhinal cortex. *Hippocampus* 15:232-245.

Woolley CS, Gould E, McEwen BS (1990) Exposure To Excess Glucocorticoids Alters Dendritic Morphology Of Adult Hippocampal Pyramidal Neurons. *Brain Research* 531:225-231.

Wright RL, Conrad CD (2005) Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Y-maze. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 8:151-154.

Xu XH, Zhang ZG (2006) Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sciences* 79:1553-1560.

Yaffe K, Haan M, Byers A, Tangen C, Kuller L (2000) Estrogen use, APOE, and cognitive decline - Evidence of gene-environment interaction. *Neurology* 54:1949-1953.

Yamada K, Tanaka T, Zou LB, Senzaki K, Yano K, Osada T, Ana O, Ren XH, Kameyama T, Nabeshima T (1999) Long-term deprivation of oestrogens by ovariectomy potentiates beta-amyloid-induced working memory deficits in rats. *British Journal of Pharmacology* 128:419-427.

Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JCS, Cache County Memory Study I (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women - The Cache County Study. *Jama-Journal of the American Medical Association* 288:2123-2129.

Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW (1996) Mapping visual recognition memory through expression of the immediate early gene c-Fos . *Neuroreport* 7:1871-1875.