

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

Luciana Cosenza Castro

BASES NEURAIS DA ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL DE PÓS-MENOPAUSA

BELO HORIZONTE

2017

BASES NEURAIS DA ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL DE PÓS-MENOPAUSA

Luciana Cosenza Castro

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes

Agências financiadoras: CAPES, FAPEMIG, CNPq

BELO HORIZONTE

2017

043 Castro, Luciana Cosenza.
Bases neurais da ansiedade em modelo animal de pós-menopausa
[manuscrito] / Luciana Cosenza Castro. - 2017.

154 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Menopausa - Teses. 2. Ansiedade - Teses. 3. Ovariectomia - Teses. 4. Estrogênios - Teses. 5. Progesterona - Teses. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

"BASES NEURAIS DA ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL DE PÓS-MENOPAUSA"

LUCIANA COSENZA CASTRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 15 de setembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. FABRICIO DE ARAUJO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. FERNANDO MARCOS DOS REIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. GRÁCE SCHENATTO PEREIRA MORAES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 15 de setembro de 2017

Dedico este trabalho ao Léo e à Ana que com enorme disponibilidade, competência e carinho tornaram minha caminhada mais alegre, leve e segura.

“Somos a resposta exata do que a gente perguntou.”

Raul Seixas

Agradecimentos

Vendo este trabalho realizado percebo o quanto tenho a agradecer!

Agradeço, antes de tudo, à Grace, pela oportunidade de fazer parte do NNC, pela valiosa orientação e pelo convívio. Sua postura profissional e a corajosa demonstração de sua maneira de ser no mundo vêm me formando profissionalmente e me tornando uma pessoa melhor. Saiba que tenho em você um grande exemplo!

À minha mãe, toda minha gratidão pela vida, pelo apoio em todas as horas, por todo incentivo nessa trajetória e, principalmente, pela oportunidade de estudar tudo que tive vontade! Acho que meu desejo de seguir seus passos já diz tudo!

À minha família, pelo apoio incondicional e irrestrito, especialmente ao tio Ramon, pelo grande exemplo e pelo melhor “vai que estou te vendo” que já recebi em toda vida! Ao Hique, que me convenceu que eu era capaz, evitou inúmeras vezes que me perdesse na UFMG e no ICB, além de revisar todos os meus textos!

Aos meus animais de estimação, que são também família, e tornam minha vida muito mais leve e cheia de amor.

Aos irmãos do CIC e demais amigos que reconheci pela vida, por serem sempre meu porto seguro e me lembrarem, todas as vezes que preciso, quem sou.

Ao Lu, que pacientemente ouviu e compartilhou do meu interesse pelas neurociências, além de me incentivar e ajudar em percalços técnicos durante este trabalho.

À música e a dança, que, desde sempre, preenchem minha vida.

Aos professores do NNC, Márcio Moraes, Bruno Rezende, André Massensini, Juliana Tavares e Cleiton Aguiar, que se mostraram sempre tão disponíveis, trazendo inúmeras contribuições a este trabalho! E que nos mostram, no dia-a-dia, o valor da amizade e do trabalho em equipe!

A todos os funcionários do departamento que, à sua maneira, tornam nosso trabalho possível, além de alegrar nossos dias com conversas nos corredores!

À Paola, pelas incontáveis horas de conversas, trabalhos em grupo e companhia mestrado afora! Pela ajuda no experimento mais tenso de todos e, claro,

por ter criticado meu casaco sem sequer me conhecer, abrindo as portas pra nossa amizade!

Por fim e não menos importante, aos colegas de laboratório que sempre contribuíram, com ideias, incentivos, companhia, ou conversas aleatórias em momentos de cansaço! A solidariedade, o companheirismo, a torcida mútua e, lógico, o bom humor de vocês deu um sentido muito mais especial a esta jornada!

Em especial:

À Ana Luíza, pela primeira acolhida e por ter me mandando o material para estudo que me possibilitou chegar até aqui!

À Cris, pelos inúmeros ensinamentos e, principalmente, por ter tido a ideia desse trabalho que abracei com tanto carinho.

À Luciana M. (Original), sempre tão disponível, pelas aulas de memória, ajudas nos experimentos e dúvidas!

À Lara e à Thaís, por terem se prontificado em ajudar, em momentos de grande desespero! Muitíssimo obrigada, meninas!

À Sasha, uma parceira silenciosa que sempre me apoiou!

Ao Flávio, por todos os valiosos e detalhados ensinamentos e pela paciência ao me acolher em momentos de dúvidas, minha mais profunda admiração!

À Ana Flavia, que substituiu a presença física da Grace com maestria, resolvendo todos os nossos problemas!

À Laura e ao Matheus, por tornarem meus dias sempre tão divertidos.

À Ana e ao Léo, me faltam palavras para agradecer primeiro, e, mais importantes, pela amizade que cultivamos e carinho que me afiliaram, pelas inúmeras discussões e dúvidas esclarecidas, pelas orientações e ajudas nos experimentos e análises, pelos projetos futuros... e por tão mais que diante da impossibilidade de agradecer, dedico a vocês este trabalho e esta conquista!

Sumário

Lista de figuras	07
Lista de tabelas	10
Listas de abreviações	11
Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	16
1.1. Menopausa.....	16
1.1.2. Menopausa e ansiedade.....	18
1.1.3. Modelo animal de menopausa.....	22
1.2. Esteróides Sexuais.....	24
1.3. Transtornos de ansiedade.....	32
1.3.1. Esteróides sexuais e Transtornos de Ansiedade.....	38
1.3.1.1. Estrógenos e ansiedade.....	40
1.3.1.2. Progesterona e ansiedade.....	41
1.4. Comportamento tipo-ansioso em roedores.....	42
1.5. Bases neurais da ansiedade.....	45
1.5.1. Detecção dos estímulos sensoriais.....	45
1.5.2. Interpretação dos estímulos sensoriais.....	46
1.5.2.1. Amígdala.....	47
1.5.2.1.1. Microcircuito da Amígdala.....	48
1.5.2.2. Núcleo do leito da estria terminal.....	49
1.5.2.2.1. Microcircuito do Núcleo do leito da estria terminal.....	50
1.5.2.3. Hipocampo Ventral.....	52
1.5.3. Avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais.....	53
1.5.3.1. Córtex Pré-Frontal Medial.....	53
1.5.3.2. Área Tegmental Ventral.....	55
1.5.3.3. Área Hipotalâmica Lateral.....	56
1.5.4. Iniciação da resposta relacionada à ansiedade.....	57
1.5.4.1. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.....	57

1.5.4.2. Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.....	58
1.5.4.3. Substância Cinzenta Periaquedutal.....	59
1.5.4.4. Núcleo Parabraquial.....	59
2. Justificativa.....	62
3. Objetivos.....	64
3.1. Objetivos gerais.....	64
3.2. Objetivos específicos.....	64
4. Materiais e métodos.....	65
4.1. Animais experimentais.....	65
4.2. Cirurgia de ovariectomia.....	65
4.3. Avaliação do ciclo estral por esfregaço vaginal.....	67
4.4. Tarefas comportamentais.....	68
4.4.1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	68
4.4.2. Teste da caixa de atividade locomotora.....	69
4.4.3. Teste de ocultar esferas.....	70
4.4.4. Teste transição claro-escuro.....	71
4.4.5. Teste de neofagia.....	71
4.4.6. Teste do campo aberto.....	72
4.4.7. Teste do labirinto em cruz elevado modificado.....	73
4.5. Droga e tratamento farmacológico.....	74
4.6. Imunohistoquímica.....	75
4.7. Análise das imagens.....	76
4.8. Delineamento experimental.....	79
4.9. Análise estatística.....	83
5. Resultados.....	84
5.1. Modelo animal de pós-menopausa apresenta maior ganho de peso ao longo de 12 semanas de ovariectomia.....	84
5.2. Modelo animal de pós-menopausa apresenta fenótipo ansioso.....	84
5.2.1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	85

5.2.2. Teste da transição claro-escuro.....	88
5.2.3. Teste do campo aberto.....	89
5.2.4. Teste da caixa de atividade locomotora.....	91
5.2.5. Modelo animal de pós-menopausa apresenta fenótipo compulsivo.....	92
5.2.6. Modelo animal de pós-menopausa se comporta como os animais controle no teste de neofagia.....	93
5.2.7. Resumo dos resultados dos testes comportamentais do primeiro bloco de experimentos.....	94
5.3. O fenótipo ansioso de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas é sensível ao Diazepam.....	94
5.3.1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	95
5.3.2. Teste da caixa claro-escuro.....	97
5.3.3. Teste do campo aberto.....	98
5.3.4. Resumo dos resultados dos testes comportamentais do segundo bloco de experimentos.....	100
5.4. Animais ovariectomizados por 12 semanas respondem diferentemente a um evento potencialmente ansiogênico e sem escapatória.....	100
5.4.1. Teste do labirinto em cruz elevado modificado.....	100
5.4.2. Resumo dos resultados do teste comportamental do terceiro bloco de experimentos.....	104
5.5. Expressão de Fos nas áreas cerebrais relacionadas à ansiedade.....	105
5.5.1. Regiões de Interpretação dos estímulos sensoriais.....	105
5.5.1.1. Amígdala.....	105
5.5.1.1.1. Amígdala Basolateral.....	105
5.5.1.1.2. Amígdala Central.....	107
5.5.1.2. Núcleo do Leito da Estria Terminal.....	108
5.5.1.2.1. Porção Oval do Núcleo do Leito da Estria Terminal.....	108
5.5.1.2.2. Porção Anterodorsal do Núcleo do Leito da Estria Terminal.....	109
5.5.1.3. Hipocampo Ventral.....	110
5.5.1.3.1. Giro Denteado.....	110
5.5.1.3.2. CA1.....	111
5.5.1.3.3. CA2.....	112
5.5.1.3.4. CA3.....	113
5.5.1.4. Hipocampo Dorsal.....	114

5.5.1.4.1. Giro Denteado.....	114
5.5.1.4.2. CA1.....	116
5.5.1.4.2. CA2.....	117
5.5.1.4.3. CA3.....	118
5.5.2. Regiões de avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais.....	119
5.5.2.1. Córtex Pré-Frontal Medial.....	119
5.5.2.1.1. Pré-Límbico.....	119
5.5.2.1.2. Infra-Límbico.....	120
5.5.2.2. Área Tegmental Ventral.....	121
5.5.2.3. Área Hipotalâmica Lateral.....	123
5.5.3. Regiões de iniciação da resposta relacionada à ansiedade.....	124
5.5.3.1. Núcleo Ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal.....	124
5.5.3.2. Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.....	125
5.5.3.3. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.....	126
5.5.4. Resumo dos resultados da expressão de Fos.....	127
6. Discussão.....	128
7. Conclusão.....	139
8. Referências Bibliográficas.....	140
9. Anexo I.....	155

Lista de Figuras

Figura 01: Gráfico das flutuações hormonais no ciclo reprodutivo de roedores e humanos.....	27
Figura 02: Figura esquemática da síntese de esteróides sexuais nos ovários.....	28
Figura 03: Figura esquemática da síntese de neuroesteróides.....	30
Figura 04: Figura esquemática do modelo estrutural do capítulo do DSM-V dedicado aos transtornos de ansiedade.....	33
Figura 05: Figura esquemática do microcircuito da Amígdala envolvido no processamento da ansiedade.....	49
Figura 06: Figura esquemática do microcircuito do núcleo do leito da estria terminal envolvido no processamento da ansiedade.....	51
Figura 07: Figura esquemática do macrocircuito envolvido no processamento da ansiedade.....	61
Figura 08: Imagem representativa e figura esquemática da cirurgia de ovariectomia.....	66
Figura 09: Imagem representativa de esfregaço vaginal em cada fase do ciclo estral.....	67
Figura 10: Figura esquemática do teste do labirinto em cruz elevado.....	69
Figura 11: Figura esquemática do teste de atividade locomotora.....	70
Figura 12: Figura esquemática do teste de ocultar esferas.....	70
Figura 13: Figura esquemática do teste de transição claro-escuro.....	71
Figura 14: Figura esquemática do teste de neofagia.....	72
Figura 15: Figura esquemática do teste do Campo Aberto.....	73
Figura 16: Figura esquemática do labirinto em cruz elevado modificado como estímulo ansiogênico.....	74
Figura 17: Escala das imagens para a quantificação de células marcadas.....	77
Figura 18: Subtração do ruído de fundo.....	77
Figura 19: Delimitação do tamanho da partícula a ser considerada.....	78
Figura 20: Contagem das partículas.....	78
Figura 21: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº1.....	79
Figura 22: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº2.....	80
Figura 23: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº3.....	82
Figura 24: Esquema das áreas cerebrais cuja ativação neural foi avaliada por meio da expressão de Fos pela técnica de imunohistoquímica.....	82
Figura 25: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no ganho de peso dos animais.....	84
Figura 26: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste do labirinto em cruz elevado.....	87

Figura 27: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da caixa claro-escuro.....	88
Figura 28: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste do campo aberto.....	90
Figura 29: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da caixa de atividade locomotora.....	91
Figura 30: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade e compulsão de acordo com o teste de enterrar esferas na maravalha.....	92
Figura 31: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da neofagia.....	93
Figura 32: Gráfico do efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste do labirinto em cruz elevado.....	96
Figura 33: Gráfico do efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste da caixa claro-escuro.....	98
Figura 34: Gráfico do efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste do campo aberto.....	99
Figura 35: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste de exploração do aparato em tarefa aversiva.....	102
Figura 36: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de medidos através de comportamentos etológicos em tarefa aversiva.....	103
Figura 37: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da amígdala basolateral.....	106
Figura 38: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da amígdala central.....	107
Figura 39: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção oval do núcleo leito da estria terminal.....	109
Figura 40: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção oval anterodorsal do núcleo leito da estria terminal.....	110
Figura 41: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do giro denteado do hipocampo ventral.....	111
Figura 42: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA1 do hipocampo ventral.....	112
Figura 43: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA2 do hipocampo ventral.....	113

Figura 44: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA3 do hipocampo ventral.....	114
Figura 45: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do giro denteado do hipocampo dorsal.....	115
Figura 46: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA1 do hipocampo dorsal.....	116
Figura 47: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA2 do hipocampo dorsal.....	117
Figura 48: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA3 do hipocampo dorsal.....	118
Figura 49: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção pré límbica do córtex pré-frontal medial.....	120
Figura 50: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial.....	121
Figura 51: Gráfico do efeito Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da área tegmental ventral.....	122
Figura 52: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da área hipotalâmica lateral.....	123
Figura 53: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal.....	125
Figura 54: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo dorsomedial do hipotálamo.....	126
Figura 55: Gráfico do efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo.....	127
Figura 56: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade do grupo OVX em relação ao Sham em condição basal.....	131
Figura 57: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade no grupo OVX em relação ao Sham e OVX em condição ansiogênica.....	135
Figura 58: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade no grupo OVX em relação ao Sham condição basal e ansiogênica.....	136

Lista de Tabelas

Tabela 01:	<i>Prevalência de e ansiedade distribuída nas fases do climatério, em participantes no Study of Women's Health Across the Nation.....</i>	20
Tabela 02:	<i>Prevalência de transtornos depressivos e ansiosos em uma amostra ambulatorial do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Kırıkkale....</i>	21
Tabela 03:	<i>Prevalência de depressão e ansiedade distribuída nas fases do climatério, em pacientes atendidas no HU/UFJF.....</i>	22
Tabela 04:	<i>Resumo dos resultados dos testes comportamentais do primeiro bloco de experimentos.....</i>	94
Tabela 05:	<i>Resumo dos resultados dos testes comportamentais do segundo bloco de experimentos.....</i>	100
Tabela 06:	<i>Resumo dos resultados dos testes comportamentais do terceiro bloco de experimentos.....</i>	104
Tabela 07:	<i>Resumo dos resultados da expressão de Fos.....</i>	130
Tabela 08:	<i>Efeitos dos hormônios ovarianos na ingesta alimentar e adiposidade.....</i>	132

Lista de Abreviações

3β-HSD	<i>3β-dehidrogenase</i>
5-HT	<i>Receptor de serotonina 5-hydroxitriptamina</i>
17 β-HSD	<i>17 β-hidroxisteroide dehidrogenase</i>
a.C	<i>Antes de Cristo</i>
adBNST	<i>(Anterodorsal bed nucleus of the stria terminalis) Núcleo do leito da estria terminal anterodorsal</i>
ADT	<i>Antidepressivos tricíclicos</i>
AgRP	<i>Agouti-related peptide</i>
AMY	<i>(Amygdala) Amígdala</i>
ANOVA	<i>Análise de variância</i>
ARC	<i>Núcleo arqueado do hipotálamo</i>
BLA	<i>(Basolateral Amygdala) Amígdala Basolateral</i>
BNST	<i>(Bed nucleus of the stria terminalis) Núcleo do leito da estria terminal</i>
c-Fos	<i>Gene de expressão imediata c-Fos</i>
CA1	<i>Região CA1 do hipocampo</i>
CA2	<i>Região CA2 do hipocampo</i>
CA3	<i>Região CA3 do hipocampo</i>
CCE	<i>Caixa claro-escuro</i>
CeA	<i>(Central Amygdala) Amígdala Central</i>
CeL	<i>(Latero-capsular subdivision of the central amygdala) Porção lateral da amígdala central</i>
CeM	<i>(Medial subdivision of the central amygdala) Porção medial da amígdala central</i>
cm	<i>centímetros</i>
CRFR	<i>receptor do fator de liberação de corticotropina</i>
d	<i>Dia</i>
DAB	<i>Diaminobenzidina</i>
DHEA	<i>Desidroepiandrosterona</i>
dHPC	<i>(Dorsal hippocampus) Hipocampo dorsal</i>
DIU	<i>Dispositivo Intra-Uterino</i>
DMH	<i>(Dorsomedial hypothelamic nucleus) Núcleo hipotalâmico dorsomedial</i>
DSM	<i>Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais</i>
E₁	<i>Estrona</i>
E₂	<i>17β-estradiol</i>
ERs	<i>Receptores de estrogênios</i>
ERα	<i>Receptor de estrogênio alfa</i>
ERβ	<i>Receptor de estrogênio beta</i>
ERS1	<i>Receptor de estrogênio alfa</i>
ERS2	<i>Receptor de estrogênio beta</i>

FCE	<i>Fluido cerebrospinal</i>
FOS	<i>Expressão proteica do gene de expressão imediata c-Fos</i>
FSH	<i>(Follicle-stimulating hormone) Hormônio folículo-estimulante</i>
GABA	<i>Ácido gama-aminobutírico</i>
GAD	<i>(Generalized anxiety disorder) Transtorno de ansiedade generalizada</i>
GnRH	<i>(Gonadotropin-releasing hormone) Hormônio liberador de gonadotrofinas</i>
GPR30	<i>Receptor de estrogênio acoplado à proteína G</i>
H₂O₂	<i>Peróxido de Hidrogênio</i>
HL	<i>(Lateral Hypothalamus) Hipotálamo Lateral</i>
HPA	<i>Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal</i>
HPC	<i>(Hippocampus) Hipocampo</i>
HPO	<i>Eixo hipotálamo-pituitária-ovário</i>
HU	<i>Hospital Universitário</i>
Hyp	<i>(Hypothalamus) Hipotálamo</i>
IBGE	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
IL	<i>(Infralimbic) Infra-límbico</i>
i.p.	<i>Intra-peritoneal</i>
ISRS	<i>Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina</i>
Kg	<i>Quilogramas</i>
LCE	<i>Labirinto em cruz elevado</i>
LCEm	<i>Labirinto em cruz elevado modificado</i>
LH	<i>(Luteinizing hormone) Hormônio luteinizante</i>
M	<i>Molar</i>
MCH	<i>Hormônio de concentrador de melanina</i>
mg	<i>Miligramas</i>
mIU	<i>Mili unidade internacional</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mm	<i>Milímetros</i>
mPFC	<i>(Medial prefrontal cortex) Córtex pré-frontal medial</i>
nº	<i>Número</i>
ng	<i>Nanograma</i>
NGS	<i>(Normal goat serum) Soro de cabra normal</i>
NPY	<i>Neuropeptídeo Y</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
OPT	<i>(Open field test) Teste do campo aberto</i>
ovBNST	<i>(Oval bed nucleus of the stria terminalis) Núcleo do leito da estria terminal oval</i>
OVX	<i>Ovariectomia</i>
P45017α	<i>17α-hidroxilase</i>
P450Arom	<i>P450 aromatase</i>
P450scc	<i>Enzima de clivagem da cadeia lateral contendo citocromo</i>
PAG	<i>(Periaqueductal gray) Substância Cinzenta Periaqueductal</i>
PB	<i>(Parabrachial nucleus) Núcleo Parabraquial</i>
PBS	<i>(Phosphate buffered saline) Tampão fosfato salina</i>

PFA	<i>Paraformaldeído</i>
PL	<i>(Prelimbic) Pré-límbico</i>
pg	<i>Picograma</i>
PVN	<i>Paraventricular nucleus of hypothalamus</i>
PVP	<i>Polivinilpirrolidona</i>
PVPI	<i>Polivinilpirrolidona Iodo</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>
STAI	<i>(State-Trait Anxiety Inventory) Inventário de estado-traço de ansiedade</i>
SWAN	<i>(Study of Women's Health Across the Nation) Estudo sobre a saúde das mulheres em toda a nação</i>
TCC	<i>Terapia cognitivo-comportamental</i>
THP	<i>Tetra-hidroxiprogesterona</i>
UFJF	<i>Universidade Federal de Juiz de Fora</i>
UFMG	<i>Universidade Federal de Minas Gerais</i>
VTA	<i>(Ventral tegmental area) Área tegmental ventral</i>
vBNST	<i>(Ventral bed nucleus of the stria terminalis) Núcleo do leito da estria terminal ventral</i>
VCD	<i>diepóxido 4-vinilciclohexeno</i>
vHPC	<i>(Ventral hippocampus) Hipocampo ventral</i>
°C	<i>Graus Celsius</i>
µg	<i>Micrograma</i>
µl	<i>Microlitro</i>
µm	<i>Micrômetro</i>

Resumo

Durante a menopausa, as alterações hormonais são acompanhadas por deficiência cognitiva, ondas de calor e mudanças de humor, sendo a ansiedade um dos distúrbios mais comuns. Entretanto, pouco se sabe sobre a base neurobiológica da ansiedade induzida pela menopausa. No presente estudo, validamos um modelo animal de ansiedade na pós-menopausa. Além disso, investigamos o padrão de ativação neural, através da expressão da proteína Fos, em áreas cerebrais de circuitos relacionados à ansiedade, após exposição a um evento altamente ansiogênico. Nossos resultados demonstraram que 12 semanas de ovariectomia (OVX) levaram a um aumento de peso e desencadearam comportamentos tipo-ansiosos medidos através de diversos paradigmas comportamentais em fêmeas C57BL/6. Demonstramos ainda que o tratamento agudo com diazepam teve efeito ansiolítico no modelo OVX, sem exercer efeito sedativo em nenhum dos testes realizados. Interessantemente, observamos que a excitabilidade basal de áreas potencialmente ansiogênicas estão aumentadas nas fêmeas OVX. Em contrapartida, em áreas de processamento de informações sensoriais, como amígdala e hipocampo, a excitabilidade basal está diminuída. Além disso, o padrão de ativação neural em resposta a evento ansiogênico foi diferente em fêmeas OVX, comparado com animais controle. Em conjunto, nossos resultados indicam que o modelo de OVX é apropriado para o estudo da ansiedade induzida pela pós-menopausa. Além disso, o presente estudo ajuda a esclarecer as bases neurais da ansiedade induzida pela menopausa.

Palavras chave: OVX, hormônios ovarianos, ansiedade, Fos

Abstract

In addition to the hormonal changes, cognitive deficits, hot flashes and mood disorders are common during the menopause, being anxiety one of the most common. However, it is still to be determined the neurobiological basis of menopause-induced anxiety. In the present study, we validated an animal model of postmenopausal anxiety. We also verified the pattern of Fos expression in brain areas related to anxiety neural circuits, after exposing animals to a highly anxiogenic event. Our results demonstrated that 12 weeks of ovariectomy (OVX) led to weight gain and triggered anxious-like behaviors measured through distinct behavioral paradigms in C57BL/6 female mice. We also showed that the acute treatment with diazepam had anxiolytic effect in the OVX model, without exerting a sedative effect in any of the tests performed. Interestingly, we observed that Fos expression in potentially anxiogenic areas are increased in OVX females. In contrast, sensory processing areas, such as amygdala and hippocampus, showed lower Fos expression in naïve OVX animals. In addition, the pattern of neural activation in response to anxiogenic event was different in OVX females compared to control animals. Taken together, our results indicate that the OVX model is appropriate for the study of postmenopausal-induced anxiety and shed light on the neural basis of menopause-induced anxiety.

Key words: OVX, ovarian hormones, anxiety, c-fos

1. Introdução

1.1 Menopausa

Embora pouca atenção tenha sido dispensada à menopausa até o início do século passado, referências a respeito deste período do ciclo reprodutivo feminino já eram descritas por Aristóteles (384-322 a.C.) (LORENZI, et. al., 2006). Possivelmente, o escasso interesse a respeito deste assunto se devia à menor expectativa de vida e, por consequência, ao baixo número de mulheres que vivenciavam esta etapa.

No entanto, a partir da segunda metade do século XX, significativos avanços tecnológicos permitiram amplas ações para promoção e proteção da saúde, propiciando um progressivo aumento na expectativa de vida da população. A partir de então, cresce o interesse pelas questões relacionadas ao envelhecimento e à qualidade de vida na terceira idade (WALF et. al., 2010, revisado por RENÓ, 2004; LORENZI, et. al., 2006).

De acordo com os dados do Censo do ano 2000, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população brasileira vive em média 68,6 anos sendo, na diferenciação de gêneros, 64,8 anos para os homens e 72,6 anos para as mulheres (RENÓ, 2004). Especificamente, mulheres com mais de 40 anos correspondiam a 32% da população feminina do país, número esse que aumentou para aproximadamente 43% em 2015 (LORENZI, et. al., 2006). Considerando que a perimenopausa começa, geralmente, entre os 45 e 47 anos e possui duração média de quatro anos até o estabelecimento da menopausa, um contingente cada vez maior de mulheres viverá um tempo significativo no período pós-menopausal (RENÓ, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a perimenopausa como o período compreendido entre dois e oito anos que precede a menopausa (RENÓ, 2004). Este é caracterizado por ciclos menstruais irregulares, flutuações anormais nos níveis dos hormônios reprodutivos, declínio da fertilidade, além de sintomas

vasomotores, insônia e transtornos de humor (DALAL & AGARWAL, 2015; PICAZO et. al., 2006; RENÓ, 2004; LORENZI, et. al., 2006). A menopausa, por sua vez, se caracteriza pela interrupção definitiva dos ciclos menstruais devido à perda da função ovariana (DALAL & AGARWAL, 2015). Completado doze meses após a última menstruação tem início o período da pós-menopausa, caracterizado pela acentuada depleção dos hormônios ovarianos estrógeno e progesterona (GUIMARÃES, et.al., 2015; PICAZO et. al., 2006; DALAL & AGARWAL, 2015).

Acredita-se que o momento de ocorrência da menopausa é geneticamente determinado sem interferência de fatores raciais, socioeconômicos ou idade da menarca. No entanto, agressões ao tecido ovariano decorrentes de fatores ambientais como traumas ou exposição a agentes tóxicos podem adiantar seu aparecimento (DALAL & AGARWAL, 2015).

Sabe-se pouco sobre o mecanismo neuroregulador que inicia o processo de transição para a menopausa. Embora a perda do caráter cíclico da função ovariana coincida com as alterações da secreção pulsátil das gonadotrofinas, acredita-se que a menopausa provavelmente se inicia não por uma causa central, mas devido à falência ovariana, uma vez que os ovários perdem a capacidade de responder aos hormônios hipofisários Folículo Estimulante (FSH) e Luteinizante (LH) (DALAL & AGARWAL, 2015; RENÓ, 2004). Tendo em vista que os ovários são a única fonte de oócitos das mulheres, além de serem a principal fonte de estrógeno, progesterona e andrógenos, a menopausa resulta em infertilidade e em uma interrupção na produção destes hormônios. Diante da ausência de feedback negativo dos hormônios ovarianos, na tentativa de compensar a deficiência na diferenciação e maturação do folículo, os níveis dos hormônios hipofisários aumentam (DALAL & AGARWAL, 2015; RENÓ, 2004). No entanto, mulheres na menopausa ainda apresentam baixos níveis de hormônios ovarianos circulantes, principalmente devido a uma aromatização periférica dos andrógenos produzidos pelos ovários e pelas glândulas adrenais (DALAL & AGARWAL, 2015).

A menopausa é descrita como uma situação de deficiência hormonal associada a uma grande variedade de sintomas físicos e psicológicos. Estima-se que 50% a 70% das mulheres na menopausa manifestem sintomas somáticos e dificuldades emocionais. Durante a menopausa, alterações hormonais são

acompanhadas de ondas de calor, atrofia urogenital, osteoporose, aumento do risco de desenvolvimento de tumores, de complicações cardiovasculares, insônia, declínio cognitivo, e sintomas psiquiátricos (DALAL & AGARWAL, 2015; LORENZI, et. al., 2006; PICAZO et. al., 2006; RENÓ, 2004; SAGSÖZ; et al, 2001).

Fatores extrínsecos tais como estilo de vida, atividade profissional, exercícios físicos e dieta podem determinar diferenças no aparecimento e na intensidade destes sintomas (RENÓ, 2004). Aspectos socioculturais são também relevantes na gênese destas manifestações. Deve-se considerar que a menopausa é uma fase de transição física e social, coincidindo com a aposentadoria, independência dos filhos, a morte de amigos e familiares, dentre outras circunstâncias que requerem ajustes emocionais delicados. Uma maior tendência a transtornos de humor tem sido atribuída ao medo de envelhecer e à percepção de proximidade da morte. As consequências indesejáveis da menopausa, principalmente as emocionais, se apresentam menos intensas entre as mulheres que associam a este período à maior maturidade e autoconfiança (LORENZI, et. al., 2006; RENÓ, 2004).

1.1.2 *Menopausa e ansiedade*

A causalidade de transtornos de humor como depressão e ansiedade na menopausa é foco de controvérsias. Em uma perspectiva neuroendócrina, acredita-se que as flutuações hormonais decorrentes da falência ovariana são as responsáveis pelas alterações do humor. Já alguns pesquisadores direcionados a uma perspectiva psicossocial argumentam que transtornos de humor iniciados na menopausa não ocorrem devido às flutuações hormonais, mas devido às mudanças no meio social inerentes desta fase da vida como separação, síndrome do ninho vazio, doença ou morte de familiares, aposentadoria e diminuição de renda (POLLISSENI, et al., 2009).

A ansiedade é um termo geral que se refere a sintomas diversos característicos de diferentes transtornos, dentre eles o transtorno de pânico, fobia social ou ansiedade generalizada. Essa heterogeneidade dos sintomas resumida a

um só termo é refletida na literatura e na clínica, que incluem diversas medidas de sintomas de ansiedade como "irritabilidade", "tensão", "nervosismo" ou "sentimento de pânico", dificultando não só a comparação entre estudos, mas também o próprio diagnóstico. Para minimizar este problema, manuais internacionais de diagnósticos vêm sendo adotados e, a partir deles, diversas escalas que são utilizadas para padronizar a linguagem e os sintomas avaliados no momento da entrevista clínica. A ausência de achados consistentes quanto às associações entre ansiedade e a menopausa é, provavelmente, devido à avaliação de diferentes sintomas, projetos de estudo e populações estudadas (BROMBERGER et al., 2013).

Um estudo desenvolvido por Bromberger e colaboradores no ano de 2013 com dados coletados de participantes no Study of Women's Health Across the Nation (SWAN), uma comunidade longitudinal e multi-étnica voltada para o estudo da menopausa e do envelhecimento envolvendo 3.302 mulheres, concluiu que a prevalência de sintomas de ansiedade em mulheres da meia-idade é substancial. Neste estudo, a ansiedade basal das mulheres participantes foi primeiramente avaliada através de uma escala de ansiedade e, em seguida, a mesma escala foi reaplicada por diversas vezes em visitas realizadas ao longo do tempo.

Mulheres na pré-menopausa apresentaram-se com sintomas de ansiedade em 15,6% das visitas. Mulheres no início do período de menopausa em 20,7% das visitas, já mulheres próximas ao período da pós-menopausa em 20,2% das visitas. Por fim, mulheres na pós-menopausa apresentaram-se com sintomas de ansiedade em 18,1% das visitas. Estes valores diferem significativamente quando estas mulheres são categorizadas seguindo o critério de ansiedade basal. Mulheres com ansiedade basal baixa apresentaram baixos índices de ansiedade ao longo das visitas, quando comparadas às mulheres com ansiedade basal alta (Tabela 01).

	Total	Ansiedade basal baixa	Ansiedade basal alta
	% em 23.532 visitas	% em 18.744 visitas	% em 4.788 visitas
Pré-menopausa	15,6	4,4	71,4
Menopausa	20,7	10,7	56,3
Menopausa tardia	20,2	13,5	46,4
Pós-menopausa	18,1	12,7	39,4

Tabela 01: Prevalência de ansiedade distribuída nas fases do climatério, em participantes no Study of Women's Health Across the Nation. Dados coletados de 3.302 mulheres participantes do Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). Os critérios de elegibilidade incluíam idade entre 42-52 anos, útero intacto, estar em período menstrual nos três meses anteriores, não ter estado em uso de hormônios reprodutivos nos três meses anteriores. As participantes foram avaliadas na entrada do estudo (linha de base) e anualmente com um protocolo comum padronizado (Extraída e modificada de BROMBERGER et al., 2013).

Sagsöz e colaboradores no ano de 2001 estudaram a prevalência de transtornos depressivos e ansiosos em uma amostra ambulatorial do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Kırıkkale, verificando que 6,3% das mulheres no período pré-menopausal apresentaram sintomas e sinais clínicos de depressão. Este número foi bastante maior nas mulheres no período menopausal, onde 56,3 % das avaliadas apresentaram sintomas e sinais clínicos de depressão. Quando a ansiedade foi avaliada, 75% das mulheres no período pré-menopausal apresentaram ansiedade severa e 62,5% das mulheres nesta estapa apresentaram ansiedade severa crônica. Ansiedade severa foi observada ainda em 81,3% das mulheres no período pré-menopausal, sendo que 78,1% das mulheres neste mesmo período apresentaram ansiedade severa crônica (Tabela 02).

		Menopausa	Pré-menopausa
Inventário de depressão de Beck	Pontuação	%	%
	0-8	9,5	12,5
	9-21	34,4	81,3
	21 ou mais	56,3	6,3
STAI-I			
	Ansiedade		
	Baixa	3,1	6,3
	Normal	15,6	18,8
	Severa	81,3	75,0
STAI-II			
	Baixa	12,5	6,3
	Normal	9,4	31,3
	Severa	78,1	62,5

Tabela 02: Prevalência de transtornos depressivos e ansiosos em uma amostra ambulatorial do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Kırıkkale. Estudo com 32 mulheres na menopausa e 32 pacientes pré-menopáusicas com idades entre 40-55 anos no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Kırıkkale. Foi aplicado o Inventário de depressão de Beck para determinar depressão e STAI-I para determinar ansiedade e STAI-II, que determina a ansiedade crônica persistente por mais de 1 ano. A classificação do inventário de depressão Beck é: 0-8 pontos: Normal; 9-21 pontos: sintomas depressivos presentes; 21 e mais: sintomas e sinais clínicos de depressão. A classificação do e STAI-I e do e STAI-II é: Até 36 pontos: ansiedade mínima; Entre 36-42 pontos: ansiedade normal; Mais de 42 pontos: ansiedade severa (Extraída e modificada de Sagsöz, et al., 2001).

No Brasil, Polisseni e colaboradores realizaram um estudo clínico, prospectivo e transversal, com 93 mulheres na faixa etária dos 40 aos 65 anos, atendidas no Serviço de Climatério do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF), num período de 15 meses observando que, no período da pré-menopausa, 22,6% das mulheres avaliadas apresentaram sintomas de depressão enquanto 54,8% destas mulheres apresentaram sintomas de ansiedade. 46,9% das mulheres que viviam o período da menopausa apresentaram sintomas de depressão e 56,3% destas mulheres apresentaram sintomas de ansiedade. Por fim, 40% das mulheres vivenciando a pós-menopausa apresentaram

sintomas de depressão e 50% destas mesmas mulheres apresentaram sintomas de ansiedade (Tabela 03).

Fases da Menopausa	Depressão (%)	Ansiedade (%)
Pré-menopausa	22,6	54,8
Menopausa	46,9	56,3
Pós- Menopausa	40,0	50,0

Tabela 03: Prevalência de depressão e ansiedade distribuída nas fases do climatério, em pacientes atendidas no HU/UFJF. Estudo clínico, prospectivo e transversal, com 93 mulheres na faixa etária dos 40 aos 65 anos atendidas no Serviço de Climatério do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF), no período de 15 meses. Foram utilizados como critérios de exclusão: pacientes em uso de terapia hormonal, hormônio-terapia por implantes, DIU e injetáveis de depósito nos últimos seis meses, endocrinopatias que levassem a irregularidades menstruais, uso de drogas que interferissem no ciclo menstrual, ansiolíticos e antidepressivos, histerectomizadas, ooforectomizadas, portadoras de câncer e de enfermidades psiquiátricas, pacientes que tivessem sido submetidas a radio ou quimioterapia (Extraída modificada de POLLISSENI, et al., 2009).

Apesar de frequentes, nenhum dos sintomas de natureza psicológica pode ser considerado específico da situação de menopausa. Desta forma, os distúrbios psíquicos iniciados durante esta etapa da vida só podem ser adequadamente diagnosticados e tratados, se o ginecologista estiver ciente da possibilidade, possivelmente aumentada, de sua existência nesta fase da vida (SAGSÖZ; et al., 2001).

1.1.3 Modelo animal de menopausa

Modelos animais de menopausa em roedores se baseiam nos diversos fenômenos fisiológicos decorrentes da depleção dos hormônios ovarianos. Há três formas, bem descritas na literatura, de se chegar a este modelo: o envelhecimento intacto, a ovariectomia e a aceleração da falência ovariana (CHAKRABORTY & GORE, 2004; HOYER, et al., 2001; MAFFUCCI & GORE, 2006; ROCCA, et al., 2011; SCHMIDT, 2009; WILLIAMS, 2005).

Com cerca de 18 meses de idade, camundongos entram em um estado de estro permanente, os ciclos reprodutivos e a ovulação cessam completamente e os níveis dos hormônios ovarianos caem a níveis de pré-estropausa. Desta forma, como em humanos, roedores experimentam flutuações hormonais naturais a partir da meia-idade. Porém, diferentemente de humanos, roedores apresentam uma estropausa ao invés de uma verdadeira menopausa, onde os níveis de estrogênio são muito baixos ou indetectáveis e os níveis de progesterona também diminuem de forma acentuada (MAFFUCCI & GORE, 2006; SCHMIDT E RUBINOW, 2009). O modelo de envelhecimento intacto permite a retenção do tecido ovariano, produtor também de andrógenos durante a menopausa, e mantém o período de transição menopausal. Porém, o ambiente hormonal em roedores não reflete de forma fidedigna a intensa queda hormonal que ocorre na menopausa humana. Além disso, as alterações relacionadas à idade podem tornar confusas as análises sobre a ação especificamente hormonal (CHAKRABORTY & GORE, 2004; MAFFUCCI & GORE, 2006).

O modelo de ovariectomia (OVX) é um modelo bem estabelecido. Os roedores podem ser ovariectomizados em idades que correlacionam com diferentes fases da vida para mimetizar aspectos específicos do envelhecimento (MAFFUCCI & GORE, 2006). Além disso, o modelo de ovariectomia, paralelo à menopausa induzida cirurgicamente em humanos, permite uma análise do papel dos hormônios ovarianos. Entretanto, o modelo de OVX possui limitações. Em primeiro lugar, a remoção dos ovários falha em reproduzir os níveis de andrógenos. E, além disso, roedores ovariectomizados não vivenciam, de maneira natural, a transição para a menopausa uma vez que, neste modelo, os hormônios ovarianos são removidos abruptamente (DAVISON ET AL, 2005. HAVELOCK ET AL., 2006; LAUGHLIN ET AL., 2000).

O modelo de aceleração da falência ovariana utiliza injeções de dióxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) para antecipar seletivamente a perda natural de folículos primordiais e primários em roedores e primatas (revisado por KEMPEN et.al., 2011). Estes folículos são sensíveis à exposição ao VCD e a diminuição da população ocorre devido ao aumento do recrutamento. Durante este processo, os oócitos são eliminados por apoptose, e as células da teca interna dos folículos se tornam células

intersticiais, produtoras de andrógenos, inclusive na pós-menopausa (HOYER, 1996 LOHFF ET AL, 2005). Através da eliminação induzida das populações de folículos, o modelo de aceleração da falência ovariana replica os ciclos de eventos da menopausa humana em ambos, níveis de hormônios e aciclicidade definitiva (HOYER, 1996, KEMPEN et.al., 2011, LOHFF et. al., 2005).

Embora este último modelo apresente as vantagens de mimetizar a transição para a menopausa e os indetectáveis níveis hormonais na pós-menopausa, é um modelo que exige um protocolo bastante longo e dispendioso. O problema de tempo e custo aparece ainda com maior ênfase no protocolo de envelhecimento intacto, uma vez que, embora ele apresente a vantagem da manutenção do tecido ovariano e das flutuações hormonais até o estabelecimento da pós- menopausa, os cuidados gerais com os animais se estenderiam por mais de um ano, tornando-o um modelo de alto custo. Além disso, este modelo de envelhecimento intacto apresenta, ainda, a limitação de não mimetizar completamente a depleção dos hormônios ovarianos presente na pós-menopausa humana, fase a qual direcionamos nossa atenção no presente trabalho.

Optamos pelo modelo de ovariectomia, mesmo cientes das suas limitações, uma vez que ele mimetiza os baixíssimos níveis de hormônios ovarianos na pós-menopausa humana.

1.2 Esteróides Sexuais

Os esteróides sexuais são derivados da molécula de colesterol e sua biossíntese ocorre em diferentes locais (HEBERDEN, 2017).

Na conversão do colesterol em esteróides sexuais estão envolvidas enzimas de clivagem da cadeia lateral contendo citocromo P450 (P450_{scc}) responsável por converter o colesterol em pregnenolona, a 17 α -hidroxilase (P450_{17 α}), a 3 β -dehidrogenase (3 β -HSD) e a 17 β -hidroxisteroide dehidrogenase (17 β -HSD) que atuam em diferentes etapas da síntese, além da P450 aromatase (P450_{Arom}) que catalisa a reação de conversão da testosterona em estradiol (HEBERDEN, 2017).

As gônadas são as principais produtoras de esteróides sexuais. Os ovários produzem estrogênios e progesterona enquanto as células de Leydig nos testículos são responsáveis pela produção de testosterona (CUI, et. al., 2013; HEBERDEN, 2017; SHUMACHER et. al., 2012).

A produção hormonal nos ovários é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários. O hipotálamo secreta, de forma pulsátil, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, por sua vez, age na hipófise anterior estimulando a secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). A frequência de pulso do GnRH é um estímulo capaz de discriminar o hormônio a ser produzido e secretado pela hipófise, sendo o LH produto de alta e o FSH produto de baixa frequência de pulso, criando, desta forma, o meio hormonal apropriado para o desenvolvimento folicular ovariano (CHRISTIAN & MOENTER, 2010).

Os primeiros estágios de crescimento dos folículos ocorrem de maneira independente das gonadotrofinas, sendo conduzidos por fatores parácrinos. A sensibilidade folicular ao FSH precede e promove a sensibilidade ao LH e estes hormônios agem de maneira sinérgica promovendo a maturação folicular, a ovulação, a luteinização e a produção e secreção de estrogênios e progesterona tanto pelos folículos quanto pelo corpo lúteo (CHRISTIAN & MOENTER, 2010).

Os estrogênios, durante grande parte do ciclo reprodutor, exercem um *feedback negativo* no hipotálamo diminuindo a secreção de GnRH e a capacidade de resposta da hipófise, inibindo, assim, a secreção de LH e FSH. No entanto, antes da ovulação, um aumento acentuado na concentração plasmática de estrogênios promove a síntese de receptores de progesterona, e um *feedback positivo* estimulando a síntese de GnRH pelo hipotálamo e de LH pela hipófise anterior (CHRISTIAN & MOENTER, 2010; SHUMACHER et. al., 2012).

O hormônio luteinizante é o sinal fisiológico para a ovulação. Diante do aumento da concentração de LH as células da granulosa, agora já responsivas a este hormônio, aumentam sua produção de progesterona que, no hipotálamo, estimulará a rápida liberação e a degradação de GnRH, o que culmina com o pico pré-ovulatório. A progesterona age ainda como um estimulante autócrino das células da granulosa desencadeando os eventos bioquímicos, tornando possível a ovulação (CHRISTIAN & MOENTER, 2010; LESSON & MAHESH, 1992).

Após a liberação do oócito se inicia a fase lútea, em humanos, e a fase do metaestro, em roedores. A formação do corpo lúteo é dependente do hormônio luteinizante e ocorre ainda antes da ruptura do folículo com a hipertrofia das células da granulosa, aumentando sua capacidade de produzir hormônios esteróides, em especial a progesterona (SHUMACHER et. al., 2012).

Este complexo padrão de alterações hormonais controla as importantes mudanças anatomo-fisiológicas que se apresentam a cada ciclo reprodutivo, preparando o corpo para receber e permitir o desenvolvimento do zigoto, caso haja fecundação. A sequência de crescimento folicular, ovulação e subsequente formação e degeneração do corpo lúteo é repetida a cada 28 dias, que compreendem duas fases distintas, constituindo o ciclo menstrual em humanos, ou a cada quatro dias, que compreendem quatro fases distintas, constituindo o ciclo estral em roedores. A parte do ciclo dedicada ao rápido crescimento do folículo ovulatório dura aproximadamente 14 dias em humanos e é chamada de fase folicular, já em camundongos dura dois dias e compreende a fase final do diestro e início do proestro. A ovulação nas duas espécies ocorre no meio do ciclo, após um pico de LH. Em humanos é um período de aproximadamente dois dias situado entre a fase folicular e a fase lútea, já em camundongos, ocorre durante a fase de estro. O restante do ciclo é protagonizado pelo corpo lúteo, sendo este período, em humanos, denominado fase lútea com duração aproximada de 14 dias. Já em camundongos, o período equivalente à fase lútea possui dois dias de duração e corresponde ao metaestro mais o início do diestro (CHRISTIAN & MOENTER, 2010; PARKENING et. al., 1982) (Figura 01).

Diferentemente da espécie humana, a receptividade sexual de roedores acontece apenas a cada 4 a 5 dias, ao final do proestro e início do estro. Outra diferença significativa entre espécies é a reabsorção do endométrio em roedores, caso a fecundação não ocorra, o que nas mulheres resulta na menstruação (revisado por CHRISTIAN & MOENTER, 2010; PARKENING et. al., 1982).

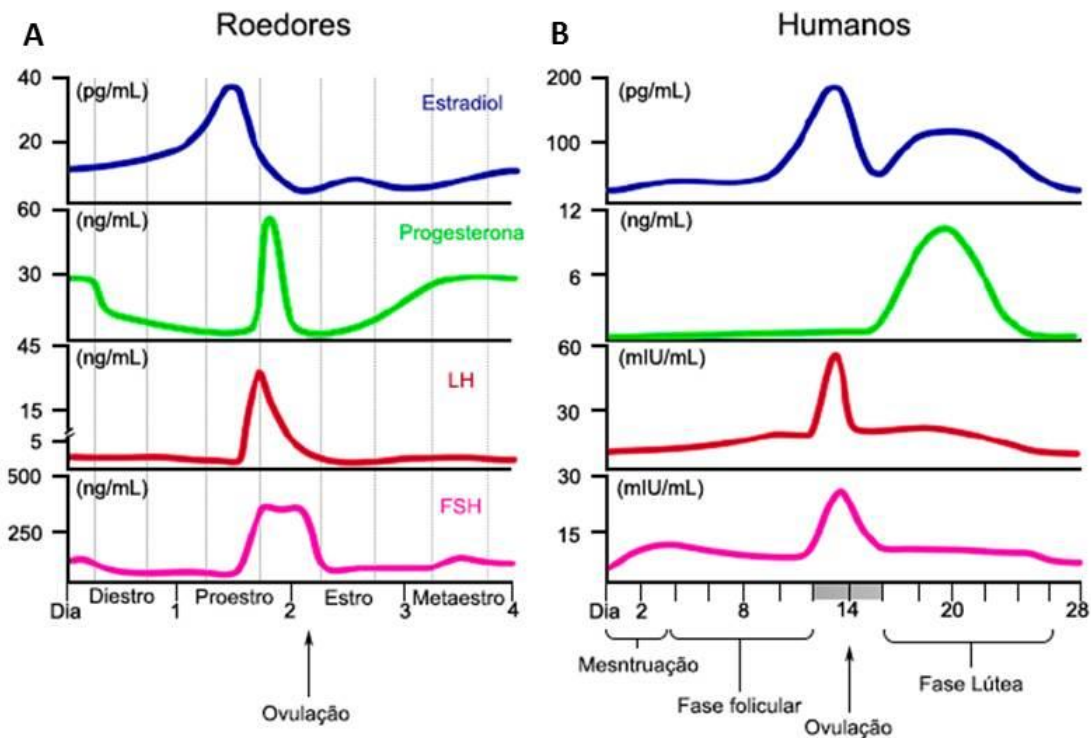


Figura 01: Gráfico representativo do ciclo reprodutivo de roedores e humanos. A. Ciclo estral de roedores. A progesterona exibe um aumento na fase pós ovulatória, em meados da fase estro se prolongando em metaestro, diante da presença do corpo lúteo que involui cessando a produção e levando a uma queda deste hormônio no início da fase diestro. Os níveis de estradiol começam a se elevar ao início de proestro chegando ao seu pico aproximadamente em meados desta mesma fase, estimulando um pico rápido de LH, FSH e progesterona ao final da fase de proestro culminando na ovulação no início de estro quando todos estes hormônios retornam a níveis basais reiniciando o ciclo. B. Ciclo menstrual humano. O ciclo se inicia com o primeiro dia de menstruação. A primeira fase do ciclo é denominada fase folicular, quando os níveis de estrogênio e progesterona são muito baixos. Aproximadamente, no 10º dia os níveis de estrogênio aumentam, estimulando um pico de LH e FSH no 14º dia, culminando na ovulação. Durante o período pós ovulação, chamado fase lútea, a presença do corpo lúteo sustenta o estrogênio elevado além de elevar os níveis de progesterona por, aproximadamente, 12 dias quando se dá sua involução e o retorno destes hormônios a níveis basais, quando se dá a menstruação e o reinício do ciclo.

Durante o processo de foliculogênese, as células ovarianas da teca e da granulosa são as responsáveis pela síntese de estrogênios e da progesterona. A produção de esteróides sexuais se inicia com a síntese da pregnenolona a partir do colesterol catalisada na mitocôndria pela enzima P450scc. A pregnenolona é, então, convertida em progesterona pela enzima 3β -HSD tanto nas células da teca como nas células da granulosa. A progesterona, por sua vez, é convertida em androstenediona pelas enzimas P45017 α e 17 β -HSD apenas nas células da teca, tendo em vista que estas células produzem andrógenos, mas não são capazes de produzir estrógenos. A androstenediona atravessa a membrana basal e, nas células da granulosa, pode ser convertida em Estrona (E_1) pela enzima aromatase ou

convertida em testosterona pela enzima 17 β -HSD e, em seguida, em 17 β -estradiol (E_2), o produto mais abundante e mais potente dos estrogênios, pela enzima aromatase (CUI, et. al., 2013; SHUMACHER et. al., 2012) (Figura 02).

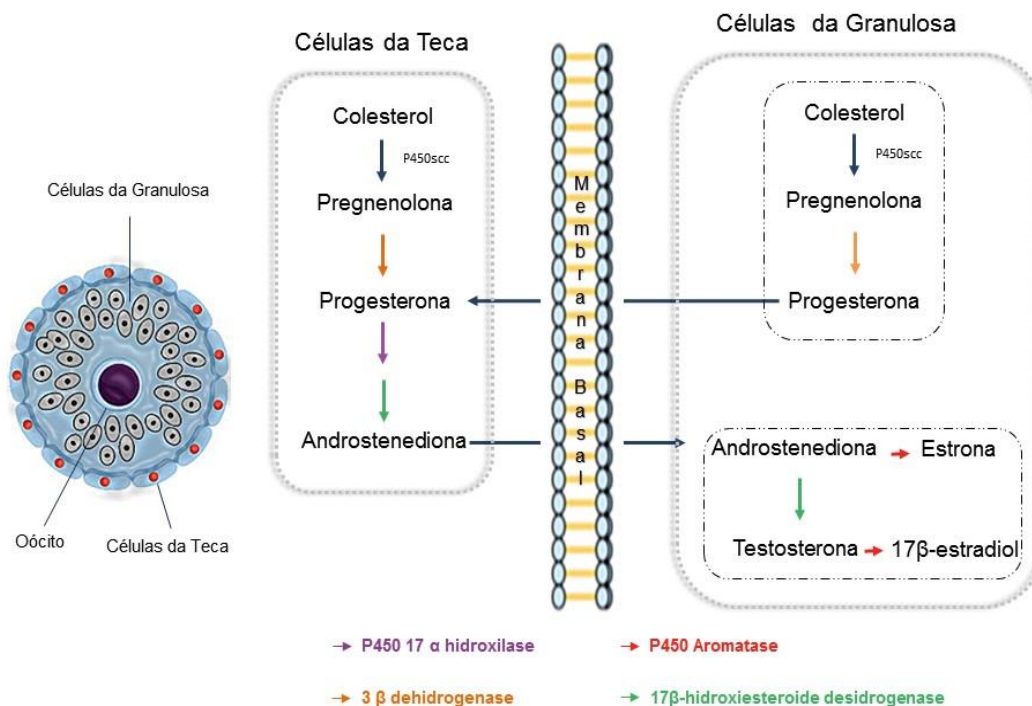


Figura 02: Figura esquemática da síntese de esteróides sexuais nos ovários (Modificado de Cui, et al., 2013).

A biossíntese dos esteróides sexuais também ocorre em outros tecidos tais como o tecido adiposo, as glândulas adrenais e a placenta durante a gravidez. Quando secretados, estes hormônios entram na circulação sanguínea ligados às proteínas plasmáticas e são distribuídos aos tecidos alvo (CUI, et. al., 2013; HEBERDEN, 2017; MICEVYCH & SINCHAK, 2008; SHUMACHER et. al., 2012).

O cérebro também é capaz de sintetizar o estradiol e a progesterona tornando-o tanto um tecido alvo quando um local de síntese. Particularmente, quando a síntese destes hormônios ocorre no tecido nervoso, eles são denominados neuroesteróides (CUI, et. al., 2013; HEBERDEN, 2017; MICEVYCH & SINCHAK, 2008; SHUMACHER et. al., 2012).

A síntese neural de progesterona foi primeiramente descrita nas células da glia, mas logo se observou que não só astrócitos e oligodendrócitos, mas também neurônios, expressam as enzimas P450_{scc} e 3 β -HSD capazes de converter o colesterol em pregnenolona e, em seguida, em progesterona. A atividade da enzima 3 β -HSD é encontrada principalmente no córtex cerebral, hipocampo, bulbo olfatório, tálamo, hipotálamo, amígdala e cerebelo, sendo as células de purkinje, aparentemente, as maiores produtoras deste hormônio no Sistema Nervoso Central (SNC) (SHUMACHER et. al., 2012).

A aromatase, enzima que converte andrógenos em estrogênios, é expressa em astrócitos e, principalmente, em neurônios. Sua atividade é observada no hipotálamo, em algumas regiões do mesencéfalo basal além do hipocampo, tálamo, córtex cerebral, cerebelo e tronco encefálico (CUI, et. al., 2013).

No entanto, é importante considerar que embora o cérebro possua enzimas esteroidogênicas, suas atividades parecem diferir das enzimas presentes em tecidos periféricos. De fato, o aporte de esteróides sexuais sintetizados periféricamente interfere, significativamente, na concentração dos neuroesteróides tanto no SNC, quanto no fluido cerebrospinal (FCE) e, esta última se relaciona intimamente com as concentrações séricas dos esteróides sexuais (HILL et. al., 2016).

Nas células do sistema nervoso central, como demonstrado na figura 03, a produção destes neuroesteróides se inicia com a síntese da pregnenolona catalisada na mitocôndria pela enzima P450_{scc} a partir do colesterol. A pregnenolona é, então, convertida em progesterona pela enzima 3 β –HSD ou em desidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima P450_{17 α} . Ambas são, em seguida, convertidas em androstenediona pela atividade das enzimas P450_{17 α} e 3 β –HSD, respectivamente. A androstenediona pode ser convertida em estrona pela enzima aromatase ou convertida em testosterona pela enzima 17 β -HSD e em seguida em 17 β -estradiol pela enzima aromatase (CUI, et. al., 2013; SHUMACHER et. al., 2012).

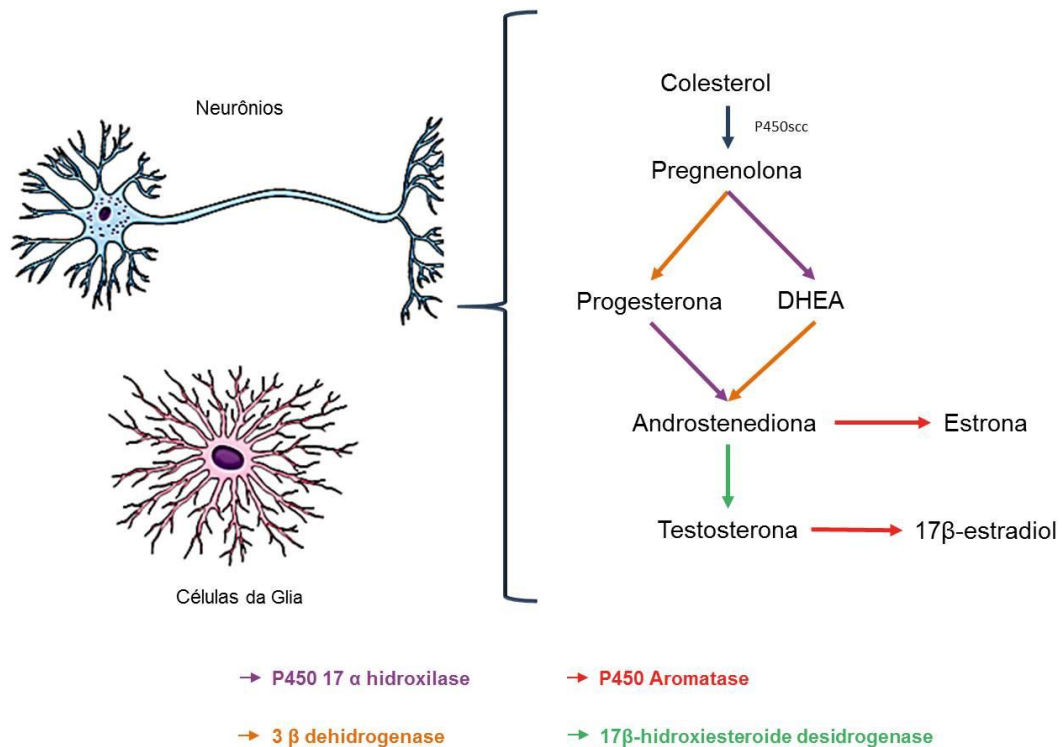


Figura 03: Figura esquemática da síntese de neuroesteróides (Modificado de Cui, et al., 2013).

A ação dos esteróides sexuais, independentemente de onde são produzidos, ocorre por meio da ligação destes hormônios a receptores específicos em células e tecidos alvos (SCARPIN, et. al., 2009; GRAHAM, et. al. 1997).

Desta forma, a sinalização de estrogênios é mediada por receptores de estrogênios (ERs), que incluem receptores de membrana, dentre eles, o GPR30 (receptor de estrogênio acoplado à proteína G) e ER-X e os receptores nucleares ER α (receptor de estrogênio alfa, também conhecido como ERS1) e ER β (receptor de estrogênio beta ou ERS2). Os ERs de membrana atuam em mecanismos não-genômico e os eventos em resposta à ativação destes receptores ocorrem em minutos ou mesmo segundos, com a ativação de segundos mensageiros que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular, que podem ou não ocasionar a fosforilação e ativação de fatores de transcrição. Já os receptores nucleares, quando ativados, respondem lentamente ao longo de horas ou dias, uma vez que o complexo “hormônio-receptor” se liga ao gene promotor agindo como fator de transcrição gênica (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; CUI, et. al., 2013).

Os estrogênios não exercem apenas funções envolvidas com a reprodução, mas desempenham papéis regulatórios importantes em vários outros processos biológicos, atuando no metabolismo e homeostase, diferenciação celular, proliferação e apoptose, processos inflamatórios, funcionamento e plasticidade neural, neuroproteção e processos cognitivos (AZCOITIA, et. al, 2011; AZCOITIA, et. al, 2017).

Diante de ações tão abrangentes, é previsível que os receptores de estrogênio estejam distribuídos por diversos tecidos periféricos, dentre eles: útero, ovários, ossos, mamas, fígado, rins, tecido adiposo branco e marrom, cólon, endotélio vascular, pulmões, bexiga e glândulas adrenais (CUI, et. al., 2013).

No cérebro, os ERs também se encontram amplamente distribuídos, estando presentes na amígdala, hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral, substância cinzenta periaquedutal, tálamo, núcleo da rafe, núcleo rubro da estria terminal, substância negra, área preóptica, locus ceruleus, núcleo da espinha trigeminal, núcleo tegmentar anterior, oliva inferior, oliva superior e cerebelo (CUI, et. al., 2013).

A sinalização da progesterona é mediada apenas por receptores nucleares (PR), o PRA e o PRB. Os PR respondem à progesterona, associando uma gama de proteínas co-reguladoras e se ligam a sequências alvo específicas em genes promotores regulados pela progesterona, promovendo a transcrição gênica (SCARPIN, et. al., 2009; GRAHAM, et. al. 1997).

Assim como os estrogênios, a progesterona desempenha outras múltiplas funções além das reprodutivas, dentre elas, regulam processos inflamatórios, função mitocondrial, regeneração tecidual, metabolismo, processos cognitivos, neurogênese, regeneração, mielinização e recuperação do cérebro pós trauma (GRAHAM, et. al. 1997; SCARPIN, et. al., 2009; SHUMACHER et. al., 2012).

Receptores de progesterona estão distribuídos periféricamente no útero, ovários, vagina, mamas, endotélio vascular, ossos, timo, pâncreas e pulmões (GRAHAM, et. al. 1997; SCARPIN).

No SNC, os receptores de progesterona se encontram na amígdala, hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal, bulbo olfatório, tálamo e cerebelo (BRINTON, et. al., 2008).

1.3 Transtornos de Ansiedade

A ansiedade é definida como um estado de alerta e valência negativa, resultando em uma maior vigilância na ausência de uma ameaça imediata. Esta é uma emoção que se caracteriza por experiências subjetivas, como tensão e pensamentos de preocupação, além de mudanças fisiológicas, como transpiração, tonturas e aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (CALHOON & TYE, 2015).

O medo ocorre de forma aguda em resposta a uma ameaça real e iminente e é frequentemente associado a surtos de excitação autonômica necessária para a luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de esquiva, se dissipando rapidamente com a remoção do estímulo aversivo. Em contraste, a ansiedade é um estado emocional que pode ser desencadeado por estímulos que não representam perigo imediato, sendo a ocupação antecipada de uma ameaça futura, associada à tensão muscular, vigilância aumentada e comportamentos cautelosos ou de esquiva (CALHOON & TYE, 2015; DSM-V)

Indivíduos saudáveis experimentam eventos esporádicos de ansiedade tendo em vista que esta, quando ocasional, é um aspecto normal do repertório emocional e ajuda a sobrevivência ao aumentar o estado de vigília e atenção permitindo respostas rápidas a possíveis ameaças. No entanto, quando a ansiedade se torna persistente ou desproporcional, suas manifestações somáticas, cognitivas e comportamentais, podem ser debilitantes, levando a consideráveis encargos econômicas e pessoais (CALHOON & TYE, 2015).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), os transtornos de ansiedade incluem distúrbios que compartilham características de medo excessivo e ansiedade desproporcional além de distúrbios comportamentais relacionados. Eles diferem entre si nos tipos de objetos, situações e na ideação cognitiva associada que induz ao medo e à ansiedade (DSM-V).

Algumas reformulações foram realizadas nesta nova edição do manual, por exemplo, a realocação dos diagnósticos de Transtorno Obsessivo Compulsivo, Transtorno de Estresse Agudo e Transtorno de Estresse Pós-Traumático em novos capítulos, separando-os dos transtornos de ansiedade. Os critérios diagnósticos de

quadros fóbicos (Agorafobia, Fobia Específica e Transtorno de Ansiedade Social) sofreram algumas modificações. O Transtorno de Pânico e a Agorafobia foram separados como diagnósticos independentes e o Transtorno de Ansiedade de Separação e o Mutismo seletivo saíram do extinto capítulo dos Transtornos Geralmente Diagnosticados pela Primeira Vez na Infância ou na Adolescência e foram incorporados aos Transtornos de Ansiedade (ARAÚJO & NETO, 2014; DSM-V).

No capítulo dedicado aos transtornos de ansiedade do DSM-V, estes são organizados segundo os estágios do desenvolvimento, e sequenciados de acordo com a idade típica de início. Em ordem de aparecimento: Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, Fobia Específica, Transtorno de Ansiedade Social, Transtorno de Pânico, Agorafobia, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno de Ansiedade induzido por Substância/Medicamento, Transtorno de Ansiedade devido a outra condição Médica, Outro Transtorno de Ansiedade Especificado, Transtorno de Ansiedade Não Especificado (DSM-V) (Figura 04).

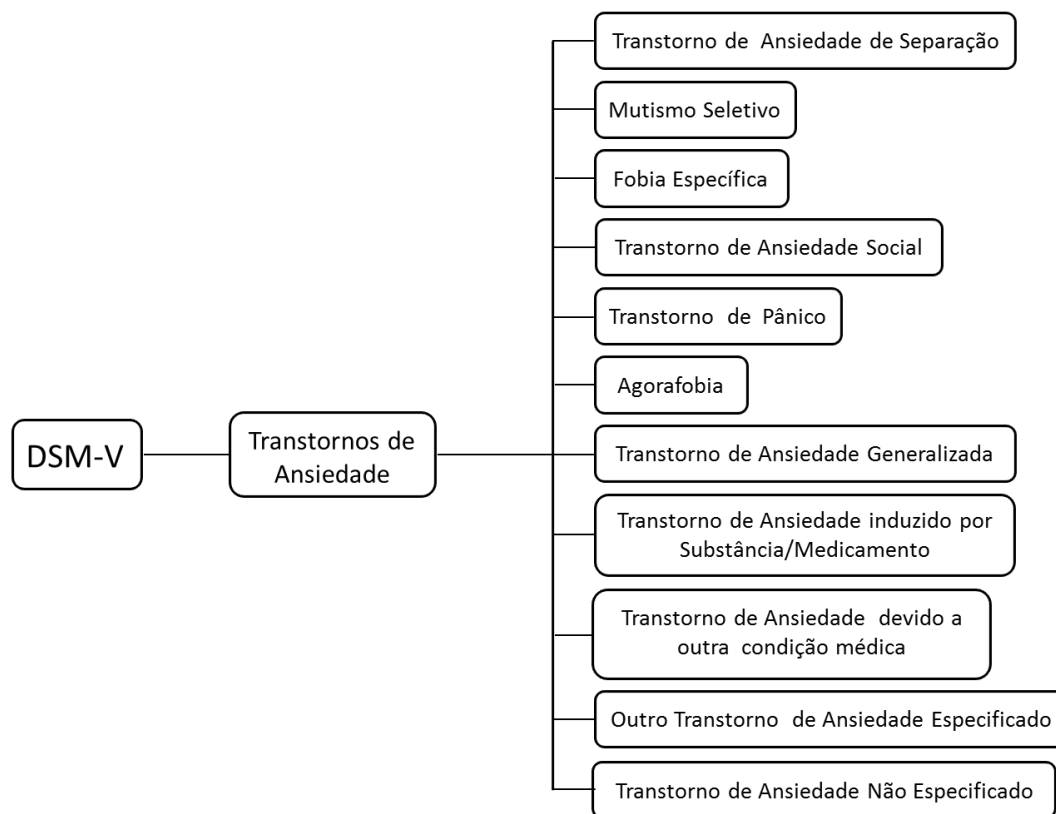


Figura 04: Figura esquemática do modelo estrutural do capítulo do DSM-V dedicado aos transtornos de ansiedade.

Os indivíduos com transtorno de ansiedade de separação apresentam uma ansiedade e um temor persistente de separação das figuras de apego, além de relutância em se afastar delas. Apresentam, ainda, pesadelos e sintomas físicos de sofrimento. O mutismo seletivo é caracterizado por falhas na comunicação oral em situações sociais onde há alguma expectativa, mesmo que o indivíduo se comunique em outras situações. Este transtorno traz prejuízos significativos em ambientes acadêmicos ou ocupacionais, interferindo na comunicação social normal. Já indivíduos com fobia específica são temerosos, ansiosos e evitam objetos ou situações circunscritas. O medo, a ansiedade ou a esquiva são induzidos imediatamente pela situação fóbica em um grau persistente e desproporcional ao risco real. Dentre os tipos de fobias específicas se incluem: animal; ambiente natural; injeção; situacional; entre outras (DSM-V).

No transtorno de ansiedade social, o indivíduo é temeroso, ansioso ou se esquiva de interações e situações sociais que envolvam a possibilidade de ser avaliado. A ideação cognitiva associada é a de ser avaliado negativamente pelos demais, ficar embaraçado, ser humilhado ou rejeitado ou ofender os outros. No transtorno de pânico, o indivíduo experimenta ataques de pânico inesperados e recorrentes ficando persistentemente preocupado em ter outros ataques de pânico ou se comportar de maneiras inadequada devido aos ataques. Os ataques de pânico se caracterizam por surtos abruptos de medo ou desconforto intenso que atingem um pico em poucos minutos, acompanhados de sintomas físicos e / ou cognitivos. Os indivíduos com agorafobia são apreensivos e ansiosos acerca de duas ou mais das seguintes situações: usar transporte público; estar em espaços abertos; estar em lugares fechados; ficar em uma fila ou estar no meio de uma multidão; ou estar fora de casa sozinho em outras situações. O temor destas situações ocorre devido aos pensamentos de que pode ser difícil escapar ou da possibilidade de não haver auxílio disponível caso se desenvolva sintomas de pânico ou outros sintomas incapacitantes ou constrangedores (DSM-V).

O transtorno de ansiedade generalizada se caracteriza por ansiedade persistente e excessiva e preocupação descontrolada acerca de vários domínios, incluindo o trabalho e o desempenho escolar. O indivíduo experimenta sintomas físicos, dentre eles, inquietação, fadigabilidade, dificuldade de concentração; tensão

muscular e distúrbios do sono. O transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento envolve ansiedade devido a intoxicação ou abstinência de substância ou medicamento. No transtorno de ansiedade devido à outra condição médica, os sintomas de ansiedade decorrem de consequências fisiológicas derivadas de outra condição médica (DSM-V).

Os distúrbios de ansiedade, incluindo o transtorno de pânico, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, transtorno de fobias específicas e transtorno de ansiedade de separação, são os transtornos mentais de maior prevalência no mundo e estão associados a dispendiosos custos de cuidados de saúde (BANDELOW & MICHAELIS, 2015).

Diversas pesquisas estimam a porcentagem da população acometida com transtorno de ansiedades e, na literatura, estes números apresentam ampla variação. Maeng e Milad, em trabalho publicado em 2015, apontam uma prevalência de cerca 16%, no entanto, Banadelow e Michaelis, em trabalho publicado no mesmo ano, estimam que até 33,7% da população sofrem de algum transtorno de ansiedade durante a vida (BANDELOW & MICHAELIS, 2015; MAENG & MILAD, 2015). Nas comparações entre culturas, as taxas de prevalência são altamente variáveis. Porém, é provável que essa heterogeneidade esteja mais relacionada às diferenças na metodologia utilizada para a realização do diagnóstico do que às influências culturais (BANDELOW & MICHAELIS, 2015).

Relatórios epidemiológicos indicam que mulheres apresentam o dobro de risco de sofrerem qualquer desordem relacionada à ansiedade se comparadas aos homens (BANDELOW & MICHAELIS, 2015, DSMV; HILL et. al., 2016; MAENG & MILAD, 2015; PEARLSTEIN, et al.,1997). Esta taxa aumentada de incidência nas mulheres é mantida em todos os transtornos de ansiedade e medo, incluindo transtorno de ansiedade social, transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico (BANDELOW & MICHAELIS). As mulheres são, ainda, afetadas mais severamente pelos sintomas dos transtornos de ansiedade, além de terem maior vulnerabilidade aos transtornos mentais comórbidos (MAENG & MILAD, 2015).

Estudos sugerem que os transtornos de ansiedade, em mulheres, se iniciam mais comumente durante diferentes fases de sua vida reprodutiva, como a puberdade, menstruação, gravidez, pós-parto e menopausa. Estes períodos de risco

elevado coincidem com tempos de variações hormonais drásticas, sugerindo que os hormônios do eixo HPG podem exercer influências na ocorrência do transtorno (BROMBERGER et al., 2013; MAENG & MILAD, 2015).

Os transtornos de ansiedade são altamente comórbidos entre si e outros transtornos mentais (BANDELOW & MICHAELIS, 2015). Um dos achados mais frequentes e consistentes na literatura é a comorbidade frequente entre transtornos de ansiedade e depressivos, estimando que 50% dos indivíduos diagnosticados com transtornos depressivos também sofrem com transtornos de ansiedade. Pacientes com doenças comórbidas atendem aos critérios diagnósticos para ambas e os sintomas são geralmente mais severos do que em transtornos que ocorrem sozinhos (MOSCAT, et al., 2016; SMALL, et al., 2016).

Fármacos e psicoterapias têm sido utilizadas como tratamentos efetivos para transtornos de ansiedade. A terapia cognitivo-comportamental (TCC) é atualmente o padrão-ouro dentre as psicoterapias para o tratamento da ansiedade patológica (RAVINDRAN & STEIN, 2010).

Com relação às farmacoterapias, os benzodiazepínicos foram um pilar do tratamento do transtorno de ansiedade por muitos anos. O mecanismo de ação destes fármacos consiste na ligação de suas moléculas a um sítio específico no receptor GABA_A potencializando a ação do neurotransmissor (RAVINDRAN & STEIN, 2010). Os benzodiazepínicos possuem ação ansiolítica, anticonvulsivante, relaxante muscular além de ações sedativas. Sua tolerabilidade e início rápido de efeito contribuíram para o uso continuado desta classe de medicamentos para o tratamento dos transtornos de ansiedade. (RAVINDRAN & STEIN, 2010).

No entanto, o entusiasmo com os benzodiazepínicos diminuiu em consequência de vários fatores. Embora estes medicamentos sejam frequentemente bem tolerados e proporcionam um alívio rápido e eficaz dos sintomas, seus efeitos adversos, dentre eles excesso de sedação, comprometimento cognitivo e falta de coordenação psicomotora, além do seu grande potencial de abuso e dependência, geram relevante preocupação nos clínicos (ANDREATINI, 2001; RAVINDRAN & STEIN, 2010).

Apesar das contraindicações, maneira geral, os benzodiazepínicos ainda representam uma valiosa opção de tratamento para a ansiedade, particularmente

para transtorno de pânico, transtorno de ansiedade generalizada e, em alguns casos, transtorno de ansiedade social. Porém, os transtornos de ansiedade são frequentemente comórbidos com outras doenças psiquiátricas, particularmente transtornos depressivos. Uma vez que os benzodiazepínicos não possuem efeitos antidepressivos reconhecidos, o uso de um agente antidepressivo convencional nesses casos é mais apropriado (ANDREATINI, 2001; RAVINDRAN & STEIN, 2010).

Uma estratégia popular para o uso de benzodiazepínicos em transtornos de ansiedade é o uso de curto prazo durante o início do tratamento com um agente antidepressivo, pois estes podem levar tempo para exibir benefícios terapêuticos. Uma vez que os pacientes estejam estabilizados no tratamento com antidepressivos, os clínicos geralmente interrompem o tratamento com benzodiazepínicos (RAVINDRAN & STEIN, 2010).

Uma classe de antidepressivos utilizada para tratamento do transtorno de ansiedade é a dos antidepressivos tricíclicos (ADT). Vários estudos em modelos animais apontam que a administração crônica de ADT apresentam efeito ansiolítico comparável aos benzodiazepínicos. Esta ação ansiolítica seria decorrente de uma sub sensibilização dos receptores de serotonina no córtex frontal mediante ao uso crônico do fármaco (ANDREATINI, 2001). No entanto questiona-se se o uso deste medicamento realmente gera uma redução da ansiedade ou se ocorre apenas uma redução dos sintomas depressivos frequentemente associados aos transtornos ansiosos, embora muitas pesquisas concluam os ADT apresentem, de fato, um efeito ansiolítico que aparece de maneira gradual, apresentando boa eficácia após duas a quatro semanas de tratamento (ANDREATINI, 2001).

Outros antidepressivos amplamente utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade são os da família dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina cujo mecanismo de ação consiste na inibição da recaptação pré-sináptica da serotonina impedindo a ação da bomba transportadora (RAVINDRAN & STEIN, 2010). Os ISRS são considerados fármacos de primeira linha para todos transtornos de ansiedade devido aos seus níveis gerais de eficácia, segurança e tolerabilidade e, embora cada medicamento da classe possa ter diferentes indicações para os específicos transtornos de ansiedade, os clínicos tendem a tratá-

los como tendo igual eficácia para todos as patologias relacionadas (RAVINDRAN & STEIN, 2010). No entanto, apesar do uso prevalente dos ISRS ainda existe preocupações relativas aos seus efeitos adversos que, frequentemente, incluem náuseas, tonturas, dores de cabeça, nervosismo, distúrbios do sono e sintomas gastrointestinais que também são comumente experimentados como parte dos transtornos de ansiedade e, portanto, muitas vezes interpretados como um a piora do quadro (RAVINDRAN & STEIN, 2010).

Há ainda um grande esforço para delinear as bases neurobiológicas específicas subjacentes aos diferentes transtornos de ansiedade para que se possa adequar melhor a escolha dos agentes farmacológicos destinados ao tratamento de cada transtorno, além de direcionar pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos (RAVINDRAN & STEIN, 2010).

1.3.1 Esteróides Sexuais e Transtornos de Ansiedade

Mulheres são, particularmente, mais susceptíveis a apresentar transtornos de ansiedade e transtornos depressivos (HILL et. al., 2016; MAENG & MILAD, 2015; PEARLSTEIN, et al.,1997). Estas duas patologias, além de frequentemente comórbidas, também estão associadas a diversas outras condições somáticas e ambas estão ligadas a alterações na expressão de genes que participam da plasticidade neuronal (HILL et. al., 2016). Diversos trabalhos trouxeram dados que apontam, ainda, que estes dois transtornos estão intimamente associados ao funcionamento dos eixos hipotálamo-pituitária-ovário (HPO) e hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) cujas atividades resultam no controle da produção de hormônios esteróides (HILL et. al., 2016; PEARLSTEIN, et al.,1997; WIECK, 2009).

Sabe-se que a sensibilidade à recompensa e o processamento de informações emocionais são influenciados pelo ciclo menstrual (Bayer et al., 2013). Sabe-se ainda que anticoncepcionais orais contêm estrogênios sintéticos e progestágenos que também influenciam a cognição humana. Um melhor desempenho em memória virtual, aprendizagem associativa e tarefas de atenção espacial foi observado em usuárias de anticoncepcionais orais. Este mesmo

medicamento também pode afetar o processamento de emoções, em especial o reconhecimento de expressões faciais e corporais negativas, influenciando, inclusive, a tomada de decisões. Estes efeitos dos anticoncepcionais orais e hormônios femininos são mediados por receptores de estrogênio e progesterona abundantemente expressos em diversas estruturas cerebrais, incluindo as áreas límbicas. Nessas áreas, os esteróides sexuais são capazes, ainda, de modular a função dos receptores mineralocorticóides, que fazem a mediação da ação do cortisol na vigilância e na atenção seletiva (HAMSTRA, et al., 2016; 2017).

Alguns estudos sobre transtornos de ansiedade relatam que pacientes com transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de fobia específica possuem menores concentrações de sulfato de pregnenolona (SEMENIUK et al., 2001; HEYDARI & MELLEDO, 2002). Já no transtorno de pânico, a progesterona, o sulfato de pregnenolona e a $3\alpha, 5\alpha$ -tetra-hidroxiprogesterona encontram-se aumentadas nas mulheres (BRAMBILLA et al., 2003).

Foi demonstrado também que, em pacientes deprimidos, há uma diminuição na concentração de alguns neuroesteróides. Sabe-se ainda que um aumento da concentração destes esteróides ocorre em pacientes que fazem uso da Fluoxetina, um medicamento Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina (ISRS) de ação ansiolítica e antidepressiva (UZUNOVA, et al., 2003). Hipotetizou-se, então, a relação destas alterações nas concentrações de neuroesteróides com a ação terapêutica do medicamento. No entanto, esta hipótese foi desafiada por outros estudos que demonstraram que terapias antidepressivas não-farmacológicas bem-sucedidas não alteram as concentrações destes hormônios, sugerindo, portanto, que a normalização dos níveis de neuroesteróides não é um pré-requisito para um resultado terapêutico (PADBERG, et al., 2002; BAGHAI, et al., 2005).

Contudo, outros mecanismos devem ser considerados para se compreender o papel dos neuroesteróides na fisiopatologia da ansiedade e da depressão. Pinna e colaboradores em trabalho publicado em 2006 demonstraram que a administração de dose subterapêutica de fluoxetina aumenta seletivamente as concentrações cerebrais de $3\alpha, 5\alpha$ -tetra-hidroxiprogesterona (THP). A THP é um modulador de receptores $GABA_A$, assim como o alprazolam, um medicamento da classe dos benzodiazepínicos, que exerce uma ação antidepressiva de fraca a moderada sem

o envolvimento central do sistema serotoninérgico. Os benzodiazepínicos já foram considerados medicamentos de primeira linha no tratamento da ansiedade até darem lugar aos ISRS. Desta forma, a fluoxetina realiza sua ação terapêutica não só através da inibição da recaptação da serotonina, mas também através de sua ação indireta sobre sistema GABAérgico que exerce sabidamente uma ação ansiolítica e, de maneira independente, uma ação antidepressiva (PINNA, et al., 2006).

1.3.1.1 Estrógenos e Ansiedade

Os estrogênios circulantes modificam bioquímica e estruturalmente diversos órgãos e tecidos, dentre eles o sistema nervoso central (SHERWIN,1998).

Durante a vida fetal, o estrogênio exerce uma influência organizacional permanente no cérebro e, na fase adulta, é capaz de regular não só a plasticidade cerebral, mas também as concentrações de alguns neurotransmissores (SHERWIN,1998).

Estudos em modelo animal demonstraram que os efeitos neurobiológicos do estrogênio incluem modulação dos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA); redução do limiar de convulsão; diminuição da função da beta-endorfina; modulação dos receptores de progesterona; modificação do sono e ritmos circadiano e aumento na neurotransmissão colinérgica e serotoninérgica (SHERWIN,1998).

As áreas límbicas, cuja função está intimamente ligada ao processamento emocional, são abundantes em receptores de estrogênios e, acredita-se, que a fisiopatologia da ansiedade envolva a desregulação de vários neurotransmissores e sistemas neuromoduladores tendo em vista que anormalidades nos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, colinérgico, dopaminérgico e GABAérgico já foram descritas em pacientes que apresentam ansiedade e depressão (revisado por PEARLSTEIN, et al.,1997, SHERWIN,1998). Dentre estes efeitos neurobiológicos dos estrogênios, os que despertam particular interesse envolvem a potencialização dos sistemas colinérgico e serotoninérgico. Com relação ao primeiro, os estrogênios aumentam a síntese de acetilcolina elevando os níveis de colina acetiltransferase e ajudando a manter a densidade de espinhas dendríticas no hipocampo. No que diz respeito ao segundo, o aumento na transmissão serotoninérgica se dá devido à

amplificação da taxa de degradação da monamina oxidase, enzima que cataboliza a serotonina, aumentando a biodisponibilidade de triptofano livre, precursor do neurotransmissor em questão, por deslocar o triptofano de seus locais de ligação à albumina plasmática (PEARLSTEIN, et al.,1997, SHERWIN,1998).

A neurotransmissão de serotonina melhorada com estrogênio poderia potencialmente diminuir os sintomas de mulheres deprimidas e ansiosas (PEARLSTEIN, et al.,1997). Alguns estudos constataram que mulheres na menopausa apresentam uma atividade aumentada da monoamina oxidase em comparação às mulheres pré-menopáusicas, e esta atividade diminui após a terapia com o hormônio. Sabe-se ainda que mulheres na menopausa têm níveis mais baixos de serotonina no sangue do que os níveis pré-menstruais e estes níveis sofrem um aumento após o tratamento com estrogênio. Por fim, ensaios controlados com placebo e reposição de estrogênios em mulheres na menopausa sem sintomatologia significativa de ansiedade indicam, ainda, um efeito benéfico dos estrogênios no senso de bem-estar (JANOWSKY, et al,1996; PEARLSTEIN, et al.,1997; SCHIMIDT et al., 1991).

1.3.1.2 Progesterona e Ansiedade

Sabe-se há mais de 50 anos que a progesterona causa sedação e anestesia em mamíferos e estes efeitos têm sido associados à interação entre este hormônio e seus metabólitos com o receptor GABA (SHERWIN,1998). A progesterona e seus metabólitos agem como moduladores alostéricos deste receptor, aumentando sua afinidade pelo neurotransmissor ácido gama-aminobutírico cuja ação é inibitória e desempenha um importante papel regulatório da excitabilidade neuronal (LONGONE, et al., 2008; SHERWIN,1998).

Como agonista reversível dose-dependente do receptor GABA_A, este hormônio age de maneira semelhante aos benzodiazepínicos, anticonvulsivantes e anestésicos, potencializando o efeito do GABA ao aumentar a frequência e duração da abertura do canal de cloreto, levando a uma hiperpolarização neuronal prolongada. Esta resultante diminuição da excitabilidade dos neurônios explica suas

ações ansiolítica, anticonvulsivante e sedativa (PEARLSTEIN, et al.,1997, SHERWIN,1998).

Estudos mostraram que a progesterona e seus metabólitos também interagem com outros neurotransmissores envolvidos na regulação das respostas de ansiedade e depressão, aumentando, por exemplo, a atividade da monoamina oxidase podendo levar a diminuições nos níveis de serotonina, além de potencializar a liberação de dopamina. Foi mostrado, ainda, que a progesterona inibe receptores nicotínicos e modula receptores serotoninérgicos bem como a ação dos estrogênios nesses receptores. A ação deste hormônio, no entanto, é variável de acordo com a dosagem e diante da presença ou ausência de estrogênios (PEARLSTEIN, et al.,1997; SHERWIN,1998).

1.4 Comportamentos tipo-ansioso em roedores

Uma grande variedade de modelos animais de ansiedade foi desenvolvida diante da demanda da criação de paradigmas sensíveis e específicos para testar drogas ansiolíticas (CRAWLEY, 1985).

A descoberta dos benzodiazepínicos, no início dos anos sessenta, e seu enorme sucesso comercial para o tratamento da ansiedade foi um dos fatores de incentivo para a criação destes modelos e paradigmas. No entanto, naquele momento, a validade preditiva se baseava principalmente na ação farmacológica específica dos benzodiazepínicos. Isso se tornou evidente no início da década de oitenta, quando os testes existentes não se mostraram sensíveis e/ou específicos para testar ansiolíticos não benzodiazepínicos como a buspirona, um agonista parcial do receptor de serotonina 5-HT_{1A} (BELZUNG & GRIEBEL, 2001).

A partir de então, testes de conflitos incondicionados foram desenvolvidos. Mais tarde, quando se evidenciou que a ansiedade não é um fenômeno unitário, mas multifatorial, e poderia ser dividido de várias formas, incluindo “estado” e “traço”, ou “normal” e “patológica”, surgiu uma segunda dificuldade. Estas diferentes formas de ansiedade demonstraram particularidades com relação à sensibilidade ao

desafio farmacológico incentivando a criação de novos paradigmas e metodologias que as abrangesse (BELZUNG & GRIEBEL, 2001).

Ratos e camundongos são particularmente bem adaptados para testes de ansiedade. A natureza altamente exploratória de muitas cepas de camundongos fornece um sistema modelo de exploração dos comportamentos inatos destes animais, uma vez que medicamentos ansiolíticos aumentam os comportamentos exploratórios de camundongos (CRAWLEY, 1985).

A maioria dos ensaios de ansiedade adaptados para roedores são baseados em etologia. Essas tarefas levam em consideração movimentos inatos e conflitantes de roedores como a exploração de novos espaços ou a tendência destes animais a preferir áreas abertas, expostas e bem iluminadas, onde ficam mais vulneráveis a ameaças ambientais. Nestas tarefas de conflito entre aproximação e esquiva, os camundongos com um fenótipo ansioso tendem a permanecer mais tempo em áreas fechadas ou "seguras" dos aparatos comportamentais em comparação com os controles. Os ensaios de conflito entre aproximação e esquiva são eficazes por uma série de razões. Além de possuírem um alto grau de validade aparente, uma vez que a maioria dos transtornos de ansiedade inclui um componente de evitar um estímulo potencialmente perigoso, esses comportamentos tipo-ansiosos, durante a tarefa, são reduzidos por drogas ansiolíticas, e finalmente, não é necessário treinamento para que os animais os realizem (BORSINI, et al. 2002, CALHOON & TYE, 2015).

No labirinto em cruz elevado, por exemplo, camundongos com fenótipo ansioso evitam os braços abertos permanecendo no centro ou, principalmente, nos braços fechados (PELLOW et al, 2005). No teste de campo aberto, animais que exibem comportamentos do tipo-ansioso permanecem na periferia da arena, próximos às bordas e evitando as áreas centrais (HALL & BALLACHEY, 1932), enquanto que na caixa claro-escuro, o comportamento relacionado à ansiedade é medido com a latência de fugir para a porção escura, bem como a propensão a permanecer na porção escura da caixa (LORENZINI, 1984). É importante considerar que todas estas tarefas são sensíveis às alterações na locomoção do animal, portanto, o uso de testes de controle para déficits motores faz-se necessário (CALHOON & TYE, 2015).

Um problema relativo aos testes baseados na exploração, como os mencionados acima, é que não se pode distinguir, através deles, um fenótipo de ansiedade reduzido de um fenótipo exacerbado de exploração ou busca por novidade, ou mesmo de comportamento do tipo-compulsivo. (CRYAN & HOLMES, 2005; CALHOON & TYE, 2015). Um tipo alternativo de tarefa que evita esta desvantagem são as tarefas de esquiva ativa, onde os roedores dirigem suas energias para minimizar estímulos ameaçadores. Nestes ensaios os animais enterram objetos que consideram uma ameaça, como esferas de vidro ou uma sonda eletrificada depois de terem recebido choques por exemplo. Esse comportamento é quantificável e sensível aos ansiolíticos (NJUNG'E & HANDLEY, 1991; NICOLAS et al., 2006; TREIT, et al. 1981). Os comportamentos tipo-ansiosos podem ser mensurados, ainda, baseado em interações sociais de roedores. Na tarefa de interação social, os contatos sociais entre indivíduos desconhecidos em uma arena iluminada são quantificados; o número e tempo de interações sociais é inversamente proporcional à intensidade do fenótipo ansioso exibido pelo animal (FILE, 1985; CRAWLEY, 1985).

O ensaio da Neofagia também é utilizado para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em roedores, uma vez que em um ambiente novo, camundongos famintos exibem uma latência aumentada para alimentação e este comportamento se mostra sensível aos benzodiazepínicos e aos ISRS (DULAWA et al., 2004; MERALI & ANISMAN, 2003; CRAWLEY, 1985).

Medidas fisiológicas dos sinais vitais, como as frequências cardíaca e respiratória, bem como os níveis circulantes de hormônios do estresse fornecem um indicador adicional de fenótipos relacionados com a ansiedade em camundongos, complementando os ensaios comportamentais (CALHOON & TYE, 2015).

1.5 Bases Neurais da Ansiedade

A compreensão das bases neurais da ansiedade foi, por muitos anos, restrita a informações obtidas através de estudos de lesões (CALHOON & TYE, 2015). Nas últimas décadas, no entanto, verificou-se um progresso significativo no conhecimento das estruturas neurais relacionadas a estados de ansiedade (BRAGA, et al, 2010).

Para identificar as áreas neurais subjacentes à ansiedade, foram desenvolvidos paradigmas experimentais específicos e, a partir da manipulação experimental, foi possível identificar as áreas e circuitos neurais envolvidos na manifestação desta emoção (CALHOON & TYE, 2015; DUVAL, et al., 2015; ADHIKARI, 2014).

Um indivíduo é capaz de identificar e reagir a uma ameaça recebendo estímulos ambientais detectados através de seus sistemas sensoriais e, em seguida, interpretando-os como algo potencialmente perigoso. O que permite esta interpretação e a emissão de uma resposta adequada é a atividade coordenada de diversas áreas, entre elas a amígdala (AMY), o núcleo do leito da estria terminal (BNST), o hipocampo ventral (vHPC) e o córtex pré-frontal medial (mPFC). Estas estruturas se interconectam por projeções recíprocas e iniciam além dos comportamentos de vigilância, os comportamentos defensivos através do recrutamento de núcleos efetores no hipotálamo, gânglios da base e tronco encefálico (CALHOON & TYE, 2015; DUVAL, et al., 2015).

1.5.1 Regiões de processamento sensorial – Detecção dos estímulos sensoriais

A ansiedade surge do recrutamento de circuitos em resposta a estímulos ambientais ambíguos e interpretados como ameaçadores. Para que essa interpretação ocorra, um organismo deve primeiro detectar que os estímulos existem através dos seus sistemas sensoriais (CALHOON & TYE, 2015).

De acordo com modelos animais e estudos de imagem em humanos, há uma série de regiões responsáveis por receber e processar informações sensoriais. Dentre elas o córtex occipital, o giro fusiforme e o tálamo, já foram implicados na neurocircuitaria dos transtornos de ansiedade, com atividade aumentada em resposta a estímulos ameaçadores em pacientes ansiosos se comparados com pacientes saudáveis do grupo controle (DUVAL, et al., 2015).

O olfato tem uma estreita intimidade com a emoção. Filogeneticamente, este sentido é associado a necessidades primitivas relativas à recompensa, ameaça e homeostase e, ao contrário dos outros sentidos, a neuroanatomia olfativa permite uma conexão direta do bulbo olfatório com áreas primárias de processamento emocional, sem a intermediação talâmica (KRUSEMARK, et al., 2013). Estudos em modelo animal demonstraram que a bulbectomia, a remoção cirúrgica do bulbo olfatório, não só resulta em anosmia, mas também modifica os padrões de sono, causa déficit sexual além de resultar em comportamentos do tipo ansioso e depressivo (GLINKA, et al, 2012).

1.5.2 Regiões geradoras de emoções - Interpretação dos estímulos sensoriais

Uma vez que os estímulos são detectados, circuitos amplamente interconectados envolvendo a AMY, o BNST e o vHPC interpretam o significado desses estímulos e determinam se eles representam um perigo em potencial. Esta interpretação é, em parte, ditada pela experiência anterior do indivíduo e inclui a atribuição de valência emocional ao estímulo através de circuitos da amígdala basolateral (BLA) (CALHOON & TYE, 2015).

1.5.2.1 Amígdala (AMY)

Estudos em humanos e em modelos animais sugerem que a amígdala tem um papel importante na ansiedade. Tanto o aumento quanto a redução do volume amigdalares são associados a transtornos de ansiedade em humanos. Além disso, ensaios imunohistoquímicos de marcação de Fos mostraram a ativação desta estrutura após exposição a contextos ansiogênicos e, por fim, a inativação farmacológica da amígdala tem ação ansiolítica em animais expostos ao teste do labirinto em cruz elevado (ADHIKARI, 2014; TOVOTE, et al., 2015).

A amígdala é o principal local onde os estímulos ambientais são imbuídos de valor emocional e, portanto, é onde são primeiramente interpretados como ameaçadores. As sub-regiões da amígdala mais estudadas são a amígdala basolateral (BLA) e a amígdala central (CeA), esta última subdividida em lateral (CeL) e medial (CeM). A amígdala basolateral recebe os estímulos sensoriais do tálamo, bulbo olfatório e córtices sensoriais e, ao processar estas informações, associa os estímulos preditivos neutros com suas possíveis consequências atribuindo-lhes valência positiva ou negativa. Desta forma, pistas ambientais que predizem ameaças são reconhecidas como ameaçadoras assim como as pistas que predizem recompensas se tornam, elas próprias, recompensadoras. Em circunstâncias ansiogênicas, a BLA se comunica com a amígdala central (CeA), e com o BNST, e a atividade de seus neurônios não é exclusivamente moldada pela entrada de informação sensorial. Esta região também recebe projeções do mPFC e vHPC além de enviar projeções recíprocas para ambas as regiões (ADHIKARI, 2014; MCDONALD, 1998; JANAK, & TYE, 2015; DUVARCI & PARE, 2014; NAMBURI, et al., 2015; TYE & DEISSEROTH, 2012, FELIX-ORTIZ, et al., 2013; HÜBNER, et al., 2014).

1.5.2.1.1 Microcircuito da Amígdala

A amígdala não só participa de macrocircuitos, mas também processa detalhadamente as informações sensoriais em circuitos restritos a própria estrutura (CALHOON & TYE, 2015).

Como já mencionado, a AMY é composta de subnúcleos e estes são funcionalmente e morfológicamente heterogêneos e possuem interconectividade complexa. Estima-se que aproximadamente 90% dos neurônios da BLA sejam glutamatérgicos, enquanto 95% dos neurônios da CeA sejam GABAérgicos. A principal região de saída da amígdala é a sub-região de CeA, CeM que, quando excitada, se comunica com núcleos efetores fazendo a mediação de respostas autonômicas e comportamentais relacionadas ao medo e à ansiedade (TYE, et al., 2011).

Demonstrou-se que a ativação optogenética da BLA como um todo aumenta o fenótipo de ansiedade, enquanto a ativação seletiva das projeções da BLA para a CeL diminui o fenótipo de ansiedade. Esses resultados fazem sentido anatômico, uma vez que a CeL inibe a CeM, que por sua vez deixam de enviar inputs para áreas efectoras que gerariam respostas do tipo-ansiosas (TYE et al., 2011). Esses dados apontam que a classificação de uma região de amígdala como ansiogênica ou ansiolítica é uma simplificação excessiva, uma vez que diferentes células da mesma região podem ter diferentes funções dependendo dos seus alvos pós-sinápticos (ADHIKARI, 2014) (Figura 5).

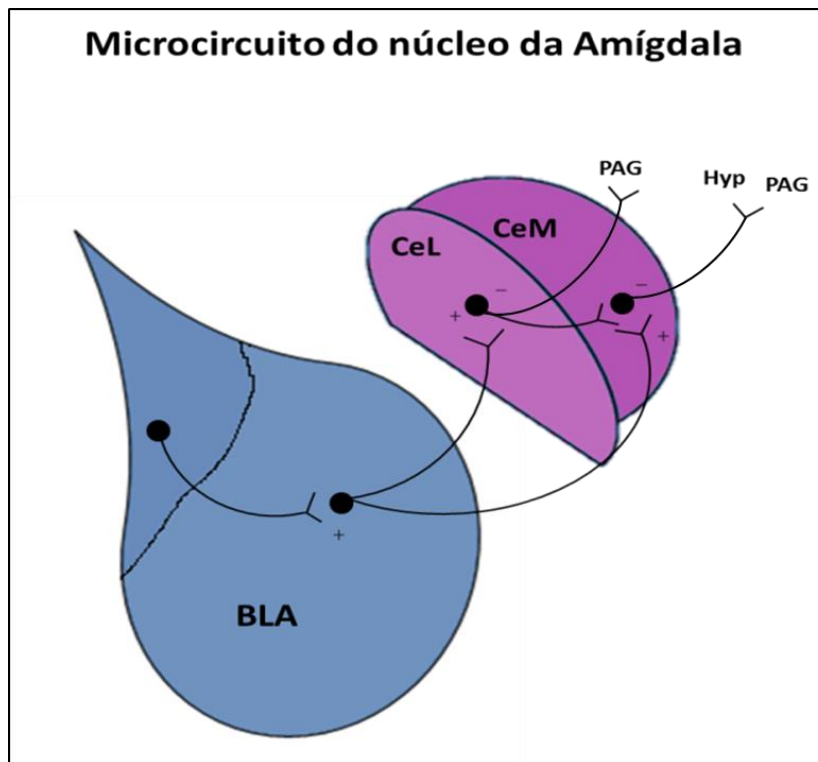


Figura 05: Figura esquemática do microcircuito da amígdala envolvido no processamento da ansiedade (Modificado de CALHOON & TYE, 2015).

1.5.2.2 Núcleo do leito da estria terminal (BNST)

Assim como ocorreu com a amígdala, um grande conjunto de evidências implicou o núcleo do leito da estria terminal na ansiedade. A iniciação da resposta de medo e a sustentação da resposta do tipo ansiosa requer o recrutamento do BNST, que ocorre, em parte, como resultado de eferências diretas da BLA, bem como através projeções vindas do vHPC, mPFC, córtex entorrinal e córtex insular (ADHIKARI, 2014; CALHOON & TYE, 2015; TOVOTE, et al., 2015).

A redundância da função da AMY e do BNST garante, por exemplo, que a aprendizagem do medo permaneça intacta mesmo em face de dano ou disfunção de uma destas estruturas (TOVOTE, et al., 2015).

A literatura sobre a participação do BNST na modulação da ansiedade em roedores é, às vezes, contraditória, não deixando claro se a atividade desta estrutura gera um efeito ansiolítico ou ansiogênico. No entanto, a anatomia do

núcleo do leito da estria terminal fornece uma explicação potencial para estas contradições, uma vez que este é composto por três sub-regiões que diferem tanto em anatomia quanto em características neuroquímicas, e estas diferenças refletem em suas funcionalidades. Desta forma, com as diferentes regiões do BNST potencialmente regulando a ansiedade em direções opostas, estudos a partir de lesões ou uso de fármacos que afetam sub-regiões distintas do BNST podem fornecer resultados conflitantes (ADHIKARI, 2014).

Jennings e colaboradores em trabalho publicado no ano de 2013 mostraram que a ativação dos terminais de axonais dos neurônios GABAérgicos do núcleo do leito da estria terminal no hipotálamo lateral de camundongos aumenta significativamente a ingestão de ração (Jennings et al., 2013a). O mesmo pesquisador juntamente com colaboradores, em outro trabalho publicado também em 2013, demonstrou que a taxa de disparo de neurônios glutamatérgicos do BNST aumentou quando os ratos foram submetidos a estímulos aversivos, enquanto os neurônios GABAérgicos do BNST apresentaram uma diminuição da taxa de disparo nas mesmas condições (JENNINGS, et al., 2013b). Estes resultados, em consonância com as citadas contradições presentes na literatura, sugerem que a identidade neuroquímica dos neurônios do núcleo do leito da estria terminal se reflete em diferenças funcionais importantes (ADHIKARI, 2014).

Em humanos, estudos de neuroimagem revelaram que, em comparação com indivíduos controle, pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade generalizada apresentam hiperativação do núcleo do leito da estria terminal quando participam de uma tarefa ansiogênica (jogo de azar). Além disto, o BNST é recrutado durante o estado de hipervigilância em indivíduos com maior fenótipo de ansiedade (ADHIKARI, 2014).

1.5.2.2.1 Microcircuito do Núcleo do leito da estria terminal

O núcleo do leito da estria terminal, como já dito anteriormente, pode ser dividido em três sub-regiões, o núcleo do leito da estria terminal ventral (vBNST), o

núcleo do leito da estria terminal anterodorsal (adBNST) e o núcleo do leito da estria terminal (ovBNST) (KIM et al., 2013).

Um estudo recente utilizando optogenética, por Kim e colaboradores e publicado no ano de 2013, demonstrou que diferentes sub-regiões do BNST regulam diferentes características do fenótipo ansioso. A inibição do BNST como um todo desencadeia efeito comportamental ansiolítico, e efeito similar ocorreu através da inibição seletiva do ovBNST. Este estudo atribuiu, ainda, papéis opostos para ovBNST e adBNST na modulação da ansiedade, bem como a segregação funcional de aferências do adBNST para o hipotálamo lateral (LH), para a área tegmental ventral e para o núcleo parabraquial (PB) (KIM et al., 2013). Uma inibição local do adBNST pelo ovBNST, predominantemente GABAérgico, gera um aumento do fenótipo ansioso. Corroborando com este achado, a inibição de terminais axonais de projeções da BLA para o adBNST também desencadeou um efeito ansiogênico fisiológico e comportamental. Por outro lado, quando estimuladas, estas mesmas terminações conduziam a uma resposta ansiolítica (KIM et al., 2013) (Figura 6).

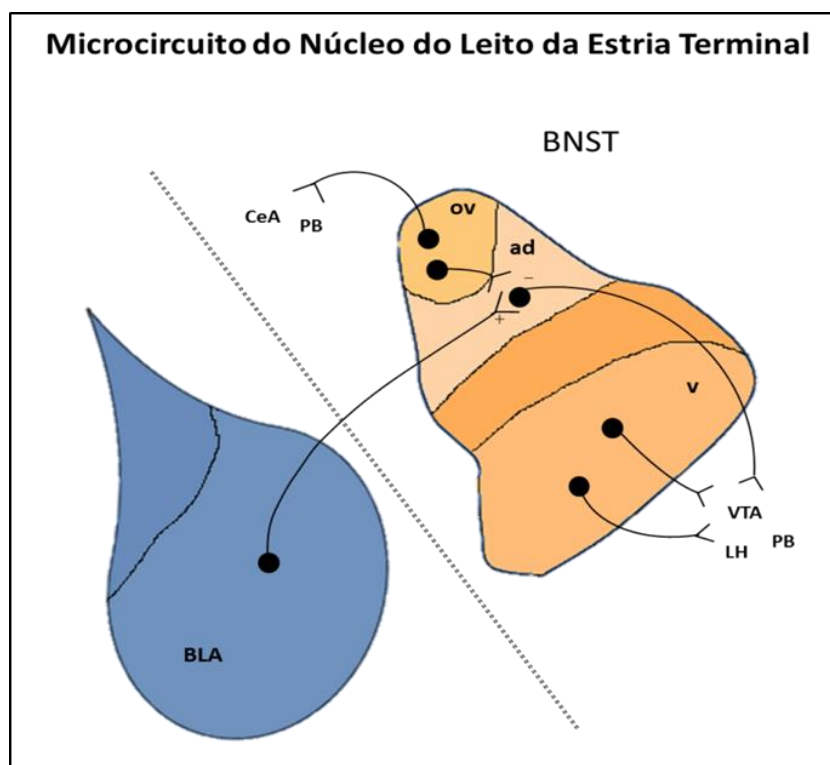


Figura 06: Figura esquemática do microcircuito do núcleo do leito da estria terminal envolvido no processamento da ansiedade (Modificado de CALHOON & TYE, 2015).

1.5.2.3 Hipocampo Ventral (vHPC)

O hipocampo é uma região cerebral altamente estruturada com um elaborado microcircuito. O vHPC participa da interpretação dos sinais sensoriais situando-os em um contexto através de sua conexão recíproca com a BLA, bem como suas projeções eferentes para o mPFC. Esta estrutura serve, ainda, como uma importante fonte de sincronia entre a amígdala e o mPFC durante situações de ameaça (CALHOON & TYE, 2015).

Estudos em modelo animal demonstraram que interações recíprocas entre a BLA e o hipocampo ventral regulam o aprendizado do medo e os comportamentos do tipo ansiosos. Demonstraram, ainda, que a estimulação das projeções da BLA para o vHPC desencadeiam comportamento ansiogênico (CULLINAN, et al., 1993; DONG, et al., 2001; VAN STRIEN, et al., 2009).

Sabe-se, também, que, as projeções da BLA para a formação hipocampal através do córtex entorrinal são necessárias para a aquisição de memórias contextuais de medo, pois a inibição destas projeções durante a aprendizagem bloqueia o comportamento de freezing durante a reexposição ao contexto (SPARTA, 2014).

Além disso, os terminais glutamatérgicos de fibras projetadas da BLA para neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo ventral controlam, de maneira bidirecional, comportamentos inatos relacionados à ansiedade nos teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto. O aumento da atividade dos neurônios pertencentes a estas projeções exacerba o comportamento do tipo ansioso, enquanto a inibição desta via reduz este tipo de comportamento (Degroot, & Treit, 2004; Felix-Ortiz, et al. 2013).

No entanto, estudos através de optogenética demonstraram que a estimulação direta das células granulosas do giro denteado do vHPC gera uma resposta ansiolítica. Embora essa descoberta pareça entrar em conflito com as obtidas através da manipulação de projeções da BLA para o vHPC, elas podem potencialmente ser reconciliadas, uma vez que, estimulando com baixa frequência

os neurônios do giro denteado do vHPC, estes inibem neurônios piramidais de CA3 (KHEIRBEK, et al, 2013; MORI, et al., 2004).

Os efeitos da ativação do VHPC em comportamentos relacionados à ansiedade ocorrem, ainda, parcialmente através das conexões desta estrutura com o septo lateral, que por sua vez está conectado reciprocamente ao hipotálamo. A estimulação das projeções ipsilaterais do vHPC para septo lateral geram um comportamento ansiogênico. O bloqueio bilateral de atividade em qualquer das estruturas tem efeito ansiolítico (RISOLD & SWANSON, 1996; RISOLD & SWANSON, 1997; TRENT & MENARD, 2010).

1.5.3 Regiões de Regulação – Avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais

Após a interpretação de um estímulo ambiental ambíguo, estruturas adicionais avaliam se os eventos externos refletem as expectativas geradas a partir da interpretação e se eles vão ao encontro ou contradizem as necessidades do animal para então poder gerar a resposta comportamental apropriada ao modular a ativação de regiões envolvidas na interpretação do estímulo, como, por exemplo, a amígdala.

1.5.3.1 Córtex Pré-Frontal Medial

Para evitar a ativação de circuitos ansiogênicos, é necessária uma avaliação extra se as interpretações de ameaças ambientais são precisas e ponderadas adequadamente, seja a partir de pistas internas (homeostáticas e hormonais) ou externas (suporte do grupo, perigo percebido). Uma fonte integral de avaliação das interpretações de ameaças é o córtex pré-frontal medial, que regula respostas subcorticais diante de estímulos ameaçadores fornecendo feedback permissivo ou

restritivo aos circuitos de interpretação para promover ou reprimir a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade (CALHOON & TYE, 2015).

O mPFC contém neurônios piramidais excitatórios e um grande número de interneurônios inibitório e é organizado em seis camadas em seres humanos, nomeadas de I a VI e cinco camadas em roedores, nos quais camada IV está ausente (MARKRAM, et al., 2004).

Esta estrutura pode ser dividida em sub-regiões distintas com base em sua citoarquitetura. As principais subdivisões do mPFC em roedores incluem os córtices pré-límbico (PL) e infra-límbico (IL). Ambos recebem projeções dos núcleos talâmicos da amígdala basolateral e do hipocampo, e enviam projeções para BLA (CALHOON & TYE, 2015; SUZUKI, et al., 2016).

As conexões recíprocas entre o mPFC e a amígdala foram amplamente estudadas diante de situações ansiogênicas tanto em seres humanos como em camundongos. A função avaliativa do córtex pré-frontal medial fica evidente, uma vez que as interações desta estrutura com a BLA diferem dependendo do grau de ameaça ambiental (KIM, et al., 2011; OCHSNER, et al., 2002; GRACE & ROSENKRANZ, 2002).

Durante o condicionamento auditivo ao medo, a atividade nos neurônios da BLA que se projetam para PL aumenta, e as respostas desta mesma região diante de pistas de previsão de choque aumentam após o aprendizado (SENN, et al., 2014; BURGOS-ROBLES, et al., 2009).

Em contraste, a extinção do medo condicionado aumenta a atividade de neurônios da BLA que se projetam para a porção infra-límbica do mPFC. O aumento da atividade desta região está associado à extinção do medo e sua estimulação elétrica reduz o comportamento de freezing diante do estímulo condicionado, mesmo em animais que são resistentes ao treinamento de extinção (SENN, et al., 2014; MILAD & QUIRK, 2002; MAROUN, et al., 2012).

Em condições naturais, essas duas subdivisões do mPFC de camundongos exercem níveis semelhantes de excitação exercendo uma inibição nos neurônios da BLA. Após o condicionamento auditivo ao medo, no entanto, as respostas excitatórias evocadas por terminais sinápticos de neurônios PL na BLA aumentam como consequência do aumento da função de receptores glutamatérgicos AMPA.

Além disso, a ativação direta do BLA por projeções do PL realiza a mediação das respostas de freezing diante da apresentação do estímulo condicionado (CALHOON & TYE, 2015; SUZUKI, et al., 2016).

Esses achados indicam que as projeções do PL para BLA facilitam as respostas diante de estímulos ansiogênicos enquanto as projeções do IL para a BLA as suprimem (CALHOON & TYE, 2015; SUZUKI, et al., 2016).

1.5.3.2 Área Tegmental Ventral

Os sinais de homeostase energética e motivação também definem o grau de influência das interpretações de ameaça sobre as respostas comportamentais. Dada a motivação suficiente para a busca de comida, ou água, ou para acasalar, o animal se engajará nesses comportamentos apetitivos mesmo diante de perigos potenciais. Ou seja, nos casos em que os benefícios esperados superam os custos percebidos, o impacto das interpretações da ameaça no comportamento é diminuído. Um exemplo disso é visto quando terminais sinápticos de LH na área tegmental ventral (VTA) são estimulados motivando os camundongos a atravessar um piso eletrificado para obter sacarose (Nieh, et al., 2015).

A VTA é conhecida por orientar o comportamento motivado. Recentemente foi mostrado, através de estudos de imagem em humanos que a hiperatividade de VTA está associada ao transtorno de ansiedade generalizada (GAD). Em consonância com estes achados, Small e colaboradores, em trabalho publicado em 2016, demonstraram que o aumento do tônus colinérgico em VTA gera comportamentos do tipo ansioso e depressivo no teste do labirinto em cruz elevado e do nado forçado, respectivamente. Além disso, verificaram que a ativação seletiva de receptores muscarínicos na VTA foi suficiente para desencadear um comportamento do tipo ansioso. Em contraste, a diminuição da atividade colinérgica na VTA, produz efeitos antidepressivos e ansiolíticos (SMALL, 2016).

Kim e colaboradores mostraram que a estimulação de terminais sinápticos do adBNST para VTA induziu, em camundongos, uma preferência pelo ambiente onde a estimulação ocorria em comparação com um segundo ambiente da arena de teste,

sem, no entanto, alterar parâmetros comportamentais de ansiedade, mensuráveis no teste de preferência de ambiente, como a avaliação de risco ou parâmetros fisiológicos (KIM et al., 2013).

Além disso, o vBNST envia projeções glutamatérgicas e GABAérgicas para células não dopaminérgicas na VTA. Sabe-se que a estimulação destas projeções glutamatérgicas gera uma resposta ansiogênica, enquanto a estimulação das projeções GABAérgicas desencadeiam uma resposta ansiolítica (KIM et al., 2013).

1.5.3.3 Área Hipotalâmica Lateral

A área hipotalâmica lateral medeia uma série de processos cognitivos, fisiológicos e comportamentais, como promover o comportamento de alimentação, reduzir a percepção da dor, regular a temperatura corporal, funções digestivas, pressão sanguínea, entre muitos outros (LI, et al.,2014; Flores, et al.,2013).

Sabe-se ainda que esta área recebe projeções do adBNST mas não do ovBNST e é necessária para o comportamento normal durante o teste do labirinto em cruz elevado. Além disso, já foi mostrado que os neurônios do adBNST que se projetam para LH recebem projeções da BLA. Posto isso, a projeção do adBNST para a área hipotalâmica lateral (LH) é uma candidata para a mediação da diminuição da expressão comportamental da ansiedade (KIM et al., 2013).

Kim e colaboradores mostraram então que a estimulação dos terminais sinápticos de adBNST direcionados ao HL gerou efeitos comportamentais ansiolíticos tanto no teste do labirinto em cruz elevado quando no teste do campo aberto, sem alterar, no entanto, parâmetros fisiológicos como a frequência respiratória (KIM et al., 2013).

Outro estudo, já mencionado, desenvolvido por Jennings e colaboradores no ano de 2013 mostrou que a ativação dos terminais axônais dos neurônios GABAérgicos do núcleo do leito da estria terminal no hipotálamo lateral de camundongos desencadeou um aumento de ingestão de ração. Este efeito observado pode desempenhar um papel significativo no ganho peso e nas

anormalidades de alimentação observadas em pacientes diagnosticados com transtornos de ansiedade (Jennings et al., 2013a).

1.5.4 Regiões de iniciação da resposta relacionada à ansiedade

Em consequência da interpretação e avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais, a resposta adequada a situação é iniciada a partir da ação de núcleos efetores localizados no hipotálamo e no tronco cerebral (CALHOON & TYE, 2015).

1.5.4.1 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é formado por uma gama heterogênea de neurônios que regulam as atividades motora, comportamental, autonômica. Estes neurônios neuroendócrinos podem ser divididos em dois grupos. Os primeiros são magnocelulares e são encontrados nos núcleos PVN e supraópticos, o segundo é parvicelular e geralmente está localizado mais medialmente do que os neurônios neuroendócrinos magnocelulares no PVN de roedores (GRAEFF, 2007).

Tanto o eixo HPA quanto o eixo simpatoadrenal são ativados pela ansiedade. Durante a ansiedade aguda, a ativação do eixo HPA é adaptativa, uma vez que, entre outras coisas, os corticóides parecem reduzir a percepção do medo. Na ansiedade crônica, no entanto, a ativação a longo prazo do eixo HPA pode se tornar prejudicial, uma vez que os corticóides dificultam os mecanismos de resiliência no hipocampo (GRAEFF, et al., 1993).

A ativação do receptor do fator de liberação de corticotropina (CRFR) no septo lateral aumenta os fenótipos relacionados à ansiedade por meio da ativação de neurônios de projeções GABAérgicas. A ativação desses neurônios resulta na inibição da área hipotalâmica anterior, cuja atividade inibe tanto o núcleo paraventricular do hipotálamo quanto a substância cinzenta periaquedutal. A

resultante desinibição dessas regiões promove aspectos neuroendócrinos e comportamentais do estado de ansiedade e redobram as ações complementares de CeA e BNST ativando o eixo HPA (HENRY, et al., 2006).

1.5.4.2 Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

O hipotálamo medial é anatomicamente e funcionalmente subdividido entre núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH), núcleo hipotalâmico anterior, parte dorsomedial do hipotálamo ventromedial e núcleo dorsal pré-mamilar (SÉVOZ-COUCHE, 2013; NASCIMENTO, et al. 2010).

Esta região participa da regulação de diversas funções comportamentais e fisiológicas, como ingestão de alimentos e metabolismo, reprodução e comportamentos defensivos, especialmente envolvidos na integração de respostas inatas a ameaças ambientais (SÉVOZ-COUCHE, 2013; NASCIMENTO, et al. 2010).

Estudos demonstraram que a estimulação elétrica desta região induz o comportamento de fuga incondicionada e a excitação autonômica, mesma resposta apresentadas pelos animais diante perigos potenciais (NASCIMENTO, et al. 2010).

O trabalho desenvolvido por Nascimento e colaboradores, em 2010, demonstrou que a inativação temporária do DMH por injeção local de muscimol, um agonista GABA_A prejudica seletivamente o comportamento de fuga no teste do labirinto em T elevado, corroborando com diversos estudos anteriores e afirmando o DMH como um importante substrato neurobiológico envolvido na fisiopatologia da ansiedade e do transtorno de pânico (NASCIMENTO, et al. 2010).

No entanto, a administração intra-DMH de muscimol não altera as medidas de esquia no teste do labirinto em T elevado, uma resposta de ansiedade condicionada (NASCIMENTO, et al. 2010).

1.5.4.3 Substância Cinzenta Periaquedutal

A Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) é uma estrutura funcionalmente heterogênea, implicada, entre outros, na modulação da dor, na regulação cardiovascular e respiratória, no controle do medo e da ansiedade. É conhecida, particularmente, por atuar como um centro de controle dos comportamentos de medo através da ativação das partes rostral e caudal da coluna lateral e a parte caudal da coluna ventrolateral induzindo luta defensiva, fuga e congelamento, respectivamente (CARRIVE, 1993; GRAEFF, et al., 1993).

Clinicamente, a disfunção da PAG resulta no transtorno do pânico (GRAEFF, et al., 1993).

Estudos realizados tanto em humanos como em modelo animal verificaram que a estimulação da substância cinzenta periaquedutal elicia respostas relacionadas à ansiedade e ao pânico, acompanhadas da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Outros estudos demonstraram que a lesões na porção ventrocaudal da PAG diminuíram o fenótipo ansioso de animais no teste do labirinto em cruz elevado (GRAEFF, et al., 1993; GRAEFF, 2007).

1.5.4.4 Núcleo Parabraquial

O núcleo parabraquial (PB) desempenha diversas funções, dentre elas, a regulação cardiovascular, respiratória e gastrointestinal, processamento de sinais hemodinâmicos, controle da liberação de hormônio e processamento nociceptivo (YAMAMOTO em al., 2009).

O trabalho realizado por Kim e colaboradores em 2013, propôs que projeções do adBNST para o núcleo parabraquial poderia mediar a diminuição da taxa respiratória em situações ansiolíticas vivenciadas por camundongos, uma vez que esta estrutura participa da regulação respiratória (KIM et al., 2013).

Foi demonstrado que a estimulação do PB pelo adBNST gera uma diminuição da taxa respiratória, inclusive em situações ansiogênicas, sem alterar, no entanto, o comportamento do tipo ansioso (KIM et al., 2013).

Ao avaliar projeções do ovBNST para o núcleo parabraquial a situação encontrada foi oposta. Ao estimular terminações nervosas da porção oval do núcleo do leito da estria terminal, predominantemente GABAérgico, para o núcleo parabraquial, observa-se um aumento da taxa respiratória (KIM et al., 2013).

Em resumo, no macrocircuito formado pelas estruturas descritas acima, as informações sensoriais recebidas do ambiente chegam até a amígdala e, a partir dela, são distribuídas para o BNST, vHPC, mPFC, VTA e para as demais áreas efetoras. Ao caminhar neste sentido as informações são interpretadas. Em seguida o mPFC e o vHPC retornam estas informações para a AMY e para o BNST, avaliando a interpretação inicial desencadeando, a partir desta avaliação, a iniciação da resposta adequada ao estímulo sensorial recebido (CALHOON & TYE, 2015; DUVAL, et al., 2015) (Figura 07).

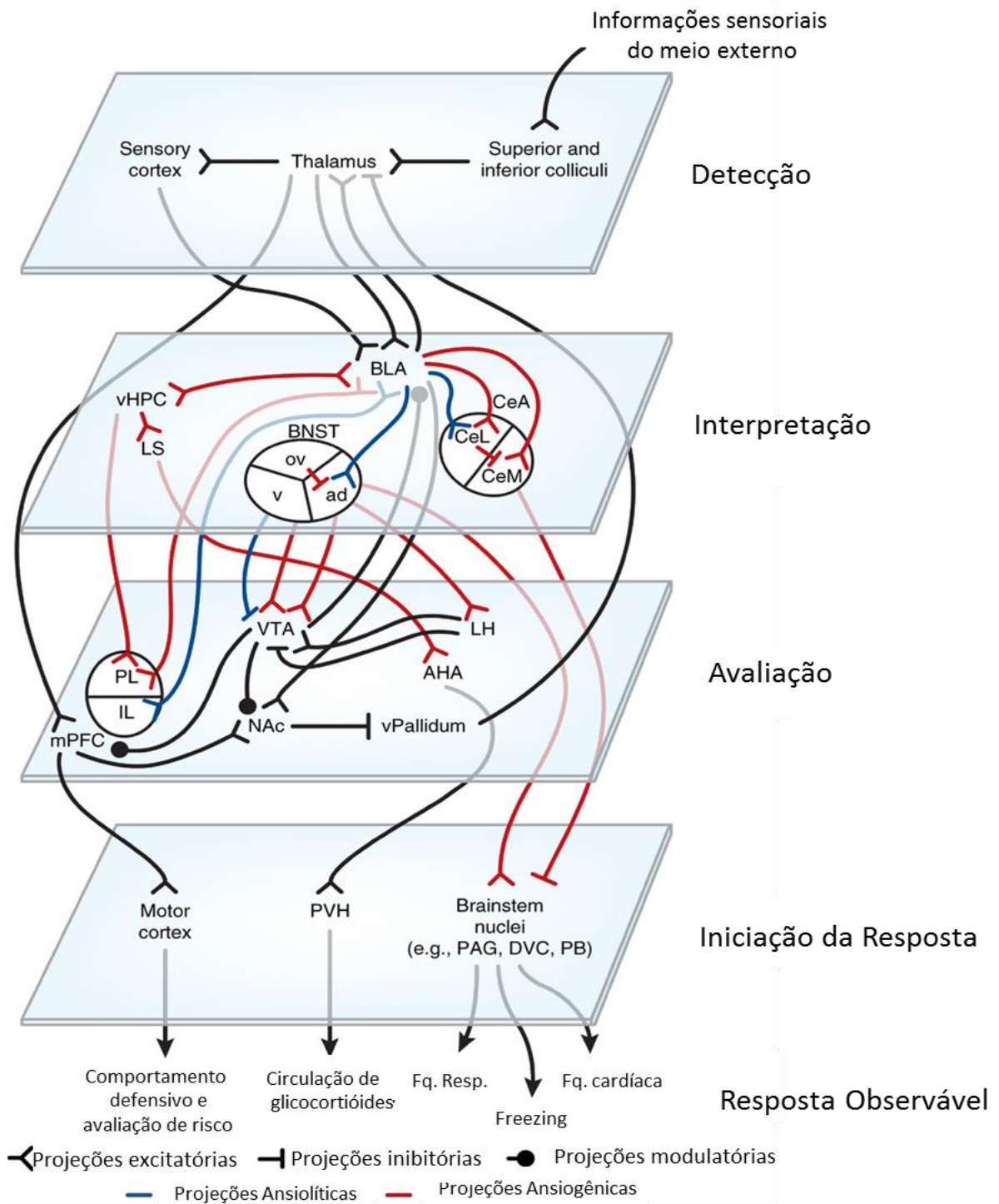


Figura 07: Figura esquemática do macrocircuito envolvido no processamento da ansiedade. (Modificado de Calhoun & Tye, 2015).

2. Justificativa

Os hormônios ovarianos, 17 β -estradiol (E2) e a progesterona, têm efeito pleiotrópico no cérebro e no corpo (WALF et al., 2010). Estudos em animais revelaram que o estradiol, juntamente com a progesterona, aumenta a neurogênese no hipocampo de fêmeas (BARKER & GALEA, 2008; GALEA, et al., 2013), o que pode estar relacionado ao efeito antidepressivo dos hormônios, uma vez que a depressão está associada com a diminuição da proliferação celular e neurogênese no hipocampo (GALEA, et al., 2013, ZHANG, et al., 2016). O estradiol parece ainda mediar efeitos comportamentais através da estimulação indireta da síntese de serotonina e da regulação da expressão dos receptores deste neurotransmissor (LAGUNAS et al., 2010; PICAZO et al., 2006). Já a progesterona, agindo através de seu metabólito alopregnanolona, induz efeito ansiolítico ao estimular receptores GABA/benzopiazepínicos (PICAZO et al., 2006).

Clinicamente, a menopausa se inicia com o último ciclo menstrual e doze meses após a última menstruação tem início o período da pós-menopausa, caracterizado pela depleção dos hormônios ovarianos estrógeno e progesterona. Este momento de transição é marcado por alterações endócrinas e metabólicas, além de deterioração cognitiva e distúrbios do humor (CAGNACCI et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2015; MALACARA et al., 2004). Estudos clínicos apontaram que o estado de humor - ansioso e/ou deprimido – de mulheres no período pós-menopausal, avaliado por uma escala psiquiátrica validada, melhora com uma breve reposição hormonal (CAGNACCI et al., 1999).

Uma vez que hormônios ovarianos possuem efeito antidepressivo e ansiolítico e, em consonância com os dados clínicos apresentados sobre distúrbios de humor no período pós-menopausal, pode-se inferir que uma privação hormonal prolongada representa um fator de risco para o desenvolvimento de desordens afetivas (LAGUNAS et al., 2010). Considerando o aumento da expectativa de vida da população, as mulheres enfrentam um período mais longo de pós-menopausa (WALF et al., 2010), e, dentre os distúrbios de humor decorrentes, a ansiedade está entre os de maior queixa (PICAZO et al., 2006). Este estado de humor é

representado por alta excitação e valência negativa. Embora indivíduos saudáveis apresentem situações esporádicas de ansiedade, sua persistência ou desproporcionalidade podem ser debilitantes, tornando-a patológica (CALHOON & TYE, 2015; TOVOTE et al., 2015).

Um dos focos de investigação do nosso laboratório é verificar o efeito da privação de hormônios ovarianos na modulação de processos cognitivos e afetivos. Foi identificado, em camundongos fêmeas após 12 semanas de ovariectomia, um pior desempenho na tarefa de memória de reconhecimento de novo objeto quando comparado ao grupo controle (FONSECA et al., 2013). Em outro estudo foi verificado, neste mesmo modelo de pós-menopausa, a presença do comportamento do tipo-depressão, associado ao déficit cognitivo (BASTOS et al., 2015).

Com base nos achados da literatura e em continuidade às pesquisas já iniciadas pelo nosso grupo, o objetivo deste estudo foi investigar como a privação hormonal pode modular transtornos de humor do tipo-ansiedade. Acreditamos que esta pesquisa, como um passo inicial para compreender as bases neurais da ansiedade na situação específica de privação hormonal, trará contribuições ao embasamento teórico que possibilitará fundamentar novos estudos e condutas terapêuticas mais adequadas.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo Geral*

Investigar se e como a privação dos hormônios ovarianos pode modular transtornos do tipo-ansiosos.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Avaliar o comportamento tipo-ansioso de camundongos fêmeas, após 12 semanas da ovariectomia, utilizando diferentes paradigmas comportamentais;
2. Verificar o efeito de 12 semanas de ovariectomia sobre o peso corpóreo;
3. Testar o efeito do fármaco diazepam sobre o comportamento tipo-ansioso de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas;
4. Avaliar alterações comportamentais de camundongos fêmeas, submetidas ou não a 12 semanas de ovariectomia, durante a exposição a um evento com alto potencial ansiogênico, ou seja, os braços abertos do labirinto em cruz elevado;
5. Avaliar o efeito de 12 semanas de ovariectomia no padrão de ativação neuronal de áreas cerebrais funcionalmente envolvidas nos circuitos ansiogênicos e ansiolíticos, após exposição a um evento com alto potencial ansiogênico, ou seja, os braços abertos do labirinto em cruz elevado.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram alocados no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica, exclusivo para camundongos, em uma estante ventilada e dentro gaiolas grandes (0,3 x 0,5 x 0,4 m) com, no máximo, 12 animais, livre acesso à água e ração, exceto quando devidamente explicitado. A temperatura ambiente foi mantida à $22\pm 1^\circ\text{C}$, com umidade de 40-70% e controle do ciclo claro-escuro de 12/12 horas (7:00 às 19:00hs).

Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos durante a fase clara do ciclo (entre 08:00hs e 17:00hs).

Todos os experimentos foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o protocolo nº. 392 / 2015.

4.2 Cirurgia - Ovariectomia (OVX) / Sham

Os animais receberam uma injeção única de pentabiótico (160mg/kg) via intramuscular e, meia hora depois, uma única injeção de tramadol (0.05mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) /xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal e, após verificada a ação da anestesia através do reflexo de retirada de pata, realizou-se a tricotomia e a higienização da região abdominal lateral com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI). A pele e a musculatura foram bilateralmente incisadas na região abaixo da última vértebra lombar e, através da incisão os ovários, foram identificados, expostos e removidos no grupo OVX. No

grupo controle (Sham) foi realizado procedimento similar, no entanto, os ovários foram apenas identificados e expostos (Figura 08).

A musculatura e a pele foram posteriormente suturadas e, antes de voltarem a ser manipulados, os animais tiveram 4 dias para se recuperarem da cirurgia, sendo sua recuperação cuidadosamente acompanhada.

Após o quarto dia, nos 120 dias seguintes, aproximadamente 3 vezes por semana, estes animais eram manipulados somente para verificação do peso corporal e limpeza das caixas. A partir do 120º dia deu-se início os protocolos experimentais.

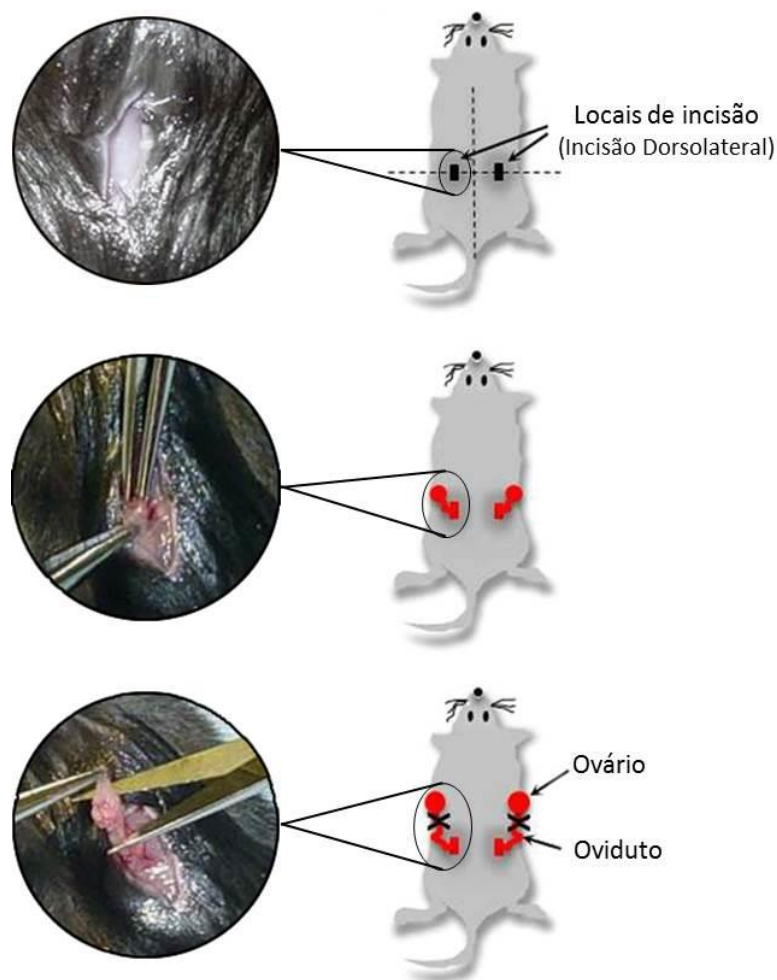


Figura 08: Imagem representativa e figura esquemática da cirurgia de ovariectomia. (Modificado de Sophocleus & Idris, 2014).

4.3 Avaliação do ciclo estral por esfregaço vaginal

Tendo em vista que a fase do ciclo estral pode exercer influência sob os comportamentos avaliados e, considerando que a persistência da fase diestro é um indicativo de eficiência da ovariectomia, verificou-se fase do ciclo estral dos animais através da técnica de esfregaço vaginal.

Durante a semana anterior ao início dos experimentos, as fêmeas passaram por um período de adaptação à manipulação. Os animais foram cuidadosamente contidos ficando sob a grade de sua própria gaiola, levantou-se a cauda e uma ponteira contendo 10 μ L de solução salina estéril foi gentilmente introduzida na abertura do ducto vaginal, sem que ocorresse penetração. O líquido foi, então, depositado e, em seguida, sugado de volta à ponteira obtendo-se um lavado contendo as células epiteliais da mucosa vaginal que, colocado sobre uma lâmina, foi analisado à fresco no microscópio óptico OLYMPUS CX31® nas objetivas 10x e 20x (Figura 09).

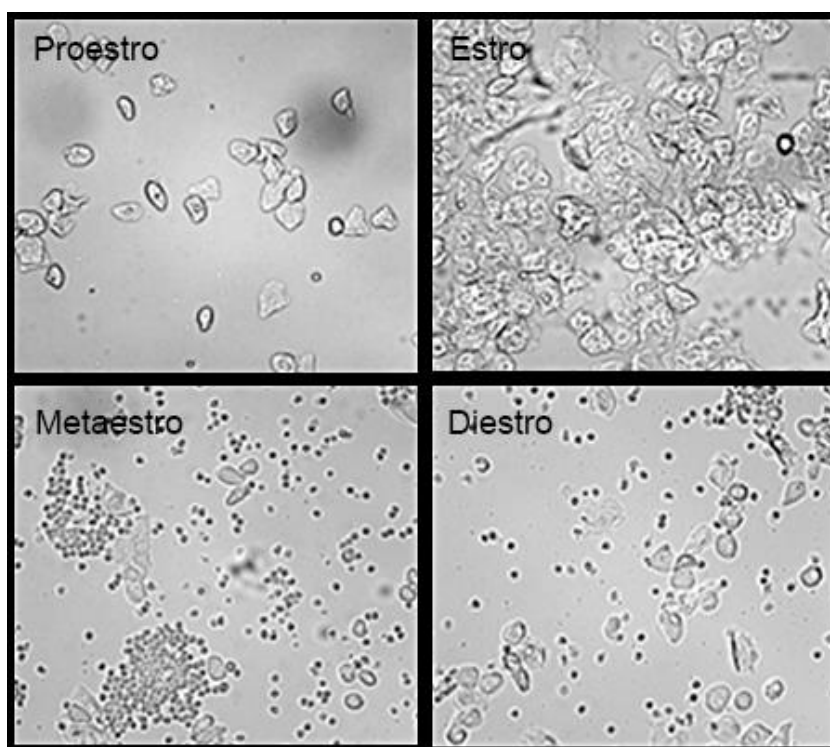


Figura 09 : Imagem representativa de esfregaço vaginal em cada fase do ciclo estral. (Modificado de ZENCLUSSEN, et. al., 2014).

4.4 Tarefas comportamentais

As tarefas comportamentais foram realizadas, na ordem aqui descrita, 120 dias após a cirurgia dos grupos SHAM e OVX no período que compreende às 9:00 e às 15:00 horas.

4.4.1 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é baseado no modelo proposto em 1985 por Pellow e colaboradores em ratos e validado para camundongos por Lister em 1990, sendo utilizado para detectar comportamentos do tipo-ansioso.

O aparato consiste em um labirinto de acrílico elevado a 45 cm do solo formado por quatro braços, sendo dois abertos opostos entre si (30 x 5 cm) e dois fechados também opostos entre si (30 X 5 x 15 cm). Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais.

Para a realização do teste, após a limpeza do aparato utilizando-se álcool 70%, os camundongos foram colocados individualmente no centro do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento foi avaliado durante os 5 minutos que permaneceram no aparato. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, fechados e no centro do equipamento, a porcentagem de entradas nos braços abertos, o tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos, a frequência em que os animais efetuam comportamentos de avaliação de risco, mergulhos de cabeça, autolimpeza e exploração vertical (Figura 10).

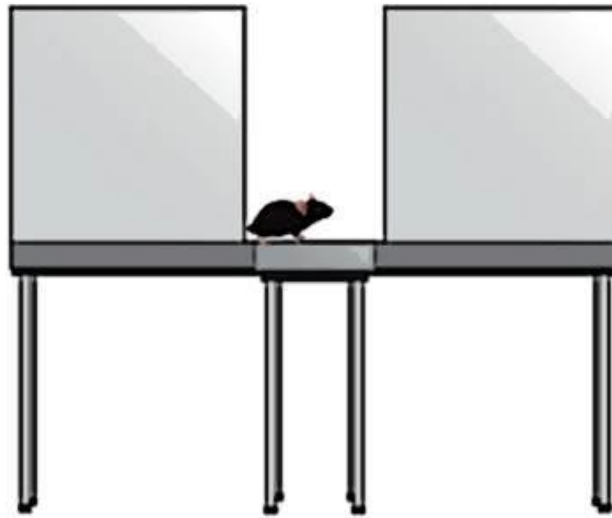


Figura 10: Figura esquemática do teste do labirinto em cruz elevado.

4.4.2 Teste da caixa de atividade locomotora

Este teste foi utilizado para verificar alterações na atividade locomotora. A locomoção é um parâmetro importante, tendo em vista que os testes comportamentais envolvidos no presente estudo dependem da integridade da atividade locomotora dos sujeitos experimentais.

O aparato consiste em uma arena em acrílico transparente de dimensões 25x25cm acoplada a um sistema automatizado de infravermelho (Actitrak v2.7.13.). Este sistema permite monitorar a distância total percorrida na arena, em centímetros, além da exploração vertical (Figura 11).

O animal foi colocado no centro da arena e a explorou livremente por 5 minutos. Antes do início de cada teste a caixa foi higienizada com álcool 70% (Branchi, et al., 2002).



Figura 11: Figura esquemática do teste de atividade locomotora.

4.4.3 Teste de ocultar esferas

Este teste, desenvolvido por Treit e colaboradores, em 1981, é utilizado para detectar comportamentos do tipo-ansioso bem como comportamentos do tipo-compulsivo.

Os animais foram individualmente colocados em uma caixa de acrílico (37cm x 21cm x 14cm) contendo 20 esferas de vidro, separadas entre si sobre 5cm de maravalha, que cobria o fundo da caixa. A duração do teste foi de 20 minutos e, ao final, foi mensurado o número de bolinhas com no mínimo 2/3 de sua superfície enterradas (Figura 12).

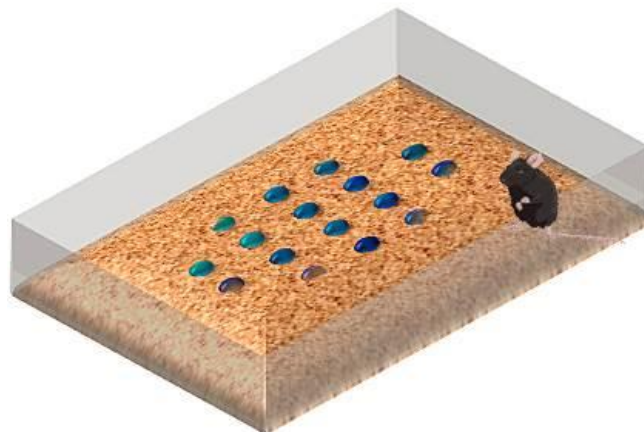


Figura 12: Figura esquemática do teste de ocultar esferas.

4.4.4 Teste transição claro-escuro

Desenvolvido em 1980 por Crawley e Goodwing para avaliar os efeitos ansiolíticos de drogas benzodiazepínicas, o modelo da caixa claro/escuro (CCE) - A x L x C (mm) 300 x 270 x 460 é constituído de dois compartimentos, um escuro (1/3 da caixa) e um iluminado (2/3 da caixa), interligados por uma pequena abertura. Após a higienização do aparato com álcool 70%, os animais foram colocados individualmente no compartimento claro da caixa com a cabeça voltada para a porta divisória. Seu comportamento foi observado durante 5 minutos, sendo este tempo contado a partir da sua primeira entrada com as 4 patas no compartimento escuro. Foram registrados: a latência para deixar o compartimento claro em direção ao escuro, a porcentagem de tempo despendido pelo animal no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos (Figura 13).

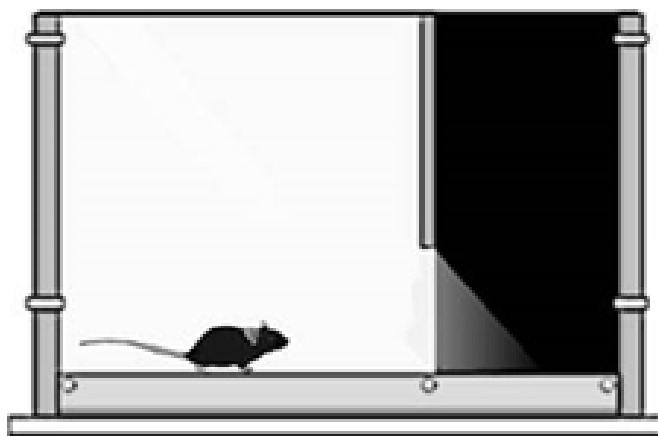


Figura 13: Figura esquemática do teste de transição claro-escuro

4.4.5 Teste de Neofagia

Este teste tem sido utilizado para verificar o comportamento do tipo-ansioso de roedores em um ambiente desconhecido. Para tal, os animais avaliados foram submetidos a um jejum de 18 horas, anterior ao teste. Foi utilizada uma caixa (0,3 x 0,5 x 0,4 m) forrada com maravalha onde, no centro, encontrava-se um círculo de

papel (10 cm de diâmetro) e sobre ele uma quantia mensurada de ração padrão (entre 20 e 25g). O animal foi disposto na lateral da caixa e avaliado por 30 minutos sob 3 lux. Nesse período, o animal passou pelo conflito entre explorar/temer o ambiente novo ou se alimentar. Foram medidas a quantidade de ração ingerida e a latência para o início da alimentação (Figura 14).

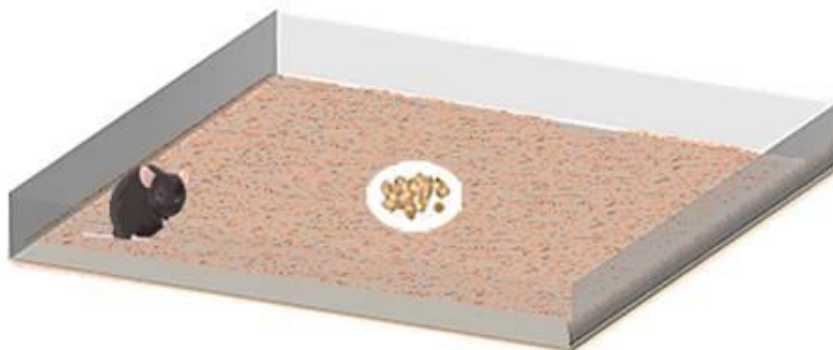


Figura 14: Figura esquemática do teste de neofagia.

4.4.6 Teste do Campo aberto

O teste de campo aberto possibilita a análise da atividade locomotora através da mensuração do número total de entradas nos quadrantes da arena, bem como do comportamento do tipo-ansioso pela mensuração da permanência do animal nos quadrantes periféricos comparados aos centrais do campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003).

O teste é realizado em uma arena de acrílico (50cm x 50cm x 50cm), cujo fundo é dividido em 25 quadrantes. Após a higienização com álcool 70%, os animais foram individualmente colocados no centro da arena e, durante 20 minutos, a exploraram livremente. Quantificou-se o número de quadrantes centrais e periféricos percorridos na arena, o tempo que o animal permaneceu em cada uma das regiões e a frequência dos comportamentos de autolimpeza e exploração vertical (Figura 15).

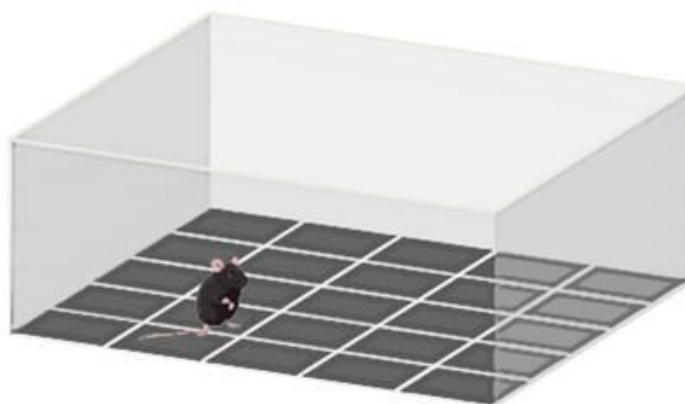


Figura 15: Figura esquemática do teste do Campo Aberto.

4.4.7 Teste do Labirinto em cruz elevado modificado (LCEM)

O teste do labirinto em cruz elevado modificado é baseado no, já citado, teste do labirinto em cruz elevado proposto por Pellow e colaboradores.

O aparato consiste no mesmo labirinto de acrílico anteriormente descrito, porém, com acesso livre apenas para porção central e braços abertos. Desta forma, impossibilitamos a fuga do animal para o ambiente menos aversivo (braços fechados). Com a ausência de possibilidade de fuga do animal para os braços fechados do labirinto, teoricamente, o teste se tornou predominantemente ansiogênico. Os braços abertos foram divididos nas porções: proximal, intermediária e distal em ordem crescente de aversividade, respectivamente, para que pudéssemos realizar as medidas comportamentais (Figura 16B).

Fez-se a limpeza do aparato utilizando-se álcool 70% inicialmente e entre cada teste. Para a realização da tarefa os camundongos foram colocados individualmente no centro do LCEM, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento foi avaliado durante os 5 minutos que permaneceram no aparato. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: o tempo de permanência dos animais no centro do equipamento e em cada porção dos braços abertos, o número de entradas em cada porção dos braços abertos, a frequência em que os animais efetuaram comportamentos de avaliação de risco, mergulhos de cabeça, autolimpeza e congelamento (Figura 16A).

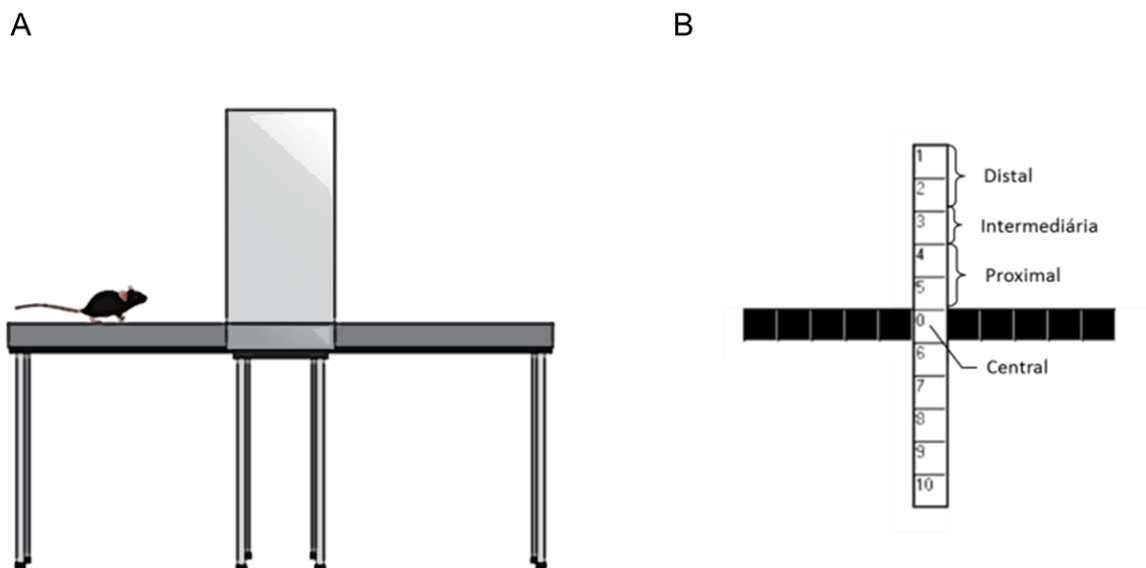


Figura 16: Figura esquemática do labirinto em cruz elevado modificado como estímulo ansiogênico. A) Aparato sendo utilizado disponibilizando apenas os braços abertos. B) Divisão das porções dos braços abertos.

4.5 Droga e tratamento farmacológico

Modelos animais de patologias humanas devem satisfazer 3 principais critérios de validade: Validade aparente: o fenótipo animal deve reproduzir as condições humanas para permitir que fenótipos em animais sejam extrapolados para condições humanas. Validade do constructo: as causas da doença em humanos devem ser equivalentes em modelos animais. Validade preditiva: agentes farmacológicos que reduzem a condição patológica em humanos devem ser efetivos em animais (Calhoon & Tye, 2015)

Para validação preditiva do nosso modelo de aumento de ansiedade na menopausa, utilizamos o tratamento agudo com diazepam. A droga foi administrada na dose de 1mg/Kg pela via intra-peritoneal, 30 minutos antes da realização dos testes comportamentais.

Foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste transição claro-escuro e do teste do campo aberto para a avaliação do efeito do Diazepam em nosso modelo.

4.6 *Imunohistoquímica*

Para a análise da expressão protéica do gene de expressão imediata (Fos), os grupos foram eutanasiados 1:30 hora após exposição ao LCEm.

Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal e, após a certificação da anestesia através do reflexo de retirada de pata, realizou-se manualmente a perfusão com 15 mL de tampão fosfato salina (PBS) 0,01M e 10 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% m/v.

Em seguida, foi realizada a dissecação e retirada do cérebro dos animais, que foram então armazenados em PFA 4% por 24 horas à temperatura de 4°C quando então foram transferidos para solução de sacarose 30% para desidratação até o momento de serem fatiados com a ajuda de um criostato. Fatias de 40µm, contendo o córtex pré-frontal, a amígdala, os hipocampus ventral e dorsal, o núcleo leito da estria terminal, a área tegmental ventral, alguns núcleos hipotalâmicos e a substância cinzenta periaquedutal, foram obtidas e armazenadas a -20°C em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v).

Utilizando-se o método free-floating, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em 0.01M de tampão fosfato salina (PBS) e incubadas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. Após este procedimento, as fatias foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS/ Triton X-100 0.3% e incubadas por 1 hora em solução de bloqueio [normal goat serum (NGS) 3% em PBS/0.3% de Triton X-100]. O anticorpo primário anti-cFos (1:750 Santa Cruz Biotechnology, sc-52, anticorpo policlonal purificado de coelho) foi, então, adicionado e incubado à 4°C por aproximadamente 24hs.

Após a incubação com o anticorpo primário as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1:1000, biotilado anti-coelho, anti-IgG, Vector Laboratories) diluído em PBS-T por 3hs em temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS e incubadas no complexo avidina-biotina peroxidase (1:250 em PBS, Vector Laboratories) durante 1:30 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as fatias

foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em PBS e 3 vezes por 5 minutos em 175 mM de tampão acetato.

A solução corante foi preparada em tampão acetato e adicionado 0.2mg/ml de diaminobenzidina (DAB), 25 mg/ml de sulfato de níquel e 0.0025% de H₂O₂ e as fatias mantidas em imersão por 10 minutos. Finalmente as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos, colocadas em lâminas, secas em temperatura ambiente e cobertas com lamínulas fixadas com Entellan.

4.7 Análise das Imagens

Para a análise da expressão de *Fos*, o número de neurônios marcados foi contado. Imagens foram realizadas dos núcleos Basolateral (BLA) e Central (CeA) no Complexo Amigdalóide (Bregma -1.34mm_-1.70mm), IL e PL do núcleo pré-frontal (Bregma 1.98mm_1.70mm), Núcleo do Leito da Estria Terminal (Bregma 0.26 mm_-0.02 mm), Áreas CA1, CA2, CA3 e giro denteado dos Hipocampos Ventral (Bregma -2.70mm_-3.28mm) e Dorsal (Bregma -1.34mm_ -1.82mm), Área Tegmental Ventral (Bregma -3.28mm), Núcleo Ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal (Bregma -4.24_-4.36), Área Hipotalâmica Lateral (Bregma -1.06mm_1.58mm), Núcleos Paraventricular (Bregma -0.94 mm_-1.22 mm) e Dorsomedial (Bregma -1.46 mm_-1.70 mm) do Hipotálamo.

As imagens foram adquiridas em um microscópio (*Axio Imager.M2 - Zeiss system*) com objetivas de 10x, 20x/0.5, 40x/0.75, através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*.

Para cada uma das áreas, foram feitas de três a cinco imagens de cada região de interesse e ao final realizada uma média, para a obtenção de um valor único para cada região.

Imagens amplificadas em 20X foram utilizadas para a quantificação (Figura 17).



Figura 17: Escala das imagens para a quantificação de células marcadas.

Os arquivos brutos foram reconstruídos e analisados utilizando o *software Image-J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Inicialmente o ruído de fundo foi subtraído, através do mesmo limiar de filtragem para todas imagens e, então, o número de células IR positivas foi determinado pelo *plugin Analyze particles – Image-J* (Figura 18).

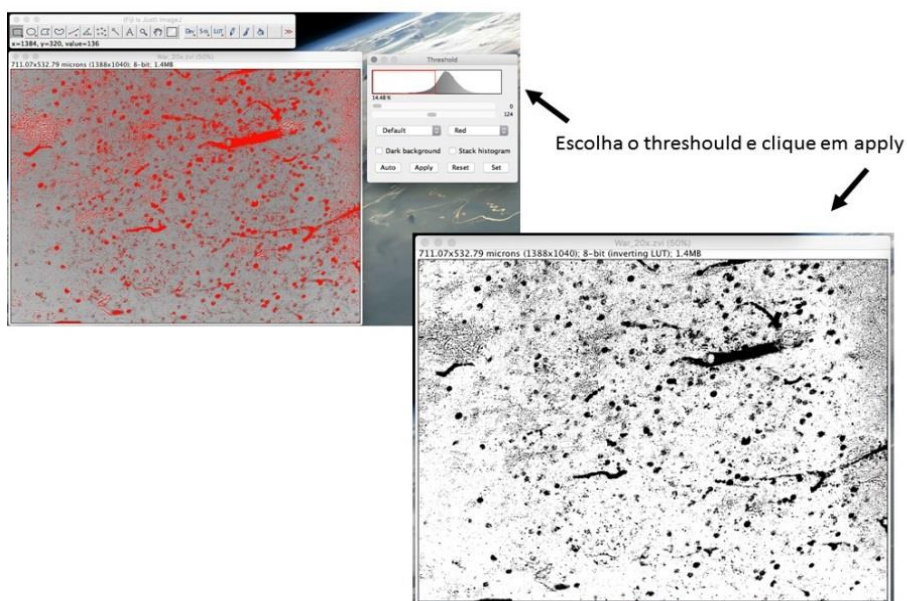


Figura 18: Subtração do ruído de fundo.

As imagens foram convertidas para 8-bits, as partículas definidas de pelo menos 25 a 100 μm^2 e o número total automaticamente quantificado. Os valores de contraste e brilho foram similarmente ajustados para cada resultado ilustrativo (Figura 19 e Figura 20).

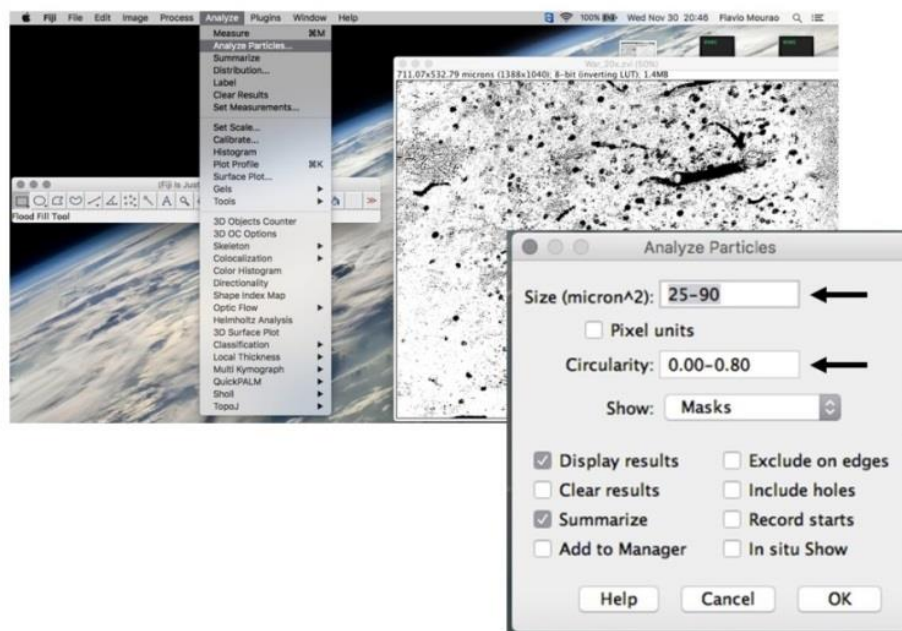


Figura 19: Delimitação do tamanho da partícula a ser considerada.

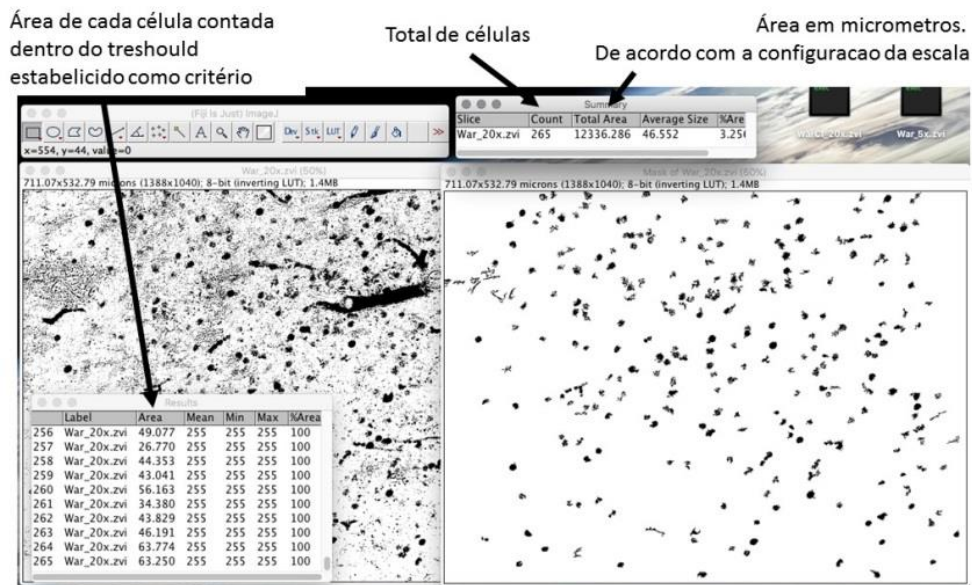


Figura 20: Contagem das partículas.

4.8 Delineamento Experimental

No primeiro bloco de experimentos tínhamos como objetivo responder se animais após 12 semanas de ovariectomia apresentam comportamento do tipo-ansioso comparados aos animais controle.

Para tal, os animais foram divididos em 2 grupos:

Grupo 1 (n=11): OVX

Os animais com 8-12 semanas foram submetidos à cirurgia de ovariectomia. Após 11 semanas, tiveram seu ciclo estral monitorado diariamente através do esfregaço vaginal. Ao completar 12 semanas da realização da cirurgia de ovariectomia, esses animais foram submetidos aos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado, caixa de atividade, enterrar esferas na maravalha, transição claro/escuro, neofagia e campo aberto, respectivamente, para investigação de diferentes aspectos do comportamento do tipo-ansioso, cumprindo o critério da validade aparente. Entre alguns testes e outros foram dadas 24h de intervalo, onde nenhum teste foi realizado.

Grupo 2 (n=11): SHAM

A única diferença deste grupo é com relação à cirurgia, ou seja, os ovários foram expostos, mas não foram removidos. Todos os demais procedimentos correram iguais ao grupo 1 (Figura 21).

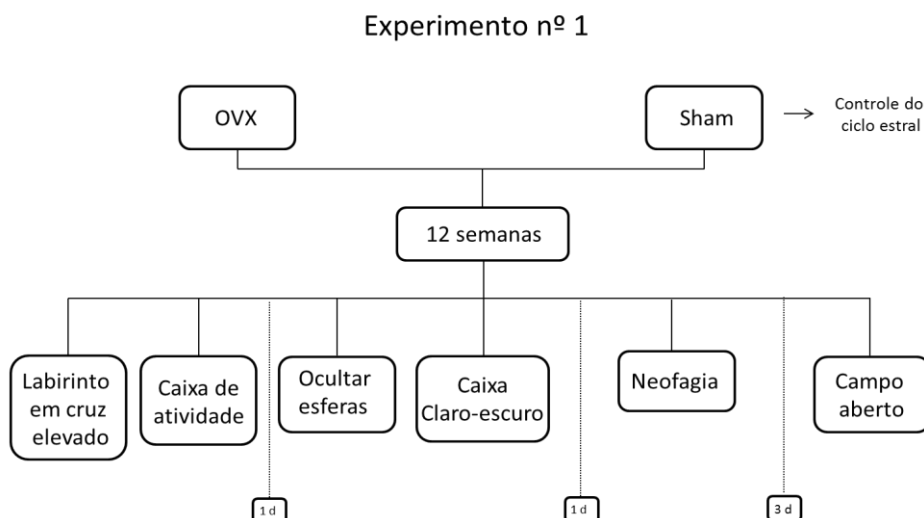


Figura 21: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº1.

No segundo bloco de experimento utilizamos o diazepam a fim de verificar a sensibilidade do comportamento do tipo-ansioso a este medicamento em nosso modelo animal pós-menopausa.

Todos os animais passaram pela cirurgia de ovariectomia como já descrita anteriormente e, após 12 semanas, esses animais foram submetidos a uma injeção i.p. de 1mg/kg de diazepam tendo a salina como veículo (grupo tratado) ou salina (grupo controle) e 30 minutos depois foram expostos consecutivamente aos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e campo aberto (Figura 22).

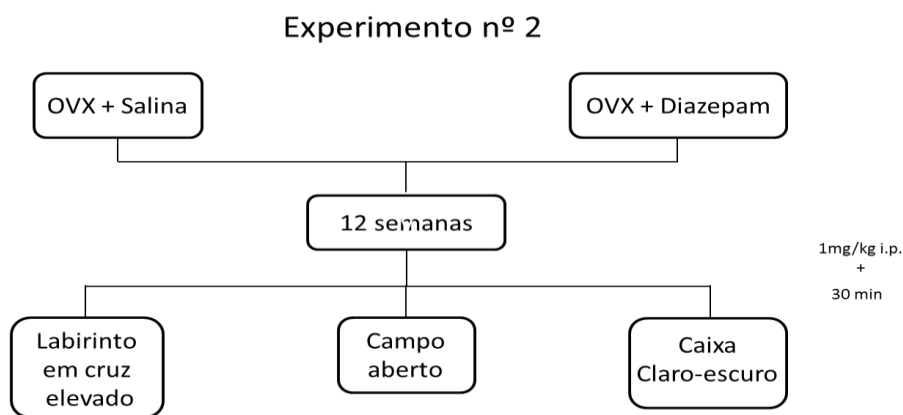


Figura 22: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº2.

No terceiro bloco de experimentos tínhamos como objetivo verificar se o padrão de atividade neuronal em áreas relacionadas à ansiedade é alterado no modelo de pós-menopausa, bem como se este modelo apresenta a excitabilidade basal de áreas relacionadas à ansiedade alterada.

Utilizamos como tarefa ansiogênica o teste do labirinto em cruz elevado modificado como já descrito acima. Ao analisarmos o comportamento dos animais levamos em consideração: o tempo de permanência no centro do equipamento e em cada porção dos braços abertos, o número de entradas em cada porção dos braços abertos, a frequência em que os animais efetuaram comportamentos de avaliação de risco, mergulhos de cabeça, autolimpeza e congelamento.

Para tal, os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1 (n=8): OVX + Tarefa

Os animais foram ovariectomizados e, após 12 semanas, foram submetidos a uma tarefa ansiogênica que consistia em explorar livremente, por 5 minutos, apenas os braços abertos do labirinto em cruz elevado. Uma hora e meia após o término do teste estes animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal e perfundidos, com tampão fosfato salina (PBS) 0,01M e paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram, então, removidos e tratados (como já descrito) para a análise da expressão de Fos.

Grupo 2 (n=8): SHAM + Tarefa

A diferença deste grupo é com relação à cirurgia, ou seja, os ovários foram expostos, porém, não removidos. Todos os demais procedimentos correram iguais ao grupo 1.

Grupo 3 (n=8): OVX - NAIVE

Os animais foram ovariectomizados, no entanto, passada as 12 semanas, este grupo não passou por nenhum teste comportamental. No mesmo dia que os animais do grupo 1 e 2, estes animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal e perfundidos com tampão fosfato salina (PBS) 0,01M e paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram, então, removidos e tratados (como já descrito) para a análise da expressão de Fos.

Grupo 4 (n=8): SHAM - NAIVE

A diferença deste grupo é com relação à cirurgia, ou seja, os ovários foram expostos, porém, não removidos. Todos os demais procedimentos correram iguais ao grupo 3 (Figura 23 e Figura 24).

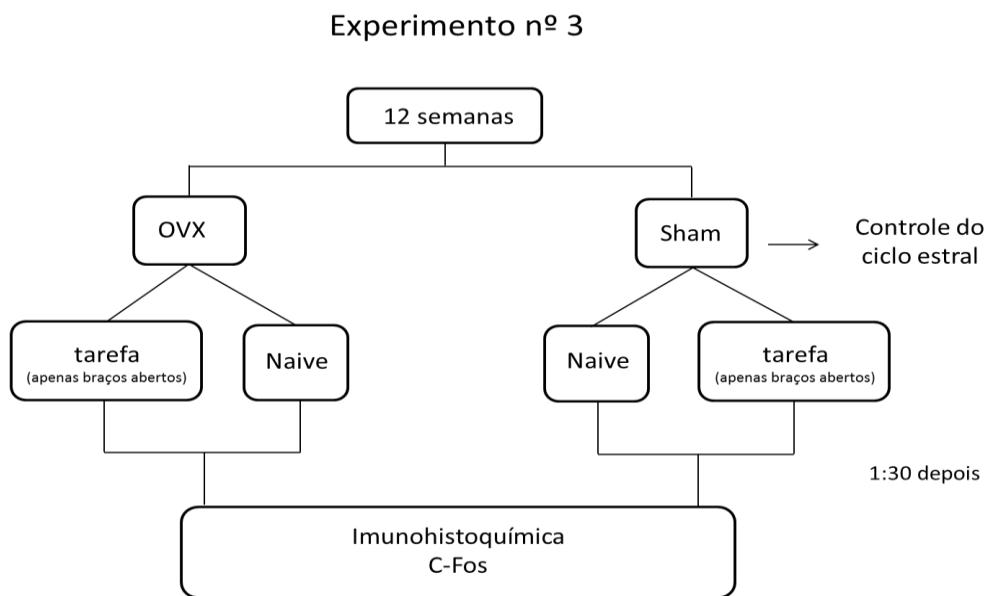


Figura 23: Esquema do desenho experimental referente ao experimento nº3.

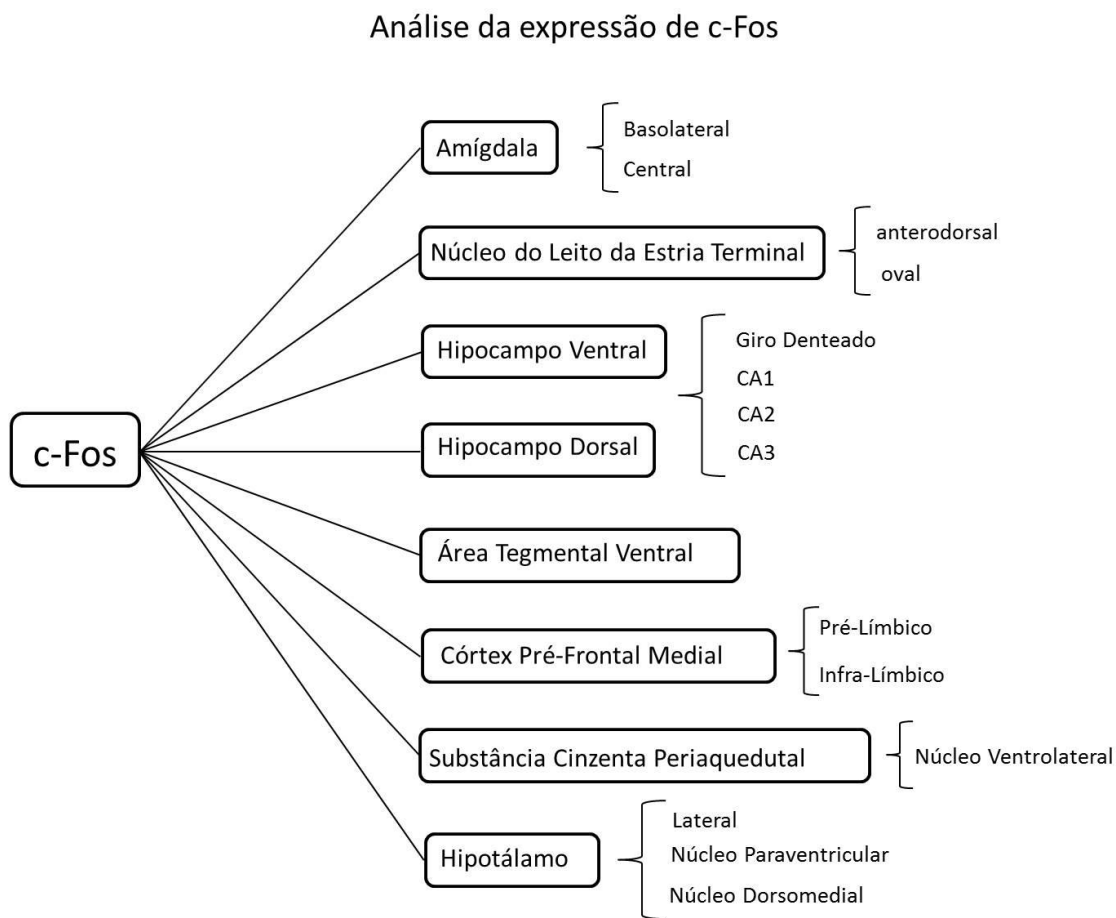


Figura 24: Esquema das áreas cerebrais cuja ativação neural foi avaliada por meio da expressão de Fos pela técnica de imunohistoquímica.

4.9 Análise Estatística

Os resultados comportamentais e farmacológicos foram analisados por teste t de amostras independentes.

Os dados de Fos foram analisados por ANOVA de duas vias e post-hoc de Bonferroni, com os fatores sendo cirurgia (sham x OVX) e Tarefa (Naive x tarefa) (Schulz & Grimes, 2005; Snedecor & Cochran, 1967; Steel &, 1980).

5. Resultados

5.1 Modelo animal de pós-menopausa apresenta maior ganho de peso ao longo de 12 semanas de ovariectomia

Ao longo das 12 semanas após a cirurgia de ovariectomia verificamos o bem estar e a resposta metabólica dos animais através do peso. Sabe-se há muitos anos que hormônios ovarianos alteram o comportamento alimentar e o ganho de peso como já relatado na revisão publicada por WADE e GRAY no ano de 1979. Verificando a média do ganho de peso total ao longo deste tempo, de acordo com as análises realizadas através do *teste-t*, a média de ganho de peso dos animais ovariectomizados foi significativamente maior ($0,2973 \pm 0,01372$; N=11) se comparada à média de ganho de peso dos animais do grupo controle ($0,2409 \pm 0,01146$; N=10) ($t=3,120$ df=19; $p= 0,0056$) (Figura 25).

Média ganho de peso ao longo de 12 semanas

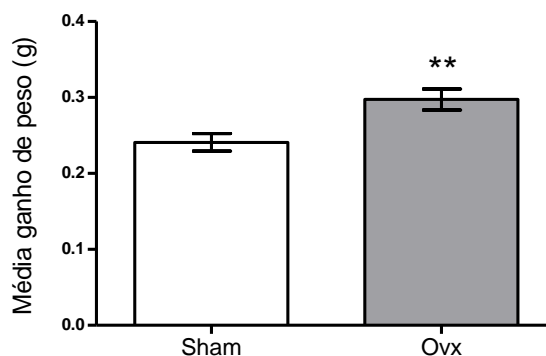


Figura 25: Efeito de 12 semanas de ovariectomia no ganho de peso dos animais.

5.2 Modelo animal de pós-menopausa apresenta fenótipo ansioso.

Na primeira etapa de experimentos tínhamos como objetivo responder, utilizando diferentes paradigmas comportamentais, se animais após 12 semanas de ovariectomia apresentam comportamento do tipo-ansioso comparados aos animais controle.

Os três testes, cujos resultados serão apresentados a seguir, foram escolhidos pois exigem movimentos inatos e conflitantes dos animais, como o interesse pela exploração de novos espaços e a tendência de evitar situações de ameaça e vulnerabilidade, como áreas abertas e bem iluminadas.

5.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

No teste do labirinto em cruz elevado, camundongos com fenótipo ansioso evitam os braços abertos permanecendo no centro ou, principalmente, nos braços fechados. Apresentam ainda, com maior frequência, o comportamento de avaliação de risco e com menor frequência comportamentos como mergulho de cabeça e visitas à extremidade do braço aberto.

As análises realizadas através de test-t demonstraram que animais submetidos à ovariectomia apresentam uma porcentagem menor de entradas nos braços abertos do aparato ($20,11 \pm 3,319$; $N=11$) se comparados aos controles ($39,65 \pm 3,433$; $N=10$) ($t_{(19)}=4,087$; $p=0,0006$) (Figura 26A). O grupo OVX explorou por menos tempo os braços abertos do labirinto ($29,91 \pm 9,775$; $N=11$) em comparação ao grupo SHAM ($69,30 \pm 10,14$; $N=10$) ($t_{(19)}=-2,795$; $p=0,0115$) (Figura 26B). Além disso, os animais ovariectomizados apresentaram uma menor frequência de exploração da extremidade dos braços abertos ($0,6364 \pm 0,2439$; $N=11$) quando comparados ao grupo controle ($2,200 \pm 0,4422$; $N=10$) ($t_{(19)}=-3,175$; $p=0,0050$) (Figura 26E). O mesmo ocorre com a frequência do comportamento de mergulho de cabeça, que se apresenta menor no grupo OVX ($5,182 \pm 1,464$; $N=11$) em comparação ao grupo SHAM ($16,70 \pm 2,066$; $N=10$) ($t=4,616$ $df=19$; $p=0,0002$)

(Figura 26F). Ademais, os animais OVX efetuam o comportamento de avaliação de risco com maior frequência ($20,09 \pm 1,928$; N=11) em relação ao grupo controle ($11,90 \pm 1,650$; N=10) ($t_{(19)}=3,196$; $p=0,0048$) (Figura 26D). Estes parâmetros indicam um fenótipo ansioso em comparação aos animais do grupo controle.

Os grupos não diferiram em relação ao tempo de permanência na plataforma central (Figura 26C), na frequência dos comportamentos de exploração vertical (Figura 26G) e auto-limpeza (Figura 26H).

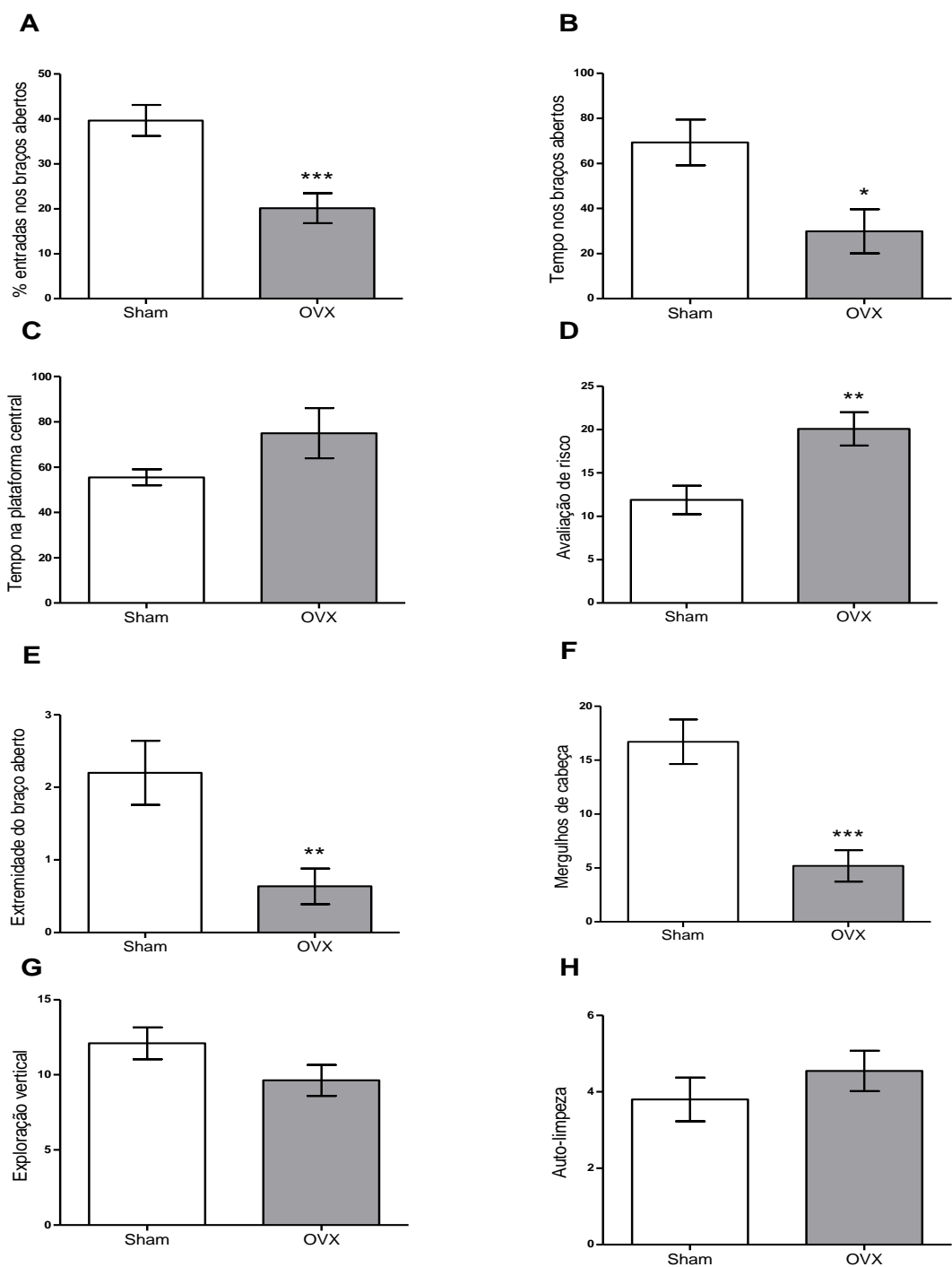


Figura 26: Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste do labirinto em cruz elevado. A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. B) Tempo (s) de permanência nos braços abertos. C) Tempo (s) de permanência na plataforma central. D) Frequência do comportamento de avaliação de risco. E) Frequência de exploração da extremidade dos braços abertos. F) Frequência do comportamento do mergulho de cabeça. G) Frequência do comportamento de exploração vertical. H) Frequência do comportamento de auto-limpeza. (Sham: n= 10; OVX: n= 11). * (P<0.05), ** (P<0.01) e *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

5.2.2 Teste da transição claro-escuro

No teste de transição claro-escuro, o comportamento relacionado à ansiedade é medido através latência de fugir para a porção escura, bem como pela propensão a permanecer na porção escura da caixa.

A partir das análises realizadas através do test-t foi possível constatar que animais após 12 semanas da cirurgia de ovariectomia exploram uma porcentagem de tempo menor o compartimento claro da caixa ($12,30 \pm 1,398$; N=8) se comparados ao grupo controle ($19,18 \pm 2,419$; N=9) ($t_{(15)}=2,380$; $p=0,0310$) (Figura 27A), indicando um comportamento tipo-ansioso dos animais ovariectomizados.

Os grupos não diferiram quanto à latência de passagem do compartimento claro para o compartimento escuro da caixa (Figura 27C) e também não apresentaram diferenças em relação ao número de transições entre compartimentos (Figura 27B), indicando equivalência na atividade locomotora e motivação para exploração entre os grupos.

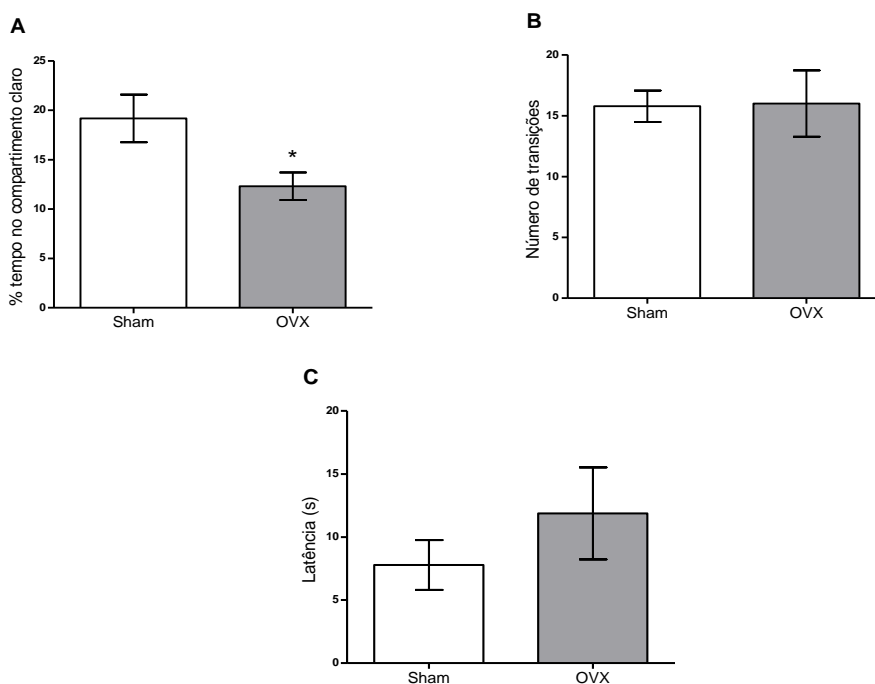


Figura 27. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da caixa claro-escuro. A) Porcentagem de tempo no compartimento claro. B) Número total de transições entre compartimentos. (C) Tempo (s) de latência para a primeira entrada no compartimento escuro. (Sham: n= 9; OVX: n= 8). * ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.2.3 Teste do campo aberto

No teste de campo aberto, animais que exibem maior comportamento do tipo-ansioso permanecem na periferia da arena, próximos às bordas, evitando permanecer ou cruzar pelas áreas centrais.

De acordo com as análises realizadas através do test-t animais ovariectomizados por 12 semanas apresentam uma menor quantidade de cruzamentos na área central do campo aberto ($54,90 \pm 4,854$; N=10) se comparados aos animais controle ($37,67 \pm 4,679$; N=9) ($t_{(17)}=2,543$ df=17; $p=0,0210$) (Figura 28A), indicando um aumento no fenótipo ansioso destes animais neste parâmetro, ao compararmos com o grupo SHAM. Os grupos não diferiram quanto ao tempo de permanência na área central, (Figura 28B); porcentagem de preferência pela área central (Figura 28C); frequência do comportamento de exploração vertical (Figura 28E), frequência do comportamento de auto-limpeza (Figura 28F) e quantidade total de cruzamentos (Figura 28D), este último, indicando equivalência na atividade locomotora e motivação para exploração entre os grupos.

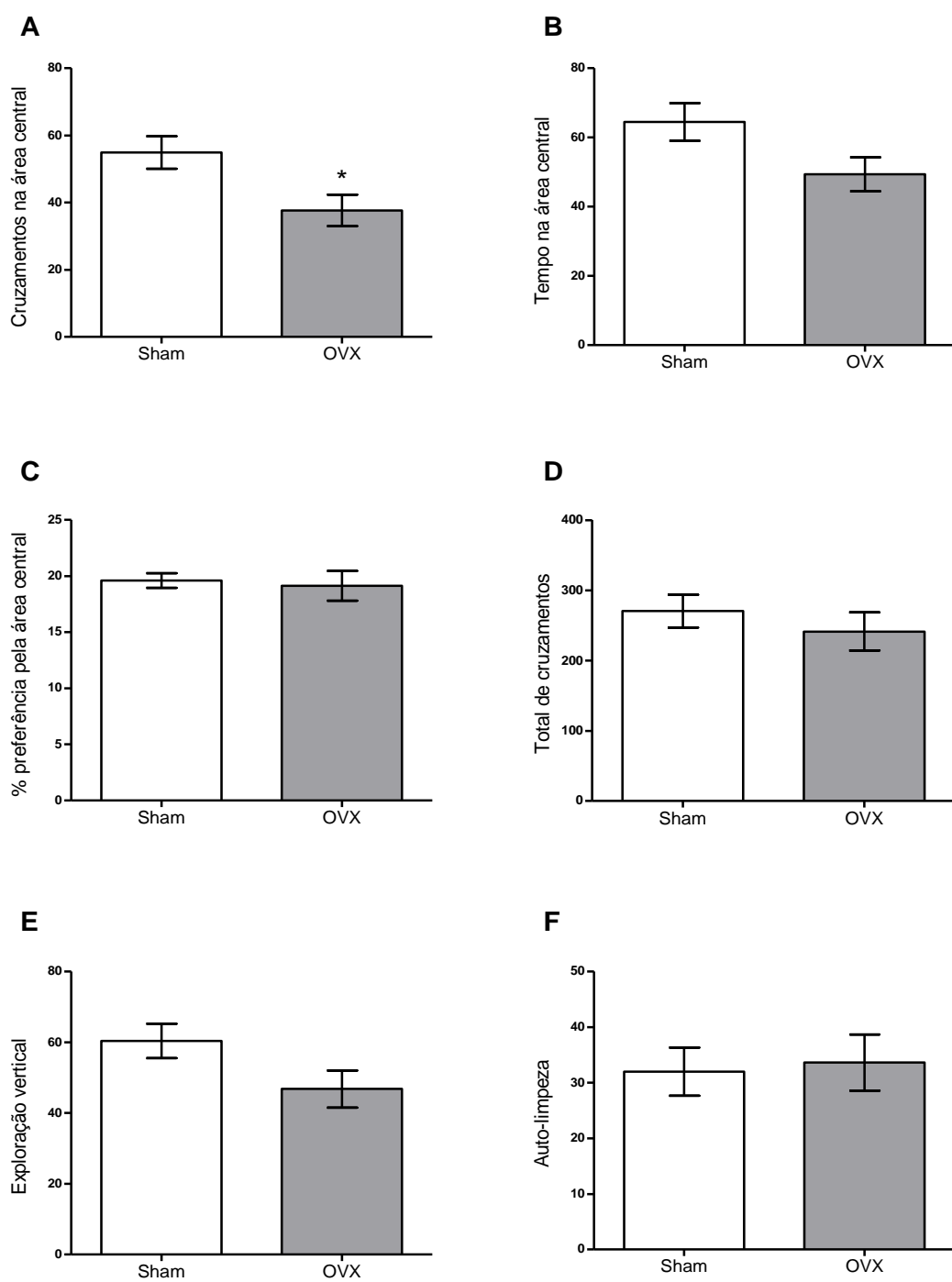


Figura 28. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste do campo aberto. A) Cruzamentos na área central. B) Tempo (s) de permanência na área central. C) Porcentagem de preferência pela área central. D) Cruzamentos totais. E) Frequência do comportamento de exploração vertical. F) Frequência do comportamento de auto-limpeza. (Sham: n= 10; OVX: n= 8-11). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.2.4 Teste da caixa de atividade locomotora

Todas as tarefas até então apresentadas são sensíveis às alterações na locomoção do animal. Logo, expusemos os animais a caixa de atividade locomotora para a verificação da integridade deste parâmetro.

Segundo as análises realizadas através do teste-t não houve diferenças entre os grupos nos parâmetros, distância total percorrida (Figura 29A), porcentagem de preferência pela área central (Figura 29B) e frequência do comportamento de exploração vertical (Figura 29C), mensurados na caixa de atividade locomotora, indicando que a não haver prejuízo na atividade locomotora dos animais.

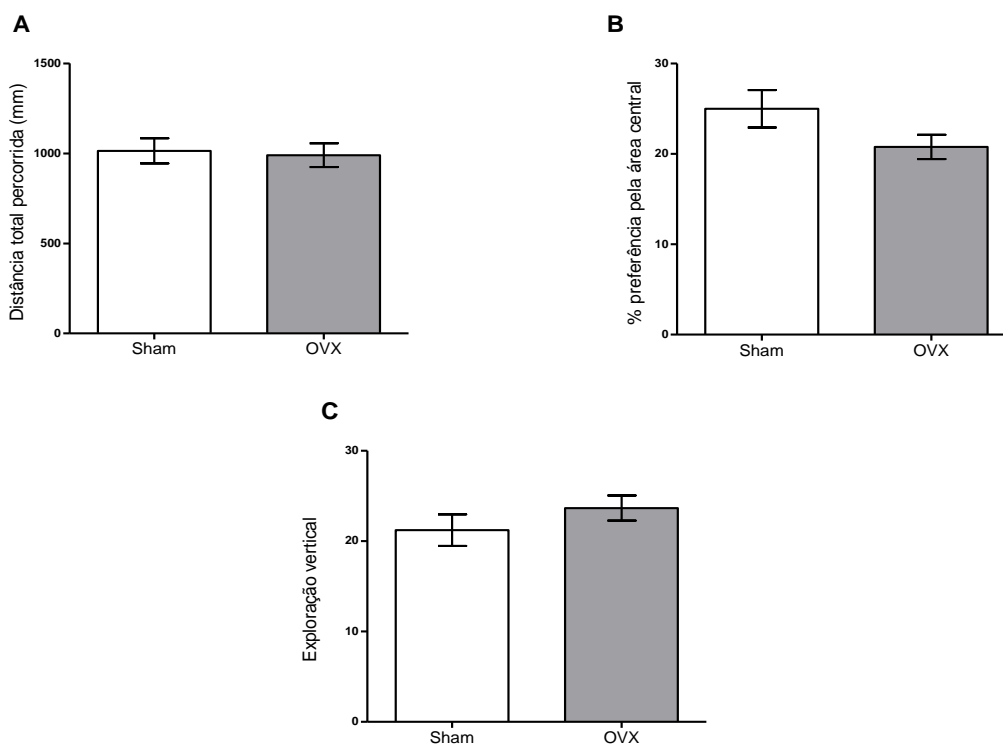


Figura 29: Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da caixa de atividade locomotora. A) Distância total percorrida na arena (mm) B) Porcentagem de preferência pela área central da arena. (C) Frequência do comportamento de exploração vertical. (Sham: n= 9; OVX: n= 8). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

5.2.5 Modelo animal de pós-menopausa apresenta fenótipo compulsivo.

Um tipo alternativo de tarefa que não depende do comportamento exploratório do animal são as tarefas de esquiwa ativa, onde os roedores dirigem suas energias para minimizar estímulos ameaçadores. Nestes ensaios os animais enterram objetos que consideram uma ameaça e este comportamento é quantificável e sensível aos ansiolíticos (NJUNG'E & HANDLEY, 1991; NICOLAS et al., 2006; TREIT, et al. 1981).

De acordo com as análises realizadas através test-t, animais ovariectomizados enterraram um maior número de esferas ($16,30 \pm 0,8825$; N=10) se comparados aos animais controle ($11,90 \pm 1,402$; N=10) ($t_{(18)}=2,656$; $p=0,0161$) (Figura 30) indicando, nestes animais, um maior fenótipo ansioso e compulsivo.

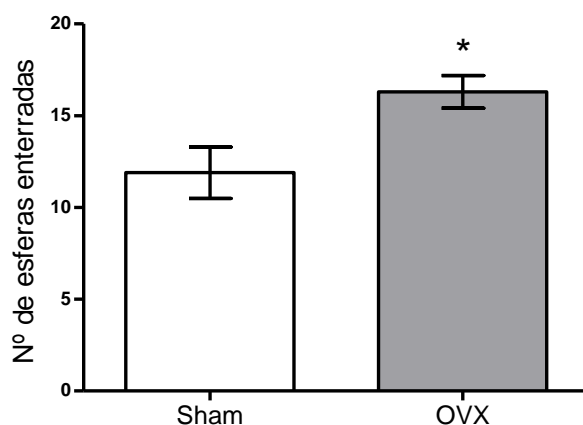


Figura 30. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade e compulsão de acordo com o teste de enterrar esferas na maravalha. (Sham: n= 10; OVX: n= 10). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.2.6 Modelo animal de pós-menopausa se comporta como os animais controle no teste de neofagia

O ensaio da neofagia adiciona outro componente para a avaliação da ansiedade em roedores. Ao serem expostos a um ambiente novo, os camundongos estão privados de alimento, gerando o estado interno adicional de fome. Animais com maior fenótipo ansioso exibem uma latência aumentada para alimentação e menor ingesta de alimentos, sendo, este comportamento, sensível aos benzodiazepínicos e aos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (DULAWA et al., 2004; MERALI & ANISMAN, 2003; CRAWLEY, 1985).

As análises realizadas através do test-t não demonstraram diferenças entre os grupos nos parâmetros de latência para início da ingestão (Figura 31A) e quantidade de alimento ingerido (Figura 31B), indicando que a ovariectomia não altera os parâmetros avaliados.

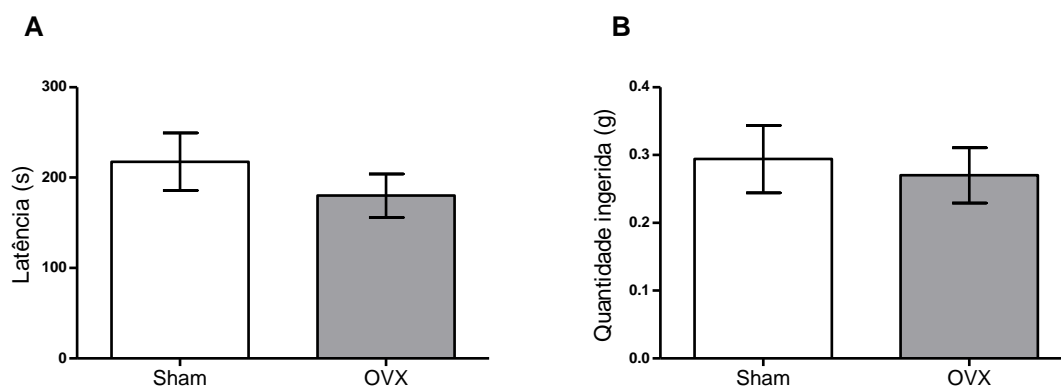


Figura 31. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo com o teste da neofagia. A) Tempo (s) de latência para início da alimentação. **B)** Quantidade de alimento ingerido. (Sham: n= 9; OVX: n= 9). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

5.2.7 Resumo dos resultados dos testes comportamentais do primeiro bloco de experimentos.

Teste	Fenótipo de ansiedade do grupo OVX em relação ao Sham
Labirinto em cruz elevado	+
Caixa claro-escuro	+
Campo aberto	+
Ocultar esferas	+
Neofagia	-----

Tabela 04: Resumo dos resultados dos testes comportamentais do primeiro bloco de experimentos.

5.3 O fenótipo ansioso de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas é sensível ao Diazepam

Uma vez demonstrado o fenótipo ansioso no nosso modelo de pós-menopausa, nesta segunda etapa de experimentos testamos o efeito do fármaco diazepam sobre o comportamento tipo-ansioso de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas. Nosso objetivo foi a validação preditiva do nosso modelo, onde agentes farmacológicos que reduzem a condição patológica em humanos devem ser efetivos em animais. Além disso, na tentativa de abordar diferentes aspectos do comportamento ansioso e mimetizar, pelo menos uma pequena parte, da complexidade do quadro em humanos, testamos o efeito do diazepam em 3 paradigmas diferentes.

5.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado

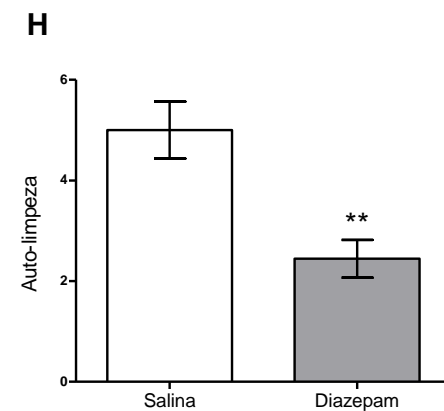
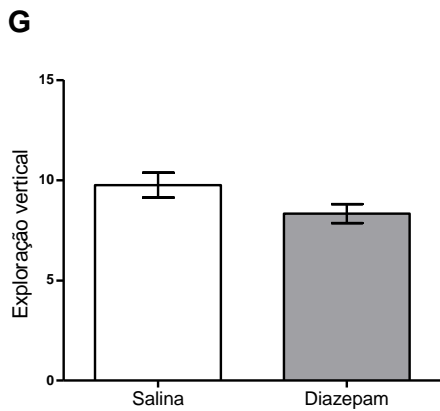
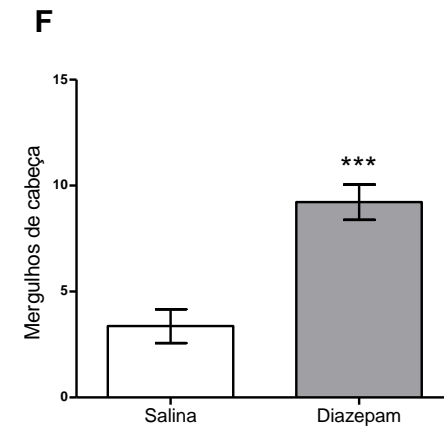
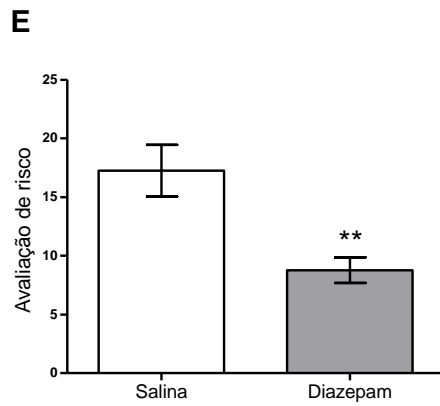
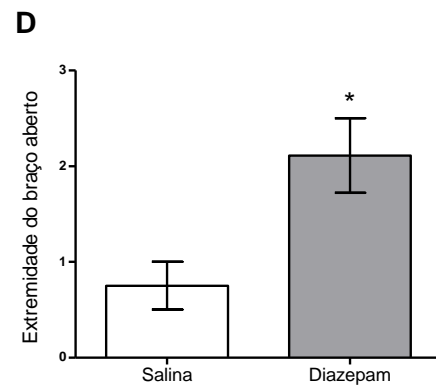
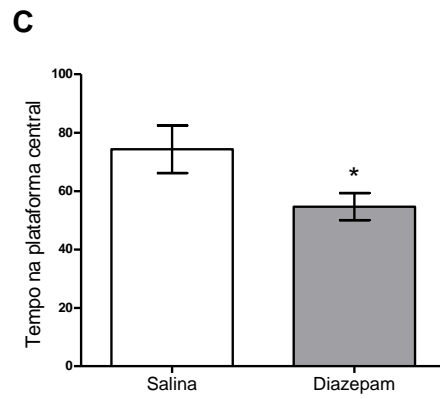
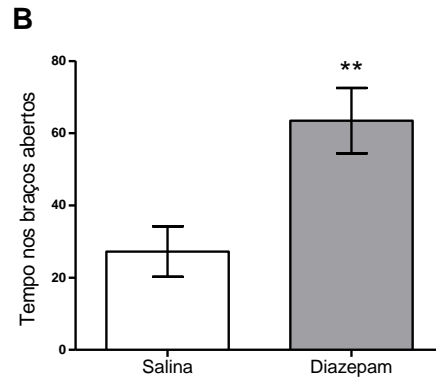
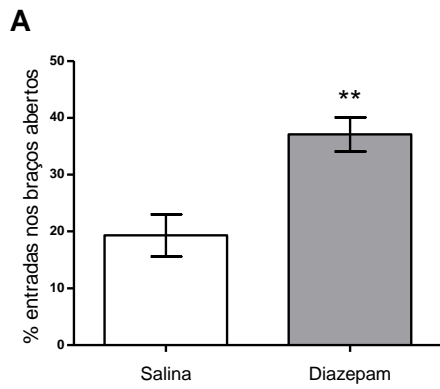
As análises realizadas através do test-t demonstraram que animais ovariectomizados por 12 semanas tratados com 1mg/Kg de Diazepam apresentam uma porcentagem maior de entradas nos braços abertos do aparato ($37,08 \pm 3,014$; N=9) se comparados aos controles ($19,31 \pm 3,717$; N=8) ($t_{(15)}=3,748$; $p=0,0019$) (Figura 32A). Além disso, o grupo ovariectomizado tratado explorou por mais tempo os braços abertos do labirinto ($63,44 \pm 9,068$; N=9) em comparação ao grupo ovariectomizado controle ($27,25 \pm 6,943$; N=8) ($t_{(15)}=3,107$; $p=0,0072$) (Figura 32B).

Observou-se, ainda, uma maior frequência de exploração na extremidade dos braços abertos pelos animais tratados quando comparados aos animais controle ($0,7500 \pm 0,2500$; N=8) ($t_{(15)}=2,860$; $p=0,0119$) (Figura 32D).

Um aumento na frequência do comportamento de mergulho de cabeça também foi observado na comparação do grupo tratado ($9,222 \pm 0,8296$; N=9) com o grupo controle ($3,375 \pm 0,8004$; N=8) ($t_{(15)}=5,042$; $p=0,0001$) (Figura 32F).

Ademais, os animais tratados ($54,67 \pm 4,640$; N=9) apresentaram um menor tempo de permanência na plataforma central do aparato se comparados aos animais controle ($74,38 \pm 8,128$; N=8) ($t_{(15)}=2,168$; $p=0,0467$) (Figura 32C).

Verificou-se também, uma menor frequência do comportamento de avaliação de risco pelo grupo tratado ($8,778 \pm 1,090$; N=9) ao compará-lo ao grupo controle ($17,25 \pm 2,194$; N=8) ($t_{(15)}=3,584$; $p=0,0027$) (Figura 32E) além de uma menor frequência do comportamento de auto-limpeza dos animais tratados ($2,444 \pm 0,3768$; N=9) em comparação aos controles ($5,000 \pm 0,5669$; N=8) ($t_{(15)}=3,834$; $p=0,0016$) (Figura 32H). No entanto, os grupos não diferiram em relação ao comportamento de exploração vertical (Figura 32G) e total de entradas (Figura 32 I). Em conjunto, todos os parâmetros comportamentais analisados indicam que o diazepam foi ansiolítico no modelo animal de pós-menopausa, na ausência de efeito sedativo.



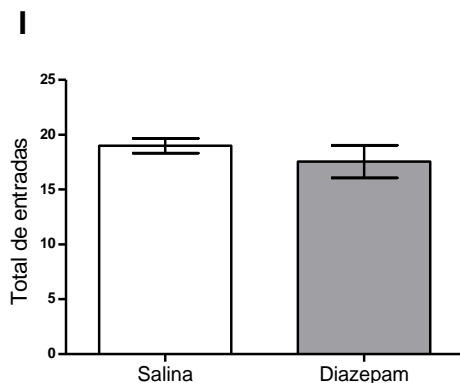


Figura 32: Efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste do labirinto em cruz elevado. A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. B) Tempo (s) de permanência nos braços abertos. (C) Tempo (s) de permanência na plataforma central. D) Frequência do comportamento de avaliação de risco. E) Frequência de exploração da extremidade dos braços abertos. F) Frequência do comportamento do mergulho de cabeça. G) Frequência do comportamento de exploração vertical. H) Frequência do comportamento de auto-limpeza. I) Total de entradas. (Sham: n= 8; OVX: n= 9). * (P<0.05), ** (P<0.01) e *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

5.3.2 Teste da caixa claro-escuro

A partir das análises realizadas através do test t foi possível constatar que animais tratados com 1mg/Kg de diazepam após 12 semanas de ovariectomia ($40,77 \pm 7,623$; N=8) exploram uma porcentagem de tempo maior o compartimento claro da caixa se comparados ao grupo controle ($21,85 \pm 3,268$; N=8) ($t_{(14)}=2,281$; $p=0,0387$) (Figura 33A), apontando para um menor fenótipo ansioso dos animais tratados em relação aos animais do grupo controle.

Os grupos não diferiram quanto à latência de passagem do compartimento claro para o compartimento escuro da caixa (Figura 33B). Não foi, ainda, observada diferença entre os grupos quanto ao número de transições entre compartimentos (Figura 33C), sugerindo a ausência de efeito sedativo da droga.

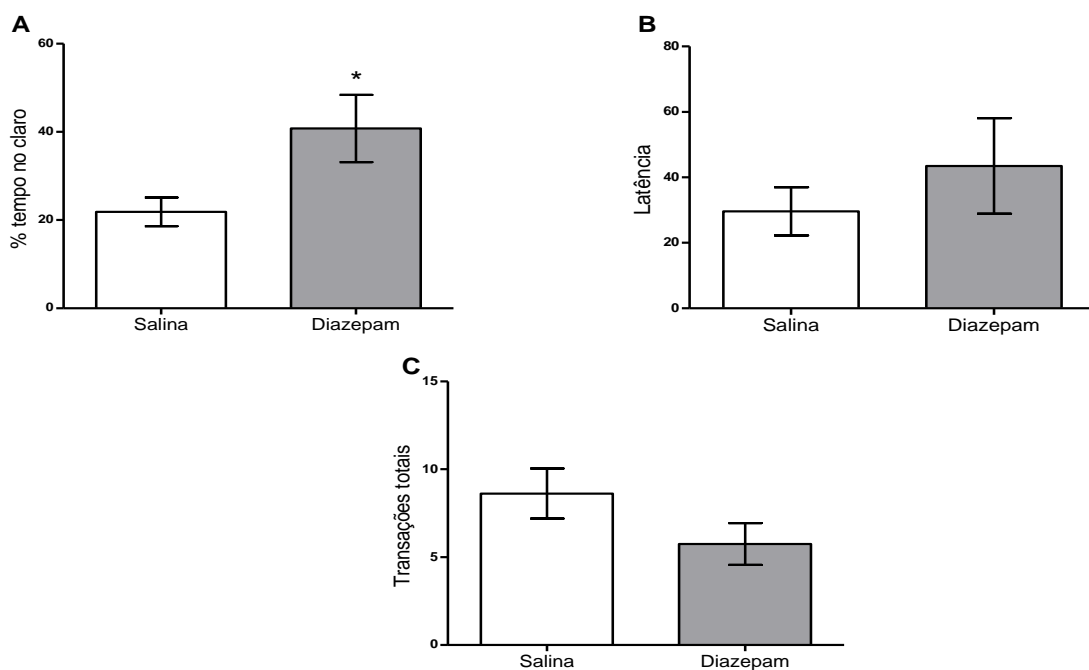


Figura 33. Efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste da caixa claro-escuro. A) Porcentagem de tempo no compartimento claro. B) Tempo(s) de latência para a primeira entrada no compartimento escuro. C) Número total de transições entre compartimentos. (Sham: n= 8; OVX: n= 8). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.3.3 Teste do campo aberto

De maneira inesperada, as análises realizadas através do test-t mostraram que animais tratados com 1mg/Kg de Diazepam após 12 semanas de ovariectomia ($8,294 \pm 1,269$; N=9) apresentaram uma menor preferência pela área central do campo aberto se comparados aos animais controle ($13,83 \pm 1,640$; N=8) ($t_{(15)}=2,703$; $p=0,0164$) (Figura 34A). Os animais tratados ($24,67 \pm 6,205$; N=9) apresentaram ainda, um menor tempo de exploração da área central em relação aos animais controle ($65,75 \pm 17,00$; N=8) ($t_{(15)}=2,379$; $p=0,0311$) (Figura 34B). Estes resultados indicam um efeito ansiogênico do diazepam no modelo de pós-menopausa, opondo-se aos nossos resultados prévios de labirinto em cruz elevado e teste do claro-escuro.

Este efeito ansiogênico não pode ser atribuído ao efeito sedativo do diazepam, já que os grupos não diferiram quanto à quantidade de cruzamentos na área central (Figura 34C); frequência de comportamento de exploração vertical

(Figura 34E) e de auto-limpeza (Figura 34F). Também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao número de cruzamentos totais (Figura 34D), indicando equivalência na atividade locomotora e motivação para exploração.

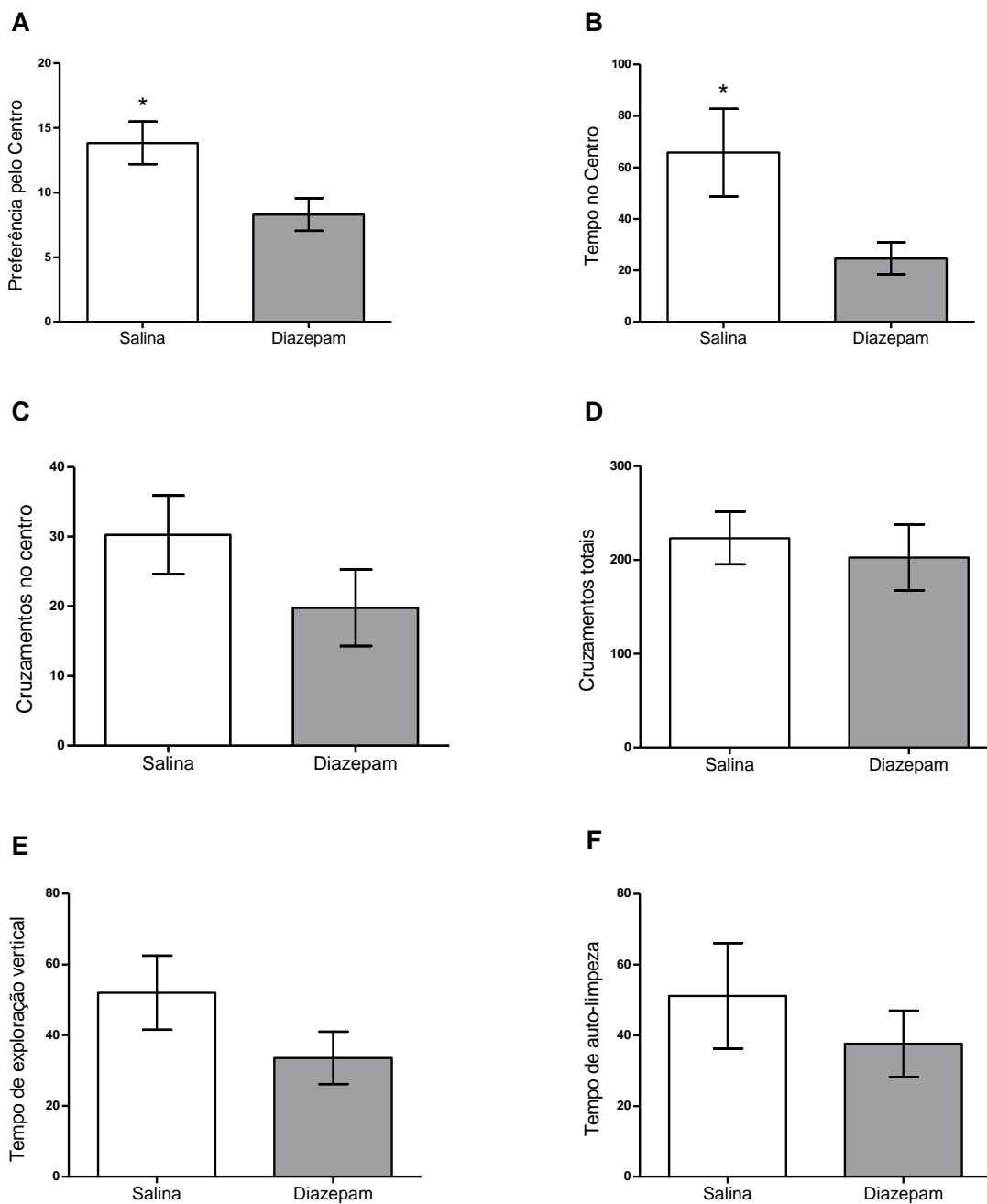


Figura 34. Efeito do Diazepam no fenótipo de ansiedade em animais com 12 semanas de ovariectomia de acordo com o teste do campo aberto. A) Preferência pela área central. B) Tempo (s) de permanência na área central. (C) Cruzamentos na área central. D) Cruzamentos totais. E) Frequência do comportamento de exploração vertical. F) Frequência do comportamento de auto-limpeza. (Sham: n= 8; OVX: n= 9). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.3.4 Resumo dos resultados dos testes comportamentais do segundo bloco de experimentos.

Teste	Fenótipo de ansiedade do grupo OVX diazepam em relação ao OVX salina
Labirinto em cruz elevado	—
Caixa claro-escuro	—
Campo aberto	+

Tabela 05: Resumo dos resultados dos testes comportamentais do segundo bloco de experimentos.

5.4 Animais ovariectomizados por 12 semanas respondem diferentemente a um evento potencialmente ansiogênico e sem escapatória.

5.4.1 Teste do labirinto em cruz elevado modificado

Uma vez demonstrado o fenótipo ansioso e validado nosso modelo de ansiedade na pós-menopausa, nesta terceira etapa de experimentos expusemos os animais do grupo OVX e controle a um evento com alto potencial ansiogênico. Além disso, avaliamos o padrão de expressão de Fos, um marcador de ativação neural, em áreas cerebrais envolvidas em ambos circuitos ansiolíticos e ansiogênicos. A escolha de um labirinto em cruz elevado modificado foi motivada pelo fato de excluirmos a fuga para os braços fechados, que naturalmente ocorre, e limitarmos a análise de Fos em resposta à exposição somente dos braços abertos.

Com relação ao número de entradas (Figura 35C) as análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a cirurgia de ovariectomia e a tarefa

ansio gênica ($F_{2,27}=0,8964$; $p=0,4198$), mas observamos um efeito principal da tarefa ($F_{1,27}=14,85$; $p=0,0007$) e da ovariectomia ($F_{2,27}=15,03$; $p<0,0001$). De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferença entre os grupos para as áreas intermediária e proximal. Uma diferença significativa foi observada apenas para a porção distal ($p=0,0394$).

Para o tempo de permanência nas diferentes porções do braço aberto do labirinto em cruz elevado (Figura 35D), as análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a cirurgia de ovariectomia e a tarefa ansio gênica ($F_{3,36}=10,91$; $p>0,0001$), além do efeito principal da ovariectomia ($F_{3,36}=28,44$; $p>0,0001$). Entretanto, não observamos efeito principal da tarefa ($F_{1,36}=0,0001108$; $p=0,9917$). De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferença entre os grupos para as áreas intermediária e proximal. Uma diferença significativa foi observada apenas para as porções central ($p<0,001$) e distal ($p<0,01$).

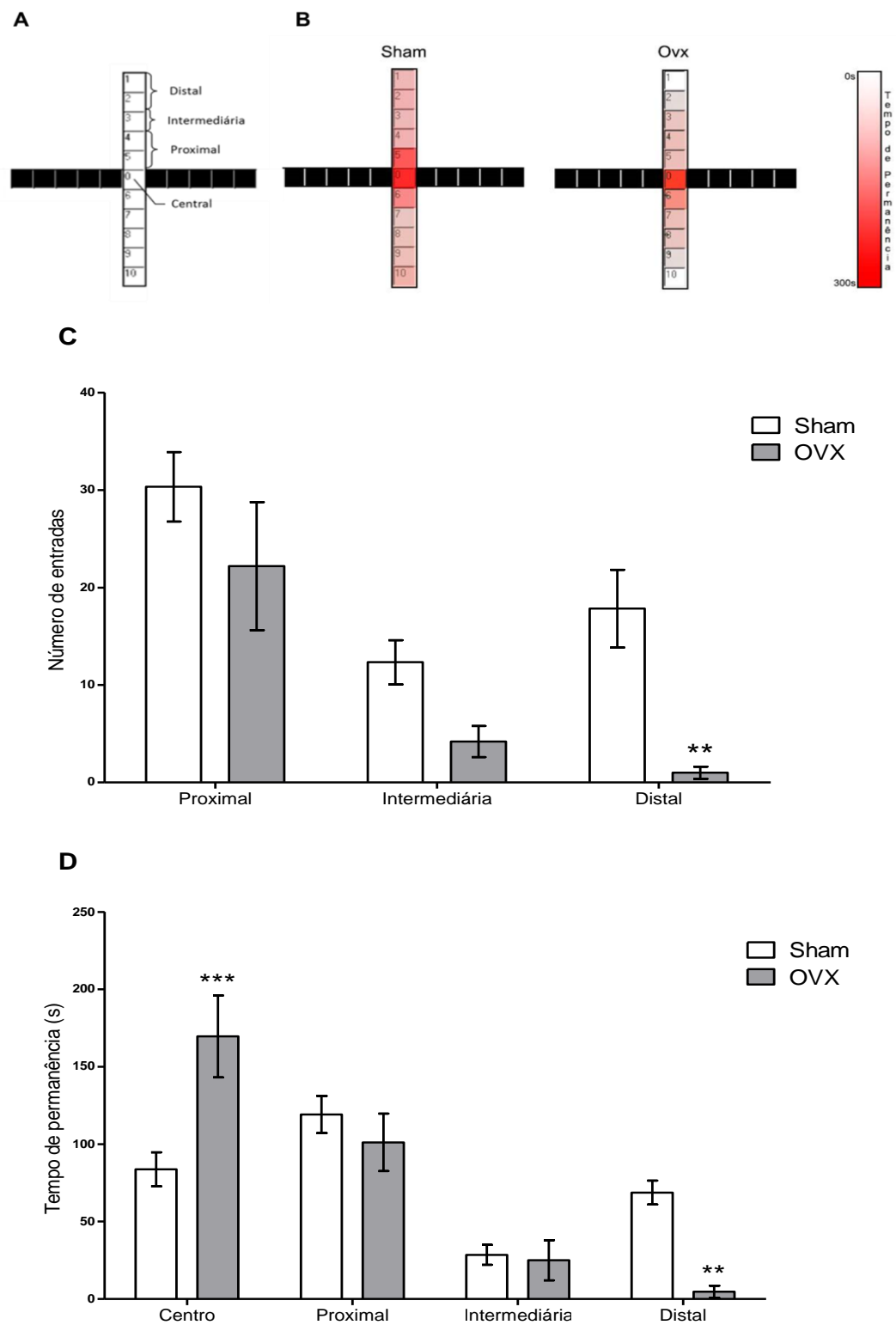


Figura 35: Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de acordo exploração do aparato em tarefa aversiva. (A) Figura representativa das porções dos braços abertos do LCE. (B) Figura representativa do tempo de permanência em cada porção dos braços abertos do labirinto. (C) Número de entradas em cada porção dos braços abertos do aparato. (D) Tempo de permanência em cada porção dos braços abertos do aparato. (Sham: n=6; OVX: n=5). ** (P<0.01) e *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

De acordo com as análises realizadas através do test t, animais após 12 semanas de ovariectomia (17.6 ± 1.327 , $n=5$) apresentaram o comportamento de avaliação de risco com maior frequência se comparados ao grupo controle (11.5 ± 1.335 , $n=6$) ($t_{(9)}=3.209$, $p=0,0107$) (Figura 36A). O comportamento de mergulho de cabeça foi menos frequente no grupo OVX (9.6 ± 1.435 , $n=5$) em comparação ao grupo controle (19 ± 1.483 , $n=6$) ($t=4.498$ $df=9$; $p= 0,0015$) (Figura 36B). A frequência do comportamento de auto-limpeza também se mostrou aumentada no grupo ovariectomizado (5 ± 0.3162 , $n=5$) ao compará-los ao grupo SHAM (1.833 ± 0.7032 , $n=6$) ($t=3.824$ $df=9$, $p=0,0041$) (Figura 36C). O mesmo ocorreu com a frequência do comportamento de congelamento que se apresenta maior no grupo OVX (10.2 ± 0.8602 , $n=5$) em comparação ao grupo controle (3.167 ± 0.4773 , $n=6$) ($t=7.492$ $df=9$; $p<0.0001$) (Figura 36D). Estes parâmetros indicam que os animais após 12 semanas de ovariectomia apresentam um maior fenótipo ansioso se comparados aos animais do grupo controle.

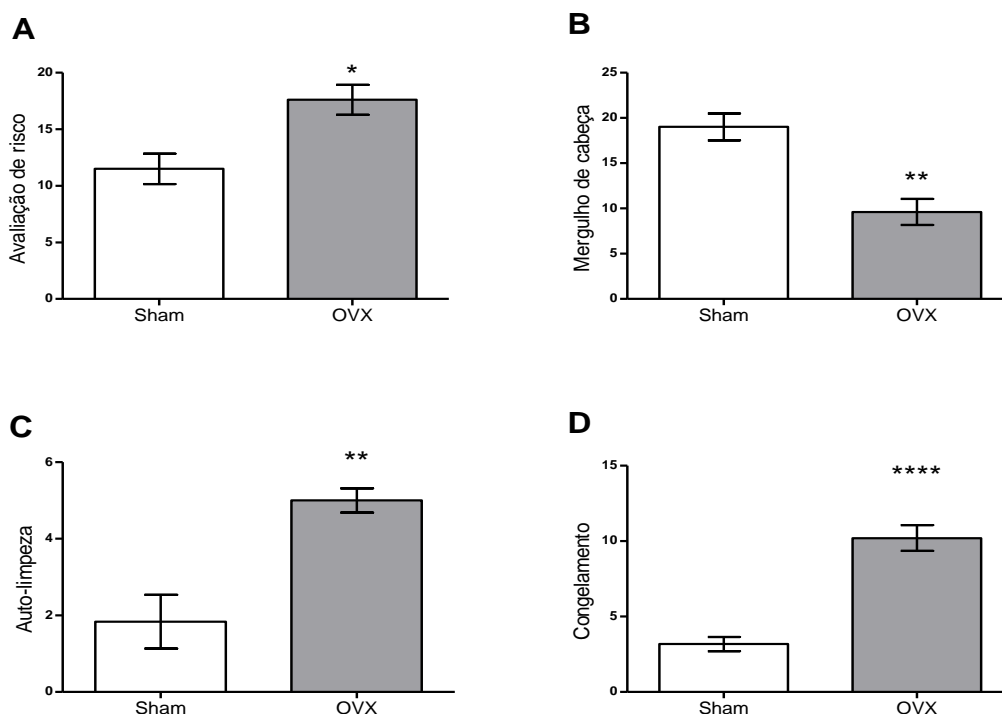


Figura 36: Efeito de 12 semanas de ovariectomia no fenótipo de ansiedade de medidos através de comportamentos etológicos em tarefa aversiva. (A) Frequência do comportamento de avaliação de Risco. (B) Frequência do comportamento de mergulho de cabeça. (C) Frequência do comportamento de auto-limpeza. (D) Frequência do comportamento de congelamento. * (P<0.05), ** (P<0.01) e **** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

5.4.2 *Resumo dos resultados do teste comportamental do terceiro bloco de experimentos.*

Teste do labirinto em cruz elevado modificado	Grupo OVX em relação ao Sham	Fenótipo de ansiedade
Nº entradas na porção proximal	----	----
Nº entradas na porção proximal	----	----
Nº entradas na porção distal	↓	+
Tempo na porção proximal	----	----
Tempo na porção intermediária	----	----
Tempo na porção distal	↓	+
Tempo na porção central	↑	+
Avaliação de risco	↑	+
Mergulhos de cabeça	↓	+
Congelamento	↑	+
Auto-limpeza	↑	+

Tabela 06: *Resumo dos resultados do teste comportamental do terceiro bloco de experimentos.*

5.5 Expressão de Fos nas áreas cerebrais relacionadas à ansiedade

Após a exposição dos grupos OVX e Sham à tarefa ansiogênica avaliamos o efeito de 12 semanas de ovariectomia no padrão de ativação neuronal de áreas cerebrais funcionalmente envolvidas nos circuitos ansiogênicos e ansiolíticos. Para avaliar um possível efeito da OVX na excitabilidade basal, também avaliamos o padrão de ativação neuronal nos grupos denominados naive, que não participaram de nenhuma tarefa, permanecendo em suas respectivas gaiolas.

A ansiedade decorre da interpretação de estímulos ambientais ambíguos como ameaçadores. Para tal, faz-se necessário detectar informações sensoriais e interpretar seu significado de forma a determinar se representam um perigo em potencial. A amígdala, o Núcleo do leito da estria terminal e o Hipocampo, compondo um circuito amplamente interconectado, são responsáveis pela primeira interpretação e atribuição de valência destes estímulos.

5.5.1 Regiões de Interpretação dos estímulos sensoriais

5.5.1.1 Amígdala

5.5.1.1.1 Amígdala Basolateral

Doze semanas de ovariectomia levam a uma diminuição na ativação basal dos neurônios da amígdala basolateral, que não se altera durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16} = 8,489$; $p = 0,0102$) e o efeito principal da tarefa ($F_{1,16} = 6,243$; $p = 0,0237$), mas não da ovariectomia ($F_{1,16} = 2,571$; $p = 0,1284$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar uma redução na ativação basal da amígdala basolateral dos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0466$). Observou-se ainda uma redução desta ativação quando animais do grupo Sham foram submetidos à tarefa ansiogênica ($p=0,0057$). Não houve alteração na ativação da BLA dos animais do grupo OVX submetidos à tarefa (Figura 37).

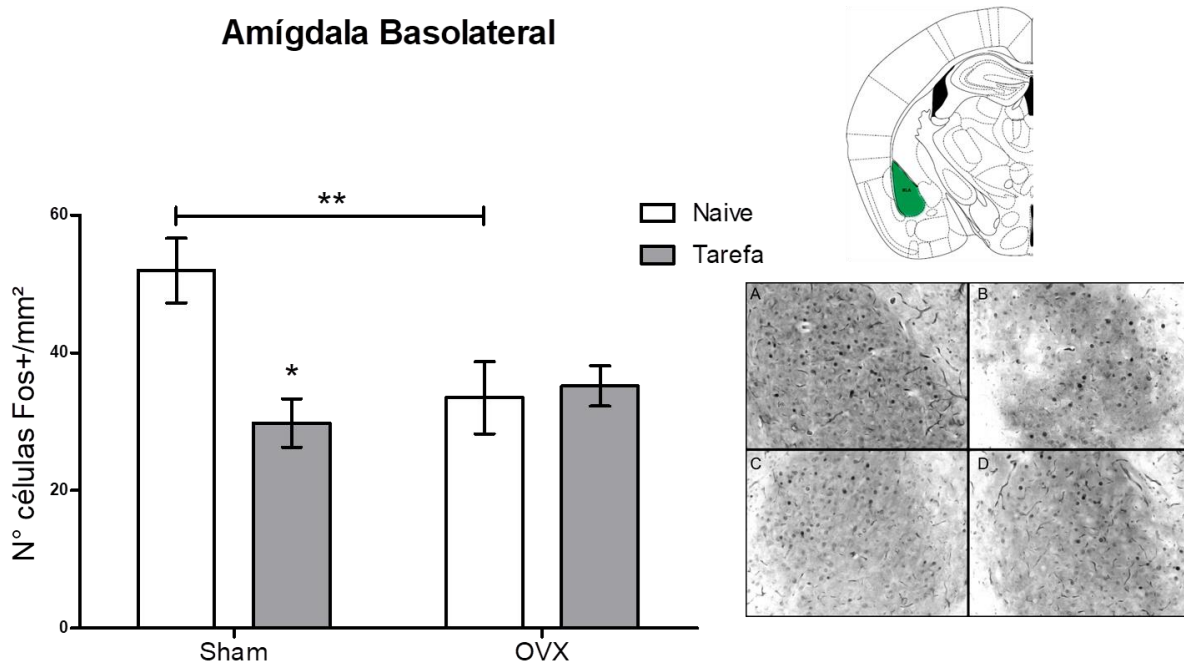


Figura 37. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da amígdala basolateral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX- naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P<0.05$) e ** ($P<0.01$) indicam diferenças entre os grupos.

5.5.1.1.2 Amígdala Central

Doze semanas de ovariectomia levam a um aumento na ativação basal dos neurônios da amígdala central, que não se altera durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=3,178$; $p=0,0936$) no entanto, detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=5,564$; $p=0,0314$) e da ovariectomia ($F_{1,16}=13,34$; $p=0,0021$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar um aumento na ativação basal da amígdala central dos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0126$). Observou-se ainda um aumento desta ativação quando animais do grupo Sham foram submetidos à tarefa ansiogênica ($p= 0,0421$). Não houve alteração na ativação da CEA dos animais do grupo OVX submetidos à tarefa (Figura 38).

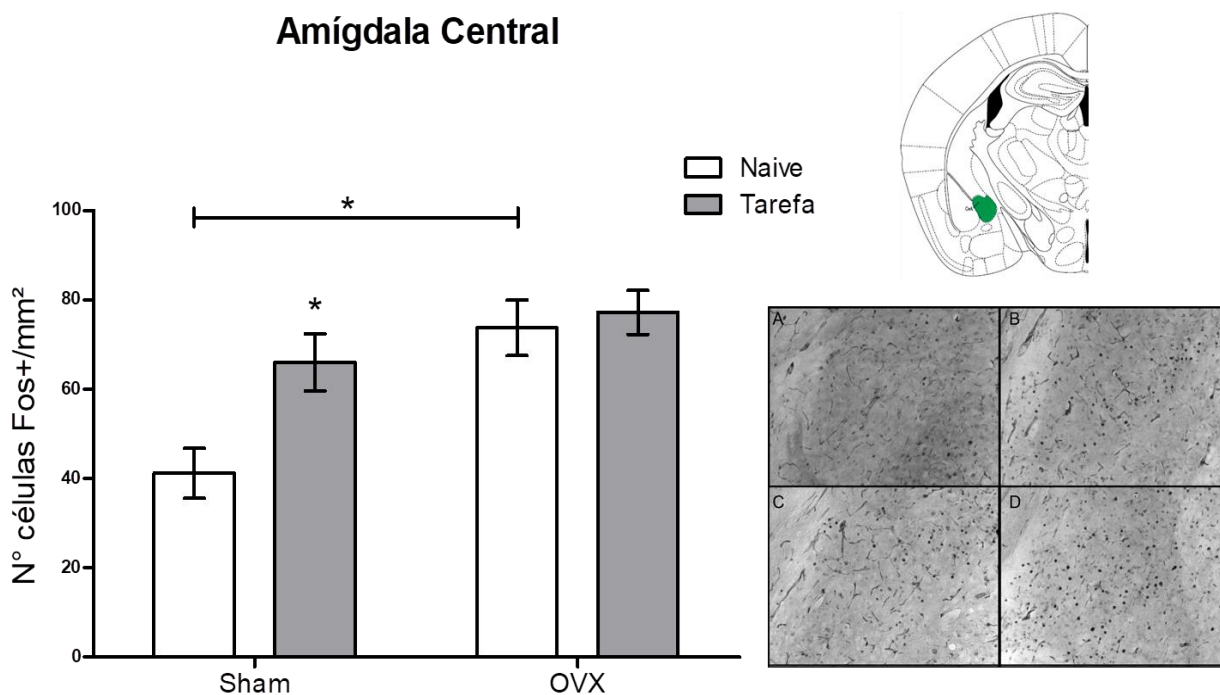


Figura 38. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da amígdala central. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.2 Núcleo do Leito da Estria Terminal

5.5.1.2.1 Porção Oval do Núcleo do Leito da Estria Terminal

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios da porção oval do núcleo do leito da estria terminal, no entanto, a tarefa reduz a ativação destes neurônios no grupo Sham.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,15}=2.233$; $p=0.1558$), ou um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,15}=16.64$; $p=0.8991$) mas detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,15}=16.8$; $p=0.0009$).

De acordo com o *post hoc* de Bonferroni, pôde-se observar uma diminuição na ativação na porção oval do núcleo leito da estria terminal (ovBNST) durante a tarefa dos animais do grupo sham em relação aos animais naive deste mesmo grupo ($p= 0,0065$).

Não houve alteração na ativação do BNST dos animais do grupo OVX (Figura 39).

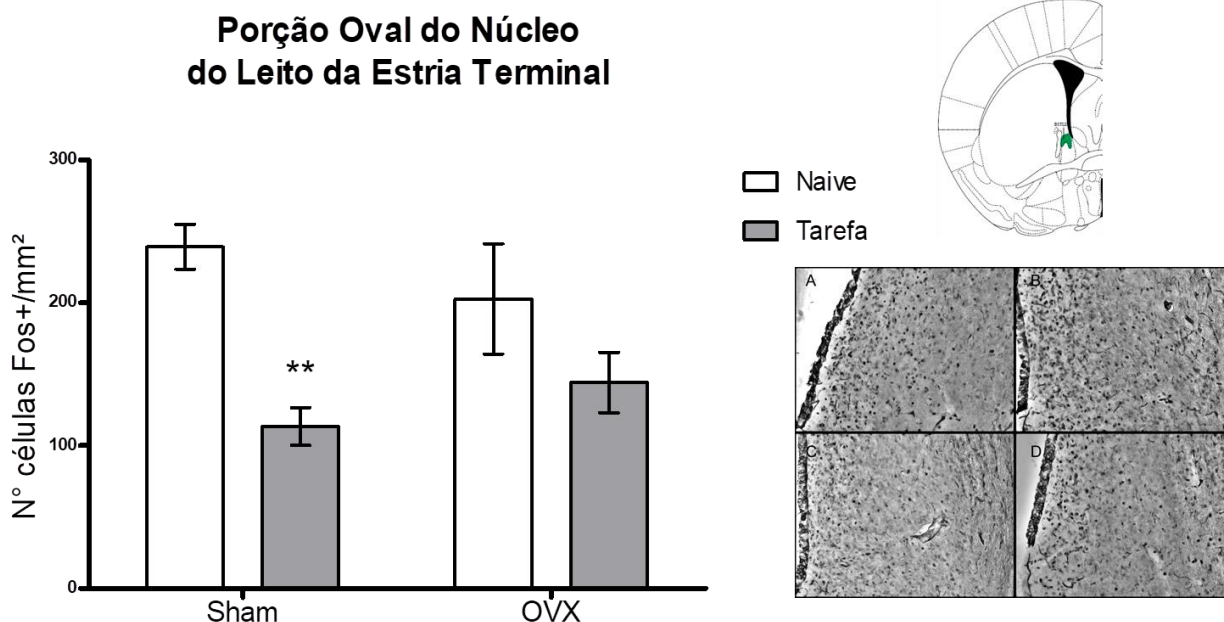


Figura 39. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção oval do núcleo leito da estria terminal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham-naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.2.2 Porção Anterodorsal do Núcleo do Leito da Estria Terminal

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal ou durante a tarefa dos neurônios da porção anterodorsal do núcleo do leito da estria terminal dos grupos SHAM e OVX.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=0.7005$; $p=0.4149$), ou efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=0.00605$; $p=0.9390$) e da ovariectomia ($F_{1,16}=0.6798$; $p=0.4218$).

De acordo com o *post hoc* de Bonferroni, não houve alteração na ativação da porção anterodorsal do núcleo do leito da estria terminal (adBNST) dos animais dos grupos Sham e OVX baive ou submetidos à tarefa (Figura 40).

Porção Anterodorsal do Núcleo do Leito da Estria Terminal

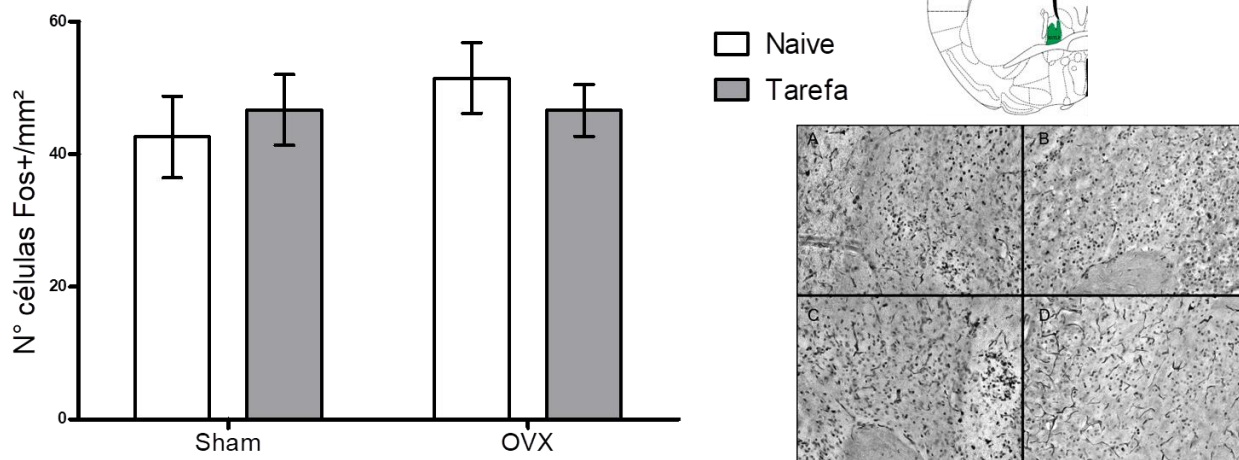


Figura 40. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo leito da estria terminal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P < 0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.3 Hipocampo Ventral

5.5.1.3.1 Giro Denteado

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios do giro denteado do hipocampo ventral, no entanto, a tarefa reduz a ativação destes neurônios no grupo Sham.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=1,234$; $p=0,2830$), no entanto detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=15,12$; $p=0,0013$), mas não da ovariectomia ($F_{1,16}=0,3085$; $p=0,5863$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, uma redução na ativação dos neurônios do giro denteado do hipocampo ventral dos animais do grupo Sham ($p= 0,0109$). Não foram observadas

diferenças entre a ativação basal entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle, bem como diferença na ativação basal e durante a tarefa do grupo OVX (Figura 41).

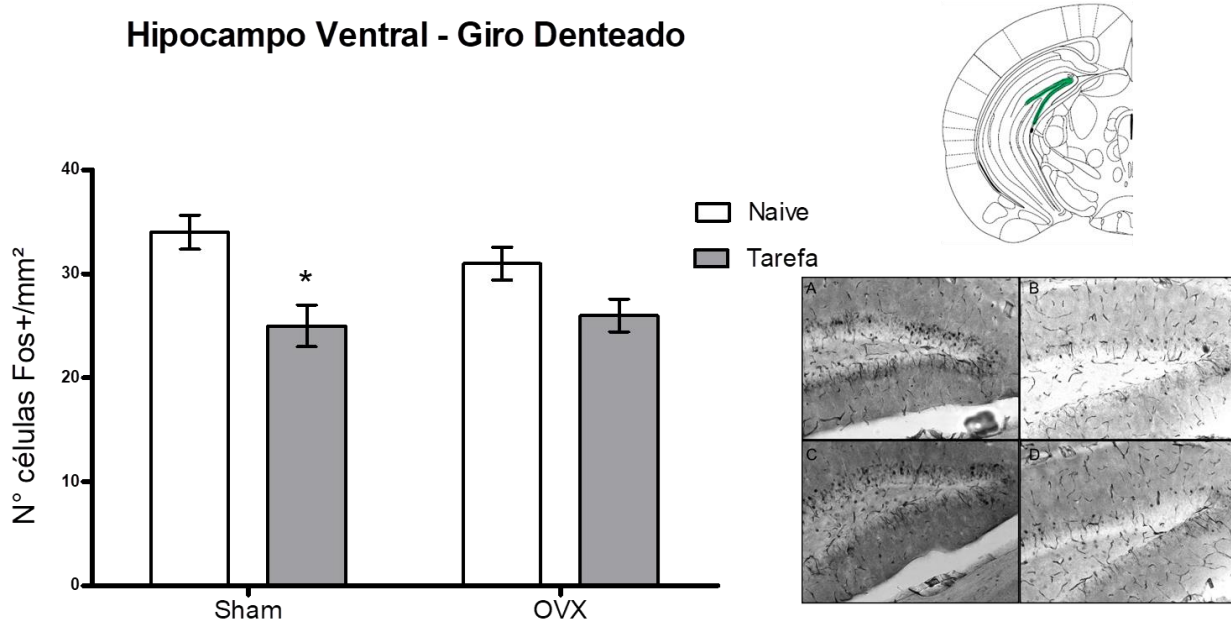


Figura 41. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do giro dentado do hipocampo ventral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.3.2 CA1

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios de CA1 do hipocampo ventral.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=0.8567$; $p=0.3684$), no entanto detectaram um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,16}= 4.733$; $p=0.0449$), mas não da tarefa ($F_{1,16}=3.87$; $p=0.0667$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferenças entre grupos na ativação basal e durante a tarefa (Figura 42).

Hipocampo Ventral - CA1

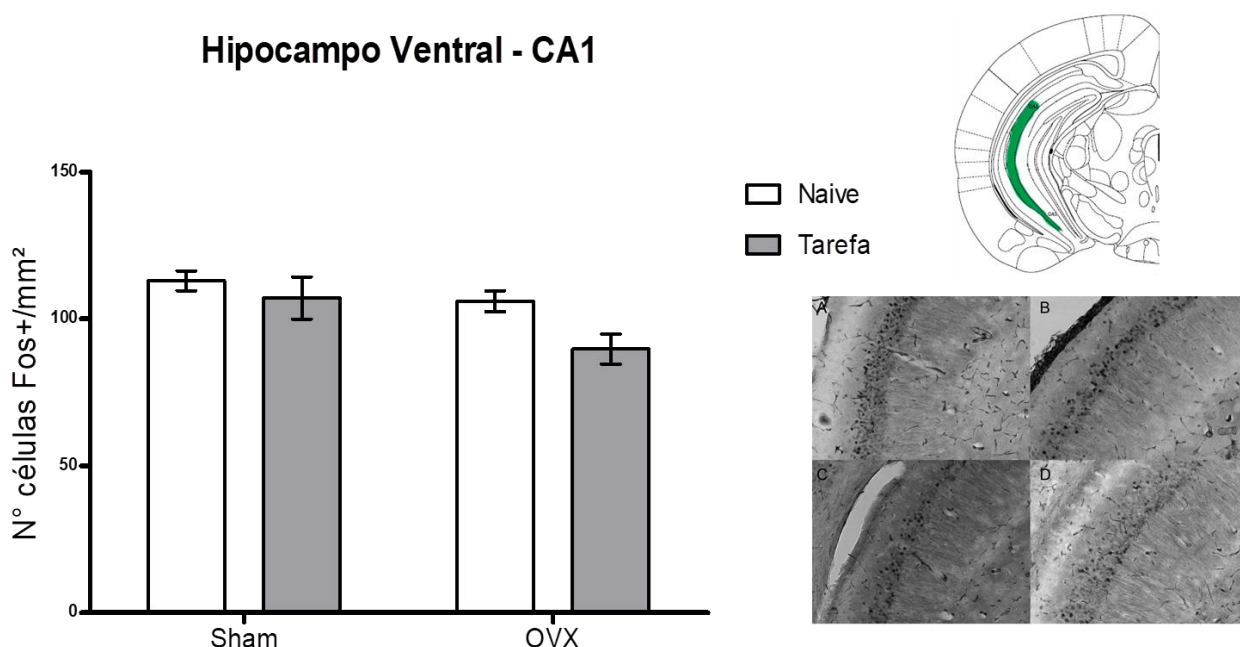


Figura 42. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA1 do hipocampo ventral. A) Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (B) e tarefa (C); OVX naive (D) e tarefa (E).

5.5.1.3.3 CA2

Doze semanas de ovariectomia levam a uma diminuição na ativação basal dos neurônios de CA2 do hipocampo ventral, que não se altera durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=10.89$; $p=0.0045$), um efeito principal da cirurgia ($F_{1,16}=24.58$; $p=0.0001$), mas não da tarefa ($F_{1,16}=1.058$; $p=0.3190$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar uma redução na ativação da ativação basal dos neurônios de CA2 do hipocampo ventral dos animais do grupo OVX se comparado ao grupo controle ($p= 0,0003$). Não foram observadas diferenças entre a ativação durante a tarefa entre grupos, bem como diferença na ativação basal e durante a tarefa nos grupos OVX e Sham (Figura 43).

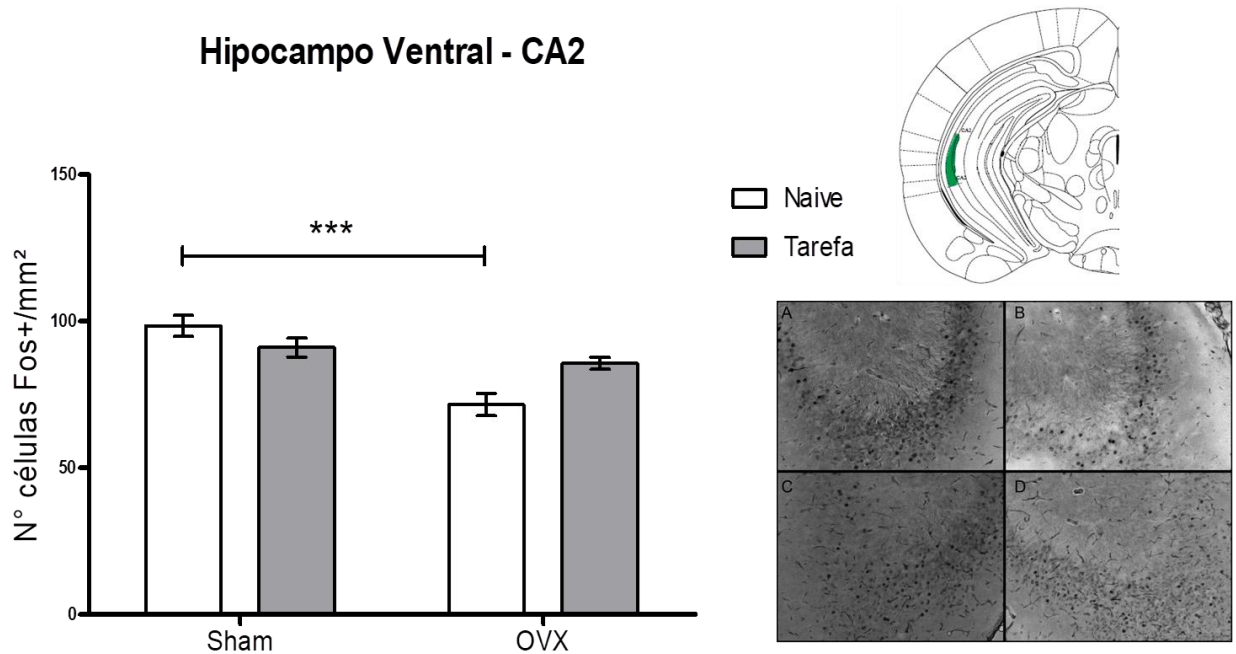


Figura 43. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA2 do hipocampo ventral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D). *** (P<0.001) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.3.4 CA3

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios de CA3 do hipocampo ventral.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=1.091$; $p=0.3119$), ou um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,16}=1.091$; $p=0.3119$) e tarefa ($F_{1,16}=0.02862$; $p=0.8678$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferenças entre grupos na ativação basal e durante a tarefa (Figura 44).

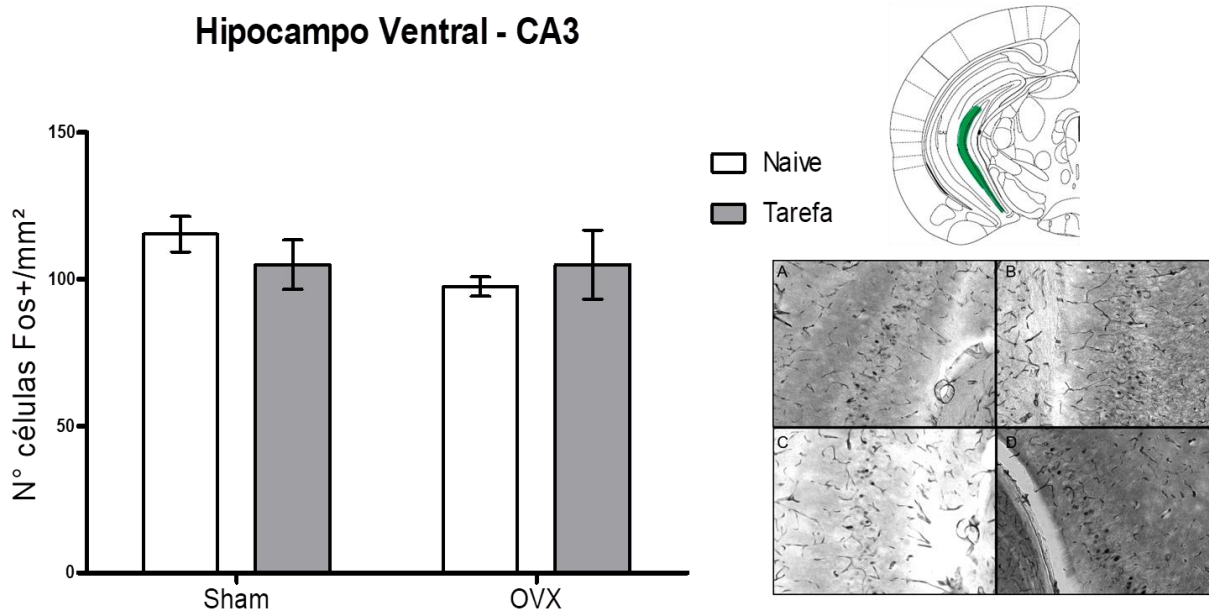


Figura 44. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios de CA3 do hipocampo ventral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).

5.5.1.4 Hipocampo Dorsal

5.5.1.4.1 Giro Denteado

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios do giro denteado do hipocampo dorsal, no entanto a tarefa aumenta a ativação destes neurônios no grupo Sham.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=0,09708$; $p=0,7594$), no entanto detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=17,53$; $p=0,0007$), mas não da ovariectomia ($F_{1,16}=0,2778$; $p=0,6053$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, um aumento na ativação dos neurônios do giro denteado do hipocampo dorsal dos animais do grupo Sham ($p= 0,0241$). Não foram observadas diferenças entre a ativação basal entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle, bem como diferença na ativação basal e durante a tarefa do grupo OVX (Figura 45).

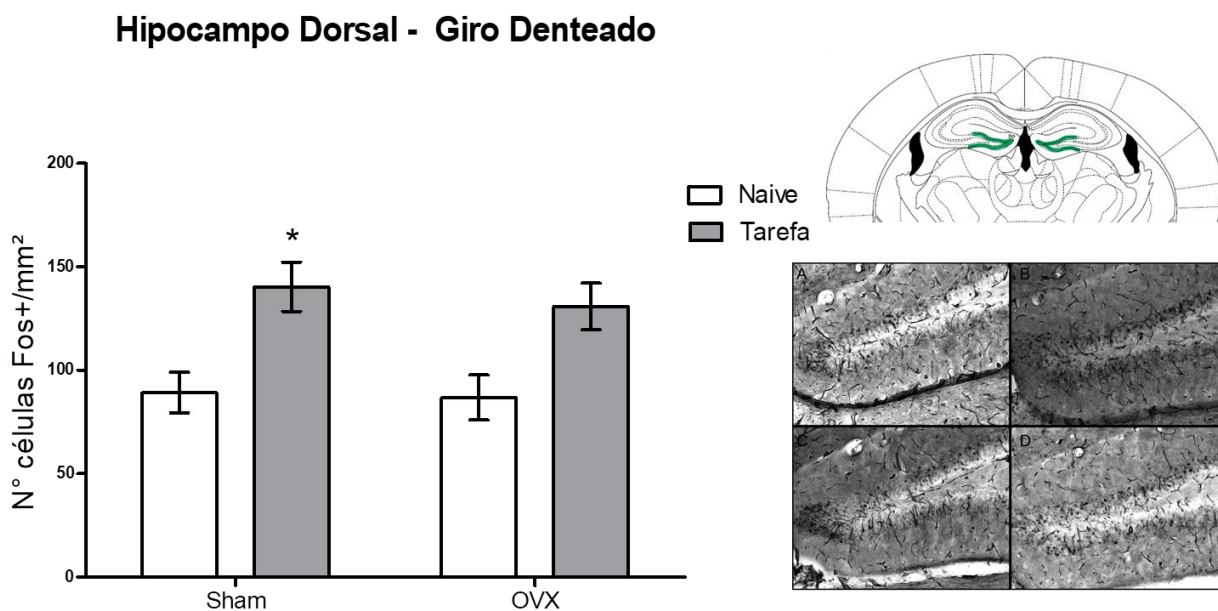


Figura 45. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do giro denteado do hipocampo dorsal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.4.2 CA1

Doze semanas de ovariectomia levam a uma diminuição na ativação basal dos neurônios de CA1 do hipocampo dorsal, que não se altera durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=11.66$; $p=0.0035$), mas não um efeito principal da cirurgia ($F_{1,16}=1.127$; $p=0.3041$) e da tarefa ($F_{1,16}=0.7007$; $p=0.4149$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar uma redução na ativação da ativação basal dos neurônios de CA1 do hipocampo ventral dos animais do grupo OVX se comparado ao grupo controle ($p= 0,0493$). Não foram observadas diferenças entre a ativação durante a tarefa entre grupos, bem como diferença na ativação basal e durante a tarefa nos grupos OVX e Sham (Figura 46).

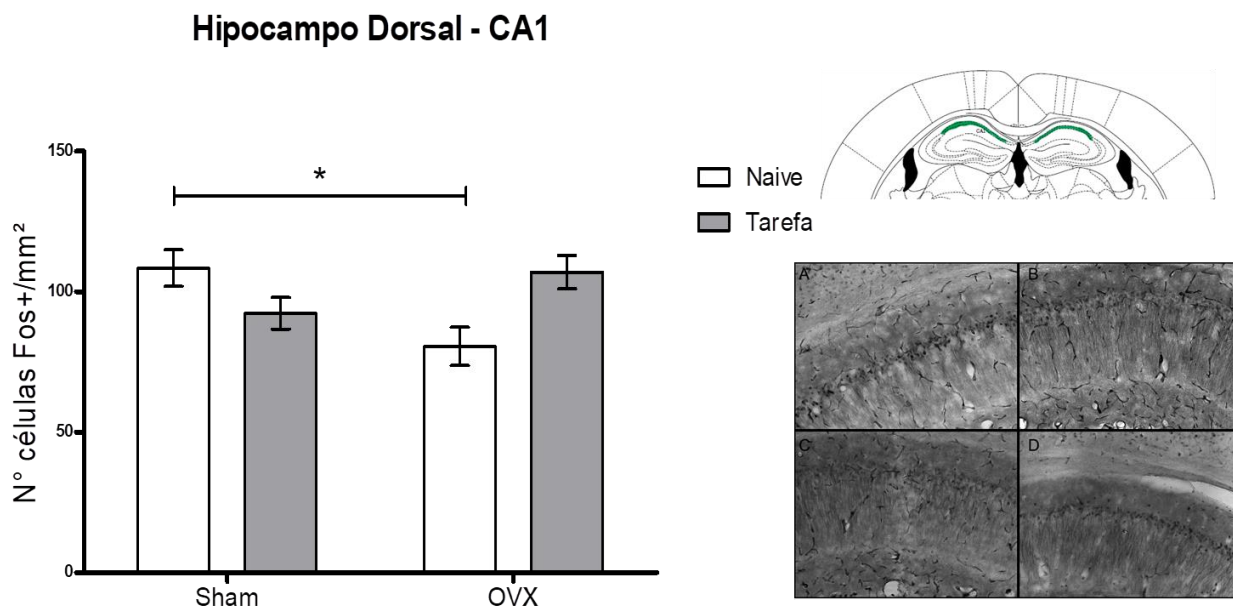


Figura 46. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA1 do hipocampo dorsal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.5.1.4.3 CA2

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios de CA2 do hipocampo dorsal.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=1.783$; $p=0.2004$), ou um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,16}=3.159$; $p=0.0945$) e tarefa ($F_{1,16}=0.02863$; $p=0.8678$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferenças entre grupos na ativação basal e durante a tarefa (Figura 47).

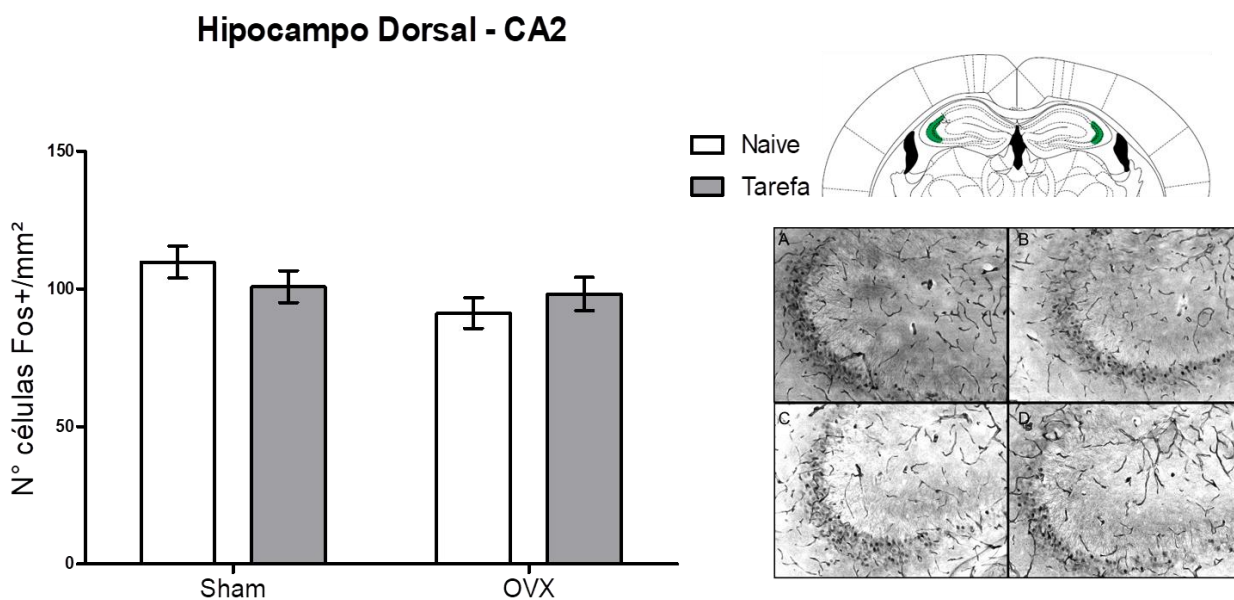


Figura 47. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA2 do hipocampo dorsal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).

5.5.1.4.4 CA3

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios de CA3 do hipocampo dorsal.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=0.05785$; $p=0.8130$), ou um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,16}=2.887$; $p=0.1087$) e tarefa ($F_{1,16}=0.16$; $p=0.6944$). De acordo com o post hoc de Bonferroni, não houve diferenças entre grupos na ativação basal e durante a tarefa (Figura 48).

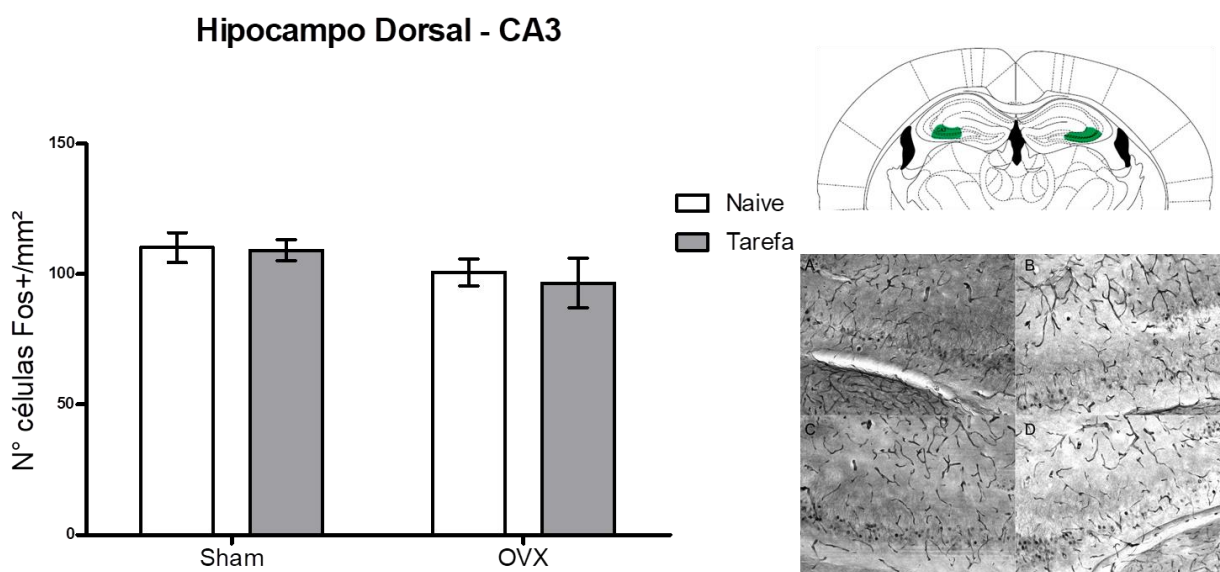


Figura 48. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios CA3 do hipocampo dorsal. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX- naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).

5.5.2 Regiões de avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais

Após a interpretação do estímulo sensorial estruturas adicionais avaliam se os eventos externos refletem as expectativas, vão ao encontro ou contradizem as necessidades do animal para então poder gerar a resposta comportamental apropriada ao modular a resposta de regiões envolvidas na interpretação.

5.5.2.1 Córtex Pré-Frontal Medial

5.5.2.1.1 Pré-Límbico

Doze semanas de ovariectomia levam a um aumento na ativação basal dos neurônios da porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial, que não se altera durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=7,665$; $p=0,0137$), no entanto não detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=2,202$; $p=0,1573$) ou da ovariectomia ($F_{1,16}=2,908$; $p=0,1075$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar um aumento na ativação basal da porção pré-límbica do córtex pré-frontal dos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0495$). Observou-se ainda um aumento desta ativação quando animais do grupo Sham foram submetidos à tarefa ansiogênica ($p=0,0354$). Não houve alteração na ativação do PFC-PL dos animais do grupo OVX submetidos à tarefa (Figura 49).

Córtex Pré-Frontal - Pré-Límbico

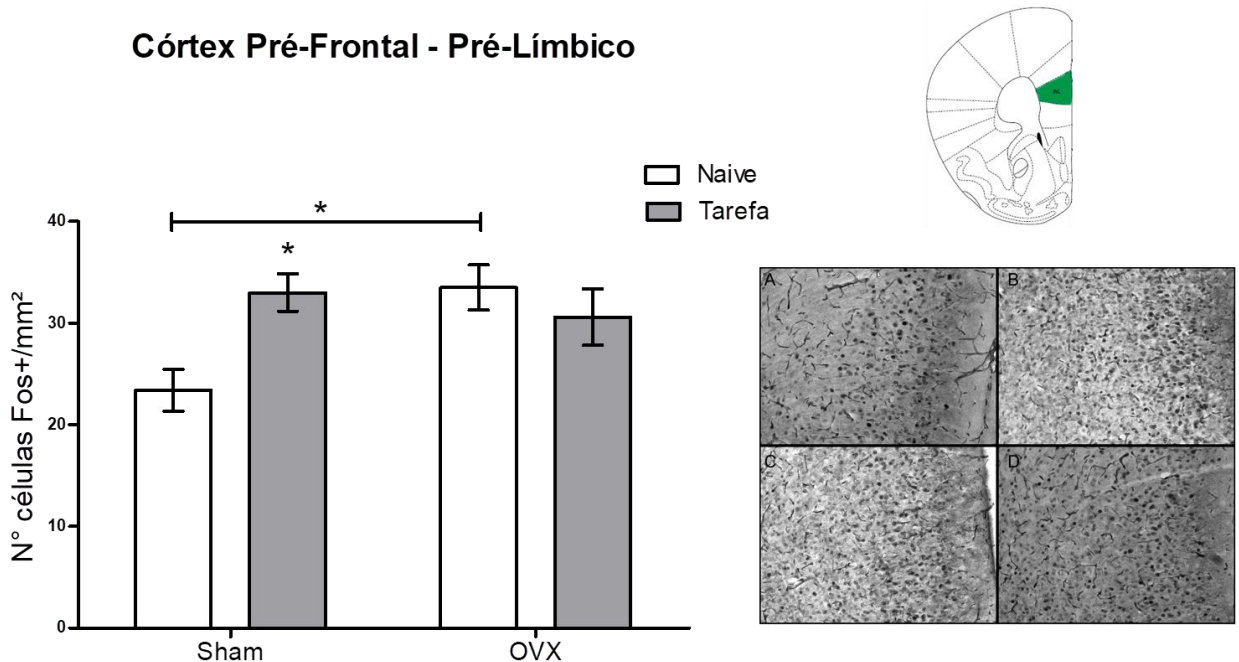


Figura 49. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção pré límbica do córtex pré-frontal medial. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham-naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D). * (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.5.2.1.2 Infra-Límbico

Doze semanas de ovariectomia levam a uma maior diminuição na ativação dos neurônios da porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=0,5897$; $p=0,4537$), no entanto detectaram um efeito principal da ovariectomia ($F_{1,16}=11,07$; $p=0,0043$), mas não da tarefa ($F_{1,16}=2,571$; $p=0,1284$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, uma redução na ativação da porção infra-límbica do córtex pré-frontal dos animais do grupo OVX em comparação com o grupo Sham ($p=0,0452$). Não

foram observadas diferenças entre o padrão de ativação basal e padrão de ativação durante a tarefa da porção infra-límbica do córtex pré-frontal dos animais Sham e OVX (Figura 50).

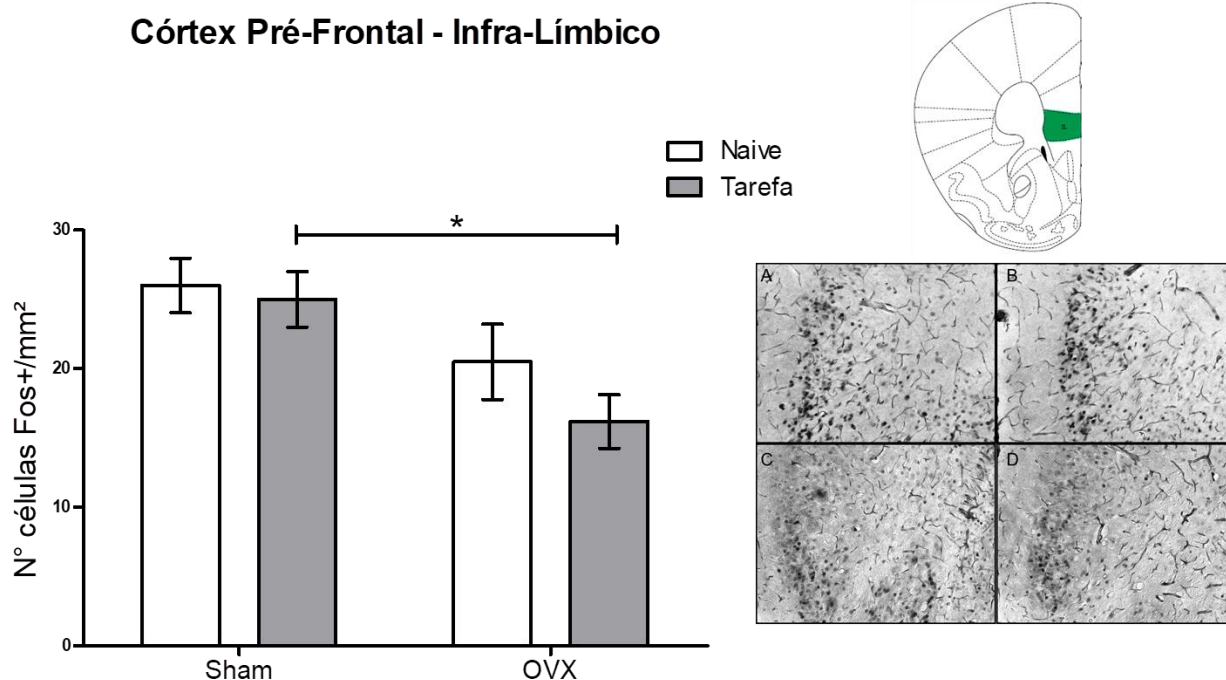


Figura 50. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial. A) Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.5.2.2 Área Tegmental Ventral

Doze semanas de ovariectomia não alteram a ativação basal e a ativação durante tarefa ansiogênica dos neurônios da área tegmental ventral, no entanto a tarefa reduz a ativação destes neurônios no grupo Sham.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=2,677$; $p=0,1213$), no entanto detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=10,89$; $p=0,0045$), mas não da ovariectomia ($F_{1,16}=1,787$; $p=0,1999$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, uma diminuição na ativação dos neurônios da área tegmental ventral dos animais do grupo Sham ($p= 0,0121$). Não foram observadas diferenças entre a ativação basal entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle, bem como diferença na ativação basal e durante a tarefa do grupo OVX (Figura 51).

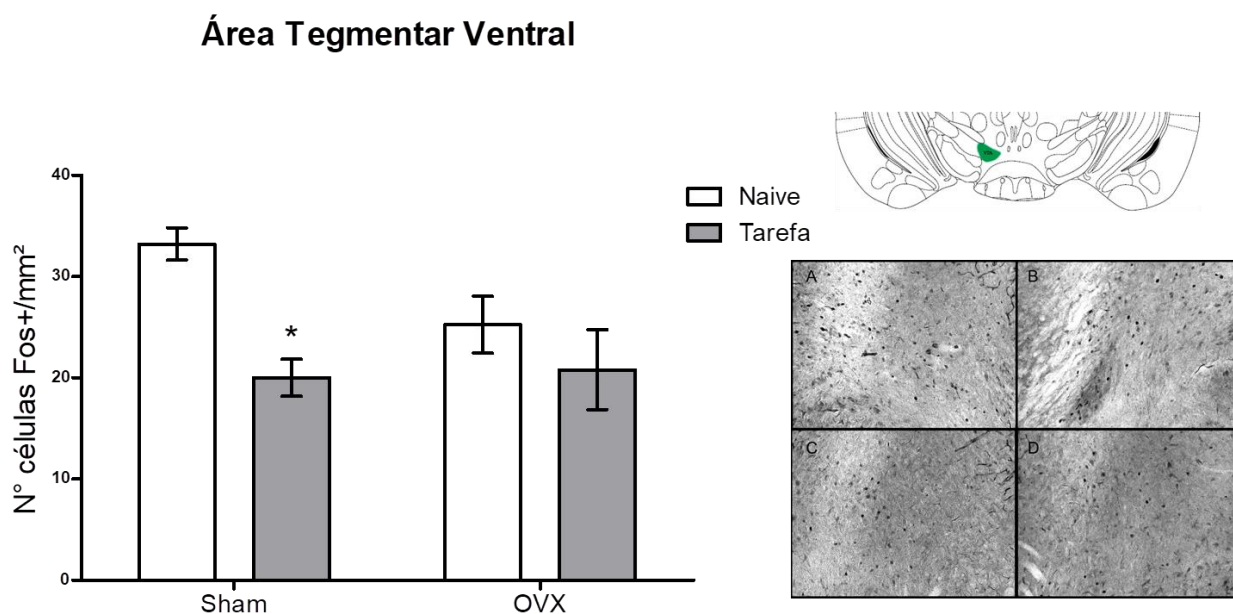


Figura 51. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da área tegmental ventral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX- naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* ($P < 0.05$) indica diferença entre os grupos.

5.5.2.3 Área Hipotalâmica Lateral

Doze semanas de ovariectomia levam a um aumento na ativação basal dos neurônios da área hipotalâmica lateral e a tarefa ansiogênica provoca uma redução na ativação destes neurônios em ambos os grupos.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=3.187$; $p=0.0932$), no entanto detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=37.58$; $p<0.0001$), e da ovariectomia ($F_{1,16}=7.475$; $p=0.0147$). De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, um aumento da ativação basal dos neurônios da área hipotalâmica lateral do grupo OVX se comparado ao grupo controle ($p=0,0464$). Observou-se ainda uma diminuição na ativação destes neurônios durante a tarefa ansiogênica no grupo Sham ($p=0,0306$) e no grupo OVX ($p=0,0004$). Não foi observada diferença no padrão de ativação neuronal durante a tarefa entre os grupos (Figura 52).

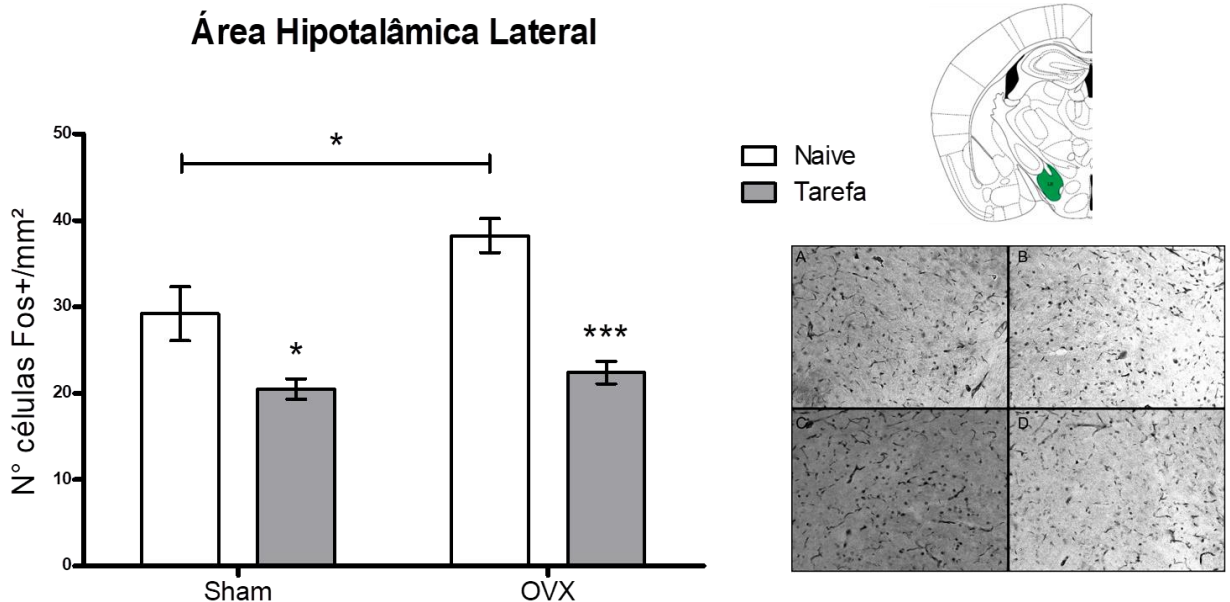


Figura 52. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios da área hipotalâmica lateral. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) indica diferença entre os grupos e *** (P<0.001) indica diferença entre os grupos.

5.5.3 Regiões de iniciação da resposta relacionada à ansiedade

Em consequência da interpretação e modulação decorrente da avaliação da interpretação dos estímulos sensoriais, a resposta adequada à situação é iniciada a partir da ação de núcleos efetores dentre outros, os apresentados abaixo.

5.5.3.1 Núcleo Ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal

Doze semanas de ovariectomia levam a um aumento na ativação dos neurônios do núcleo ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal durante a tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=5.132$; $p=0.0377$), e um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=10.79$; $p=0.0047$), mas não da ovariectomia ($F_{1,16}=2.889$; $p=0.1086$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, um aumento da ativação dos neurônios do núcleo ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal do grupo OVX em relação à ativação basal ($p=0,0107$). Não foram observadas diferenças no padrão de ativação neuronal entre os grupos ou na ativação basal e durante a tarefa no grupo Sham (Figura 53).

Substância Cinzenta Periaquedual - Núcleo Ventrolateral

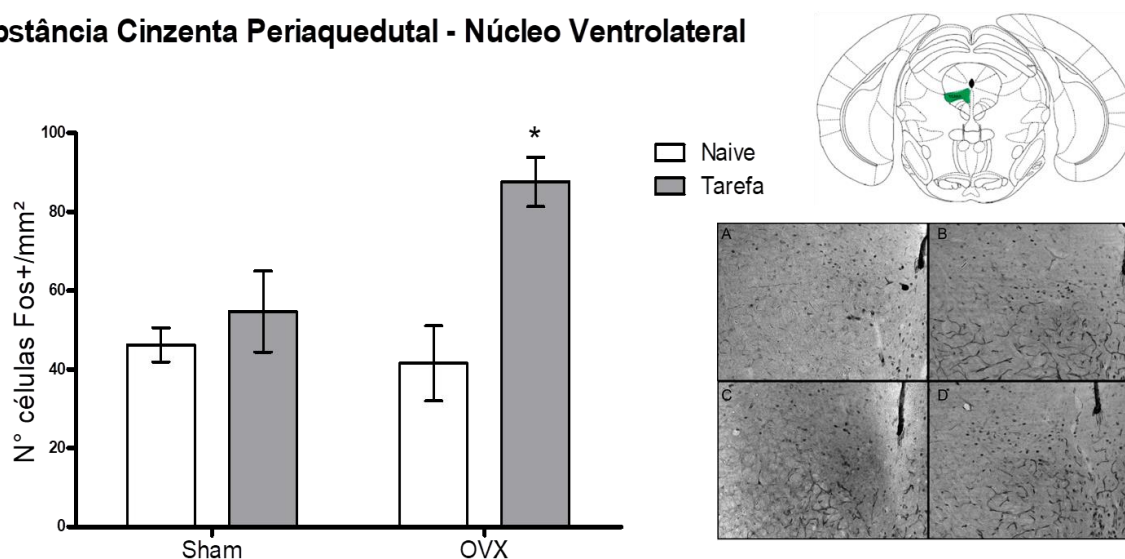


Figura 53. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo ventrolateral da substância cinzenta periaquedual. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) indica diferença entre os grupos.

5.5.3.2 Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

Doze semanas de ovariectomia levam a uma maior ativação dos neurônios do núcleo dorsomedial do hipotálamo durante tarefa ansiogênica.

As análises da ANOVA de duas vias não detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=1.459$; $p=0.2447$), mas detectaram um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=33.53$; $p<0.0001$) e da ovariectomia ($F_{1,16}=9.141$; $p=0.0081$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, durante a tarefa ansiogênica, um maior aumento da ativação dos neurônios núcleo dorsomedial do hipotálamo do grupo OVX em relação ao grupo controle ($p=0,0366$). Observou-se ainda um aumento na ativação destes neurônios, durante a tarefa em relação à ativação basal, no grupo OVX ($p=0,0014$) e no grupo Sham ($p=0,0211$). Não foram observadas diferenças no padrão de ativação neuronal basal entre os grupos (Figura 54).

Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

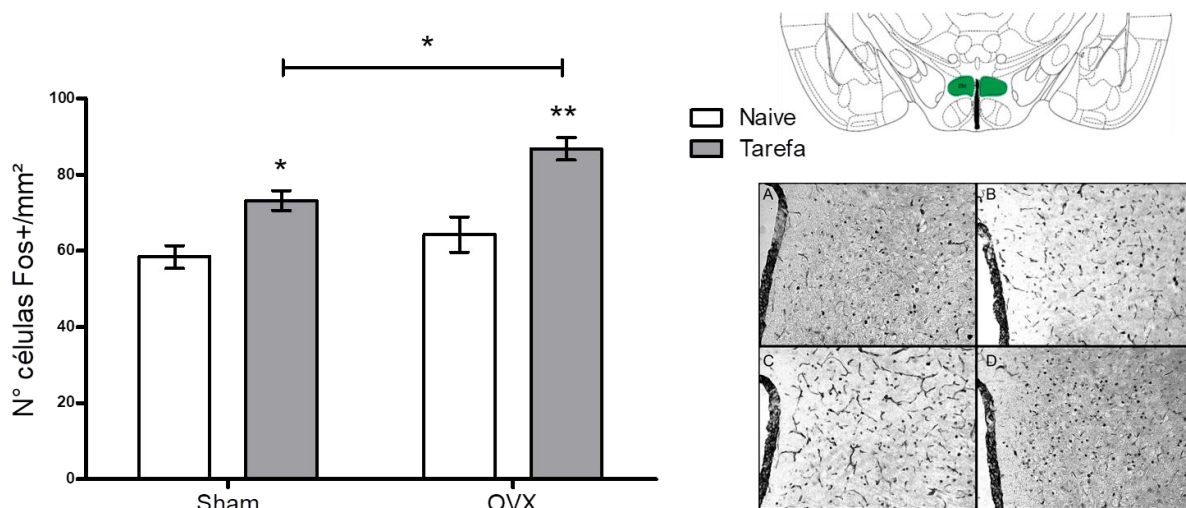


Figura 54. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo dorsomedial do hipotálamo. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) e ** (P<0.01) indicam diferenças entre os grupos.

5.5.3.3 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Doze semanas de ovariectomia levam a um aumento na ativação basal dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre a tarefa ansiogênica e a cirurgia de ovariectomia ($F_{1,16}=8.668$; $p=0.0095$), um efeito principal da tarefa ($F_{1,16}=39.25$; $p<0.0001$) mas não da ovariectomia ($F_{1,16}=4.238$; $p=0.0562$).

De acordo com o post hoc de Bonferroni, pôde-se observar, um aumento basal na ativação dos neurônios da área hipotalâmica lateral do grupo OVX em comparação ao grupo controle ($p=0,0234$). Observou-se ainda, durante a tarefa, um aumento na ativação destes neurônios no grupo Sham ($p<0.0001$), o que não ocorreu no grupo OVX. Também não foi observada diferença na ativação neuronal durante a tarefa entre grupos (Figura 55).

Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

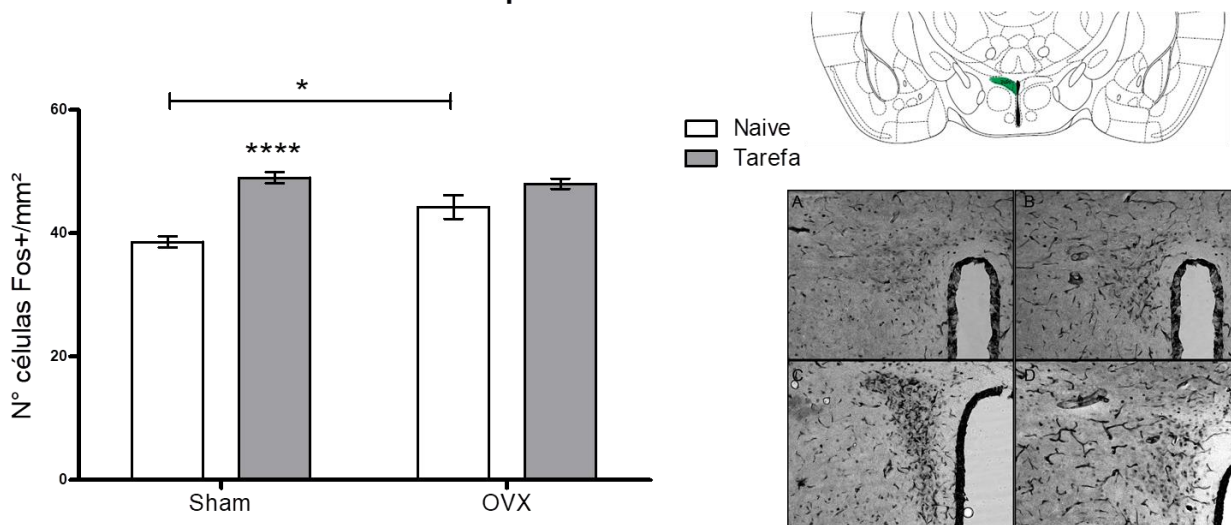


Figura 55. Efeito de 12 semanas de ovariectomia no perfil de ativação basal (naive) e após tarefa ansiogênica dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo. Quantificação de células Fos positivas nos grupos Sham- naive; Sham-tarefa; OVX-naive; OVX- tarefa (n= 4-6). Imagens ilustrativas da marcação de Fos nos diferentes grupos analisados: sham naive (A) e tarefa (B); OVX naive (C) e tarefa (D).* (P<0.05) e **** (P <0.0001) indicam diferenças entre os grupos.

5.5.4 Resumo dos resultados da expressão de Fos

	Sham		OVX		Naive		Tarefa	
	Naive	Tarefa	Naive	Tarefa	Sham	OVX	Sham	OVX
BLA	↑	↓	=	=	↑	↓	=	=
CeA	↓	↑	=	=	↓	↑	=	=
ovBNST	↑	↓	=	=	=	=	=	=
adBNST	=	=	=	=	=	=	=	=
PL	↓	↑	=	=	↓	↑	=	=
IL	=	=	=	=	=	=	↑	↓
dHPC - DG	↓	↑	=	=	=	=	=	=
dHPC - CA1	=	=	=	=	↑	↓	=	=
dHPC - CA 2	=	=	=	=	=	=	=	=
dHPC - CA3	=	=	=	=	=	=	=	=
vHPC - DG	↑	↓	=	=	=	=	=	=
vHPC - CA1	=	=	=	=	=	=	=	=
vHPC - CA 2	=	=	=	=	↑	↓	=	=
vHPC - CA3	=	=	=	=	=	=	=	=
VTA	↑	↓	=	=	=	=	=	=
DMH	↓	↑	↓	↑	=	=	=	=
PVN	↓	↑	=	=	↓	↑	↓	↑
LH	↑	↓	↑	↓	↓	↑	=	=
PAG	=	=	↓	↑	=	=	=	=

Tabela 07: Resumo dos resultados da expressão de Fos.

6. Discussão

Nossos resultados demonstram que 12 semanas de ovariectomia desencadeiam um fenótipo ansioso em camundongos C57BL/6, sem comprometer a atividade locomotora e exploratória.

Estes resultados corroboram estudos prévios usando ratas ovariectomizadas (WENDY et al., 2004; WALF et al., 2009; CHAVES et al., 2009), ratas em transição para a senescência reprodutiva (WALF, et al., 2009b) e camundongos fêmeas com 24 meses de idade (WALF & FRYE, 2010). Também foi observado que fêmeas OVX apresentam comportamento ansioso/compulsivo no teste de enterrar esferas, o que se assemelha ao observado em ratas na fase diestro (LLANEZA & FRYE, 2009).

Ao contrário dos resultados obtidos a partir da análise dos demais testes, não encontramos alteração no fenótipo de ansiedade entre os grupos Sham e OVX, no teste da neofagia. Como já mencionado anteriormente, este é um teste utilizado para avaliar o comportamento tipo ansioso em roedores partindo da premissa que, em um ambiente novo, camundongos exibem uma latência aumentada para alimentação, mesmo estando famintos. Interessantemente, além de não diferirem do grupo controle no teste de neofagia, as fêmeas modelo de pós-menopausa ganharam mais peso durante as 3 semanas de OVX (Figura 25).

De fato, sabe-se há muitos anos que hormônios ovarianos alteram o comportamento alimentar. WADE e GRAY em uma revisão publicada em 1979 apresentaram uma tabela demonstrando os efeitos da ausência e da presença do estradiol e da progesterona no comportamento alimentar, peso corporal e adiposidade. Os autores relataram que a ovariectomia, assim como o tratamento com os hormônios estradiol e progesterona, seja periférico ou diretamente nos núcleos hipotalâmicos dorsomedial e paraventricular, exerce um efeito de aumento de ingesta alimentar, peso corporal e adiposidade, embora o tratamento apenas com estradiol diminua a ingesta alimentar, peso corporal e adiposidade.

Manipulação Hormonal	Ingesta alimentar	Peso Corporal e Adiposidade
Ovariectomia	↑	↑
Estradiol	↓	↓
Progesterona	Sem efeito	Sem efeito
Estradiol + Progesterona	↑	↑

Tabela 08: Efeitos dos hormônios ovarianos na ingestão alimentar e adiposidade. (Modificado de Wade & Gray, 1979).

Observamos também, nos animais OVX, uma atividade basal aumentada dos núcleos PVN e LH do hipotálamo, regiões responsáveis pela modulação do comportamento alimentar. A administração de peptídeos orexígenos no PVN estimula o comportamento de ingestão (STANLEY & LEIBOWITZ, 1985; KIM et al., 2000). Já os neurônios da área hipotalâmica lateral contêm neuropeptídeos orexígenos dentre eles o hormônio de concentrador de melanina (MCH) e orexinas (BROBERGERE et al., 1998). Daqing Qu e colaboradores, em trabalho publicado no ano 1996, verificaram que a injeção de MCH no ventrículo cerebral lateral de ratos aumenta a ingestão de alimentos, enquanto o jejum aumenta a expressão do mRNA de MCH.

Considerando que a (1) OVX exacerbou a atividade de áreas pertencentes aos circuitos neurais indutores de comportamentos de ingestão, (2) a OVX aumentou o peso corporal das fêmeas e (3) não observamos fenótipo de ansiedade induzido pela OVX no teste de neofagia, que requer uma privação de alimentos por 18 horas, propomos que o circuito da fome possui maior relevância na hierarquia comportamental se comparado ao da ansiedade e, por isso, o efeito da OVX sobre a ansiedade foi suprimido em favor do comportamento alimentar.

Para verificação da sensibilidade da ansiedade provocada pela ausência crônica de hormônios ovarianos à medicamentos ansiolíticos, utilizamos o tratamento agudo com diazepam, uma vez que, em humanos, os benzodiazepínicos são ansiolíticos clássicos e clinicamente efetivos, independente da origem do quadro de ansiedade (BODNOFF, et al., 1989, RICKELS et al., 1993). A droga, no

grupo tratado, ou a salina (veículo), no grupo controle, foi administrada na dose de 1mg/Kg via intra-peritoneal, 30 minutos antes dos testes comportamentais. Os testes realizados, labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e campo aberto, foram escolhidos a partir de sua relevância nos experimentos anteriores, nos quais vimos aumento do fenótipo ansioso nos animais ovariectomizados. Utilizamos os parâmetros total de entradas / número de transições / cruzamentos totais, que os testes nos forneceram, como medida de atividade locomotora, tendo em vista que esta é fundamental para a interpretação dos mesmos e o diazepam pode exercer efeito sedativo. No entanto não verificamos tal efeito no comportamento de exploração dos animais dos grupos Sham e OVX, garantindo a validade dos nossos resultados.

O teste do labirinto em cruz elevado e o teste transição claro escuro demonstraram um efeito ansiolítico do diazepam. Este resultado corrobora os achados de diversos outros pesquisadores que utilizaram a mesma dose, porém, em camundongos machos (COLE e RODGERS, 1995; PULTRINI et al., 2006; PENG et al., 2000; YADAVE et al., 2008).

No entanto, nos surpreendemos com o resultado obtido a partir do teste do campo aberto, onde o grupo tratado apresentou um fenótipo ansioso se comparado ao grupo salina. Entretanto, Laetitia Prut e Catherine Belzung, em uma ampla revisão de literatura publicada em 2003, intitulada "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review", afirmam que, embora os benzodiazepínicos clássicos sejam amplamente utilizados no tratamento clínico da ansiedade, sua administração aguda induz efeitos ansiolíticos, indicados por um aumento da porcentagem de entradas dos animais tratados na parte central do campo aberto em 56% dos estudos. No entanto, em 31% dos estudos, essa droga não apresenta efeito e em 13% dos estudos apresenta efeito ansiogênico.

Sendo assim, é possível que essa resposta diferenciada das fêmeas OVX ao diazepam seja característica deste modelo. Futuros experimentos testando o diazepam em fêmeas sham e machos, concomitantemente, podem nos auxiliar a desvendar a razão pela qual o modelo OVX responde diferentemente a esta droga. Podemos ainda, futuramente, investigar o efeito de outros benzodiazepínicos neste modelo.

Ao avaliarmos a expressão de Fos nos animais Sham e OVX do grupo naive verificamos a ativação neural basal das estruturas relacionadas à ansiedade.

Nossos resultados demonstram que os animais OVX naive em relação aos Sham naive apresentam menor ativação da amígdala basolateral, da região CA1 do hipocampo dorsal e CA2 do hipocampo ventral, além de apresentarem maior ativação da amígdala central, da região pré-límbica do córtex pré-frontal medial, do núcleo paraventricular do hipotálamo e da área hipotalâmica lateral, diferenças ilustradas na figura 56.

Ativação basal do cérebro OVX em relação ao Sham

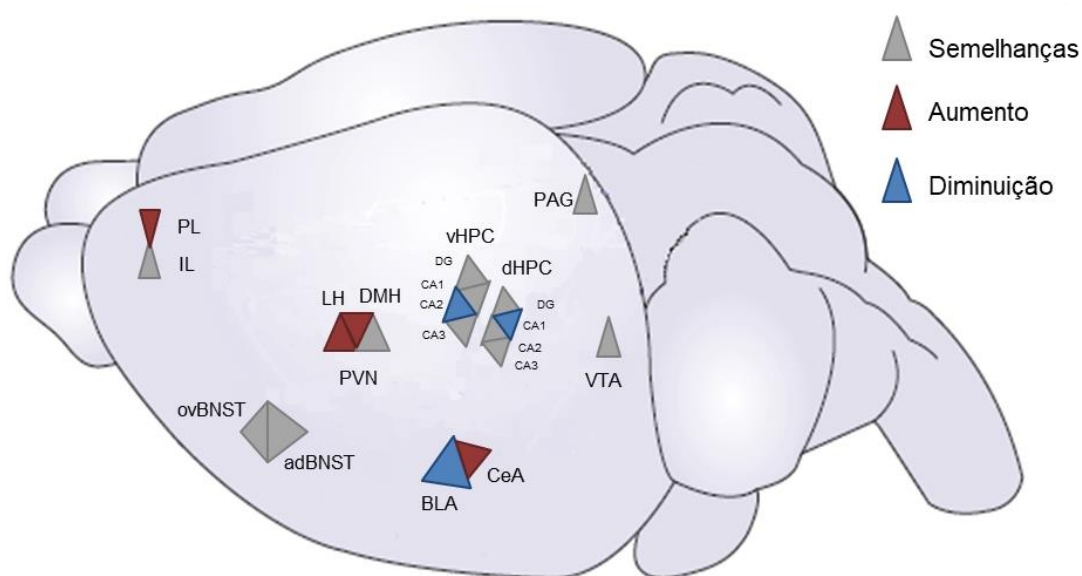


Figura 56: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade do grupo OVX em relação ao Sham em condição basal.

Levando em consideração que a atividade das estruturas cerebrais diferiu entre grupos mesmo na ausência de qualquer estímulo novo e/ou ansiogênico, estes resultados sugerem que a ausência dos hormônios ovarianos, característica

da pós-menopausa, desencadeia modificações nestas estruturas alterando sua excitabilidade neuronal basal.

Sabe-se que esteróides ovarianos influenciam a excitabilidade neural modulando a atividade dos receptores de neurotransmissores e dos canais iônicos (MELLON, 1994; KAWATA, 1995; LAMBERT et al., 1995; RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999). Existem inúmeros estudos sobre as ações do estradiol no SNC e a maioria dos dados dizem da capacidade do estradiol em aumentar a excitabilidade neuronal ao aumentar a transmissão glutamatérgica e diminuir a inibição GABAérgica (SCHARFMAN & MACLUSKY, 2006). O estradiol eleva o número e a densidade das espinhas dendríticas além de alterar a formas destas estruturas, efeitos que elevam a transmissão sináptica glutamatérgica (MACLUSKY et al., 2005; POZZO-MILLER et al., 1999; LI, et al., 2004). Além disso, o estradiol é capaz de aumentar as ações do glutamato em seus receptores ionotrópicos, NMDA (RUDICK & WOOLLEY, 2000; ZAMANI, et al., 1999) e inibir as transmissões GABAérgicas diminuindo os efeitos do neurotransmissor GABA nos receptores GABA_A, efeito verificado nas células piramidais de CA1 do hipocampo de ratos (RUDICK & WOOLLEY, 2000; SEGAL & MURPHY, 2001). Por outro lado, os receptores de estradiol ER α é expresso em subconjuntos de neurônios GABAérgicos (HART, et al., 2001). Este hormônio é capaz de aumentar os níveis da enzima sintética para o ácido γ -aminobutírico, ácido glutâmico descarboxilase (GAD), aumentando, desta forma os níveis de GABA no SNC (RUDICK & WOOLLEY, 2000; WEILAND, 1992). Desta forma, a relação do estradiol com a excitabilidade pode não ser unidirectional, sua ação no aumento da excitabilidade neural é clara, mas o inverso também pode ocorrer (RHODES et al., 2004).

Com relação à progesterona, uma série de estudos in vitro mostrou que seu metabólito, a alopregnanolona, melhora as ações do GABA nos receptores GABA_A (MAJEWSKA, et al., 2005; BELELLI & LAMBERT, 2005). A expressão de receptores GABA_A sensíveis a alopregnanolona é generalizada e robusta em muitas condições, dentre elas, cultura celulares e de tecidos e fatias de cérebro. No entanto, é importante ressaltar que outras progestinas, como a própria progesterona e a dihidroprogesterona, podem ter ações relevantes na diminuição da excitabilidade neuronal no hipocampo, independente da formação de alopregnanolona

(EDWARDS et al., 2001). Brown e colaboradores, em 1987, demonstraram que os efeitos das progestinas podem ser potencializados na presença do estradiol uma vez que este hormônio induz a síntese dos receptores de progestinas (BROWN et al., 1987). Por outro lado, as progestinas agem através de receptores nucleares inibindo as funções dos receptores de estrogênios (LEAVITT, et al., 1987). Desta forma, a progesterona exerce dois efeitos, via seus próprios receptores de forma dependente dos níveis de estradiol e agindo nos receptores GABA_A após ser convertida em alopregnanolona (SCHARFMAN & MACLUSKY, 2006).

Coerente com estes resultados, podemos sugerir que a inibição basal da excitabilidade neural encontrada nas fêmeas OVX deve-se à regulação para baixo do sistema glutamatérgico em resposta à ausência de estradiol. Em contrapartida, nas áreas hiperativadas, podemos sugerir uma regulação para cima do sistema GABAérgico, devido à ausência do mesmo hormônio nas fêmeas OVX. Logo, seria muito interessante, em experimentos futuros, quantificar os níveis de GABA nas áreas onde a excitabilidade basal foi aumentada pela OVX. De fato, a densidade de neurônios glutamatérgicos é alta na BLA, ao passo que na CeA, há uma preponderância de neurônios GABAérgico (TYE, 2011). Experimentos futuros poderão nos indicar a identidade dos neurônios positivos para Fos, já que este marcador não é específico para neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos.

Jennings e colaboradores, em trabalho publicado em 2013, demonstraram, em camundongos, que o aumento da ativação da área hipotalâmica lateral leva a um aumento do comportamento de ingestão, o que nos leva a crer que a maior ativação basal desta estrutura, detectada nos animais ovariectomizados ao compará-los aos controle, possa justificar o maior aumento de peso ao longo das 12 semanas observados neste grupo experimental.

Suzuki e colaboradores, em 2016, demonstraram um aumento na ativação de neurônios da porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial que se projetam para a amígdala durante a tarefa de condicionamento ao medo. Posto isto, esta área parece facilitar a resposta diante de estímulos ansiogênicos. Acreditamos que a maior ativação basal desta estrutura nos animais OVX, em relação aos controle, seja um facilitador de seu maior fenótipo ansioso.

Tovote e colaboradores, no ano de 2015, afirmou que, projeções da CeA para a PAG, quando ativadas desinibem núcleos da substância cinzenta periaquedutal levando a comportamentos de fuga e freezing. A maior ativação basal da CeA nos animais ovariectomizados quando comparados aos controles, pode estar favorecendo a via de desinibição da substância cinzenta periaquedutal, responsável por respostas ansiogênicas.

Para a mensuração da expressão de Fos induzida por evento ansiogênico, utilizamos o teste do labirinto em cruz elevado modificado. Como já dito anteriormente, o aparato consiste em mesmo labirinto de acrílico, porém, com acesso livre apenas para porção central e braços abertos. Esta modificação foi necessária para impossibilitarmos a fuga do animal para os braços fechados, um ambiente menos aversivo, tornando o teste predominantemente ansiogênico.

As análises comportamentais foram realizadas a partir da divisão dos braços abertos em porções: proximal, intermediária e distal em ordem crescente de aversividade. Verificamos que os animais ovariectomizados exploram menos e por um tempo menor as regiões intermediária e distal e passam mais tempo no centro do aparato quando comparados ao grupo Sham, além de exibirem outros comportamentos do tipo-ansiosos correntemente analisados no EPM tradicional, como comportamento de avaliação de risco aumentado e comportamento de mergulhos de cabeça diminuído, indo ao encontro dos nossos resultados anteriores.

Ao verificamos a ativação neural das estruturas relacionadas à ansiedade durante uma situação ansiogênica, observamos que os animais OVX tarefa em relação ao grupo Sham tarefa apresentam menor ativação da porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial e uma maior ativação do núcleo dorsomedial do hipotálamo, diferenças ilustradas na figura 57.

Ativação do cérebro OVX em relação ao Sham durante tarefa ansiogênica

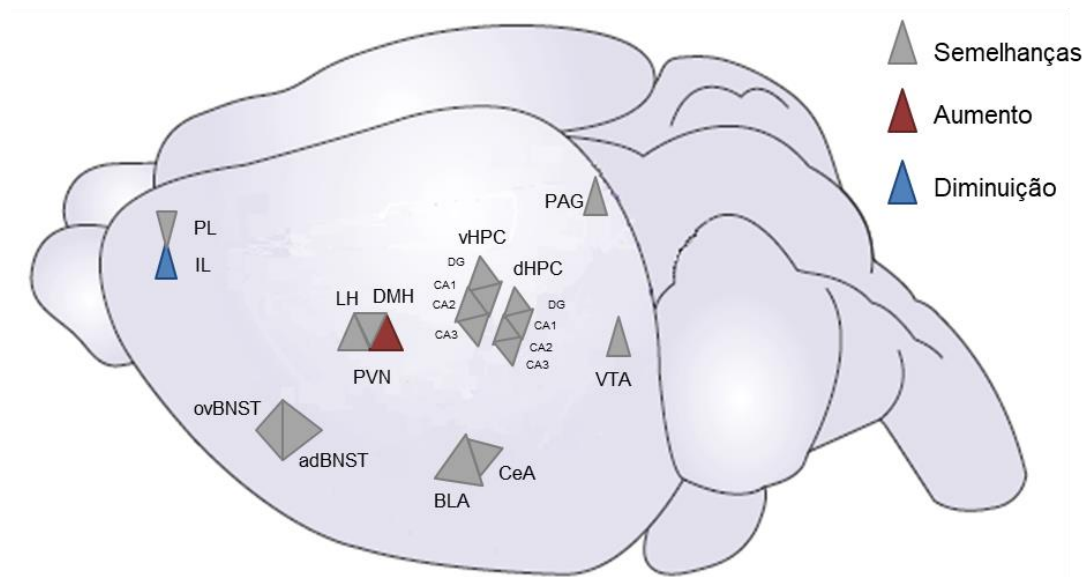


Figura 57: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade no grupo OVX em relação ao Sham e OVX em condição ansiogênica.

Nascimento e colaboradores, em 2010, demonstraram que lesões no núcleo dorsomedial do hipotálamo diminuem o comportamento de esquiva em camundongos. Por outro lado, uma maior ativação desta região aumenta o comportamento de esquiva dos animais. Esta observação corrobora com os observados neste trabalho, uma vez que o grupo ovx, se comparados aos controles, apresentam uma maior ativação do DHM e apresentaram um maior comportamento de esquiva no teste do labirinto em cruz elevado modificado ao permanecerem um maior tempo na porção central em relação ao grupo sham.

Suzuki e colaboradores, no ano de 2016, demonstraram a ocorrência de maior ativação de neurônios da porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial que se projetam para a amígdala durante tarefas de extinção do medo condicionado.

Desta forma, uma maior atividade desta região parece suprimir respostas diante de estímulos ansiogênicos. Acreditamos que a menor ativação desta região observada no grupo ovariectomizado, quando comparados ao grupo controle, não esteja sendo suficiente para modular/suprimir as respostas tipo-ansiosas destes animais diante de uma situação ansiogênica.

Observamos um menor número de diferenças encontradas entre os grupos Sham e OVX durante a tarefa ansiogênica quando comparados ao número de diferenças encontradas entre grupos em situação basal, como ilustrado na figura 58. Este fato nos demonstrou que o padrão de ativação do cérebro dos animais OVX naive se encontra mais distante do padrão de ativação do cérebro Sham Naive se compararmos com os padrões de ativação entre os grupos durante a tarefa e, possivelmente, o cérebro dos animais Sham e o cérebro dos animais OVX buscam se ajustar de maneira semelhante às situações que geram ansiedade.

Ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade no grupo OVX em relação ao Sham condição basal e ansiogênica

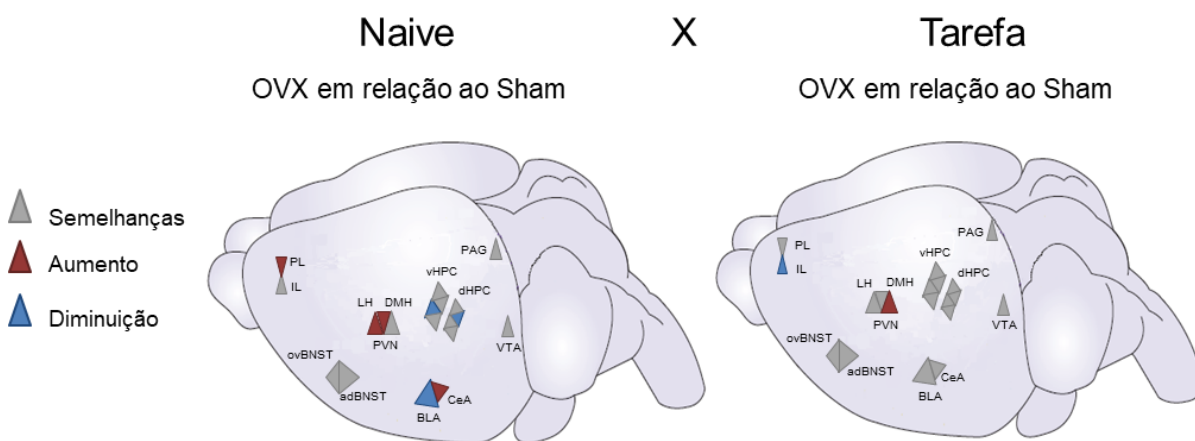


Figura 58: Figura esquemática demonstrativa das diferenças do padrão de ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade no grupo OVX em relação ao Sham condição basal e ansiogênica.

Uma observação que merece destaque é o significativo aumento de ativação do núcleo ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal no grupo OVX durante a tarefa ansiogênica. Como já abordado no presente trabalho esta região faz parte das regiões de iniciação da resposta relacionada à ansiedade, conhecida, particularmente, por atuar como um centro de controle dos comportamentos de medo. Graeff e colaboradores, em estudo publicado no ano de 2005, demonstraram que a estimulação da substância cinzenta periaquedutal elicia respostas relacionadas à ansiedade e ao pânico. O que justifica o fenótipo ansioso observado no grupo OVX quando comparados com o grupo Sham.

Desta forma, a maior ativação da PAG pode justificar o comportamento do tipo ansioso dos animais do grupo OVX quando comparados ao grupo Sham. Este aumento de ativação da PAG no grupo OVX tarefa, por sua vez poderia ser explicado pela ausência da modulação (diminuição da atividade) da BLA durante a tarefa, que ocorre no grupo Sham quando comparados ao grupo OVX. De acordo com Tye, 2011, a CeA predominantemente GABAérgica (~ 95% dos neurônios) recebe projeções excitatórias da BLA e, portanto, a ativação da CeA que, por sua vez, envia projeções para PAG poderia agir de forma a inibir neurônios que agem na inibição desta estrutura.

É interessante observar, ainda, que, ao compararmos os grupos Sham e OVX, a variação de ativação neuronal das áreas relacionadas à ansiedade diante das situações naive e tarefa no grupo Sham são consideravelmente maiores quando comparadas ao grupo OVX. Olhando cuidadosamente os gráficos verificamos que o padrão de ativação basal da maioria das estruturas do grupo OVX se aproxima ao padrão de ativação durante tarefa ansiogênica. O que nos leva a crer que a ansiedade basal desses animais deva estar elevada embora não a tenhamos medido. Assim, por já estarem possivelmente ansiosos em situação basal, a ativação durante a tarefa em que emitem comportamento do tipo-ansioso não se altera com a mesma frequência e amplitude com que ocorre no grupo Sham.

É digno de nota que o método da imunohistoquímica para a análise da expressão de Fos, utilizado neste trabalho para verificarmos a ativação neuronal, embora bastante útil, não é temporalmente preciso. Desta forma, o padrão de

ativação que observamos no grupo tarefa não é, necessariamente, correspondente somente ao comportamento tipo-ansioso, mas ao resultado de toda modulação que ocorre entre estruturas desse complexo circuito para se adaptar à tarefa ansiogênica.

7. Conclusão

O presente estudo revelou que o modelo de OVX é apropriado para o estudo da ansiedade induzida pela pós-menopausa tendo em vista que satisfaz (1) o critério da validade aparente, onde o fenótipo animal deve reproduzir as condições humanas; (2) o critério da validade preditiva, o qual postula que agentes farmacológicos que reduzem a condição patológica em humanos, devem ser efetivos em animais e (3) a validade de construtucto, segundo a qual as causas da doença em humanos devem ser equivalentes em modelos animais, uma vez que camundongos fêmeas ovariectomizadas e mulheres na menopausa apresentam severa queda nos níveis de hormônios ovarianos e, portanto, possuem a mesma base neurobiológica para a manifestação da ansiedade.

Além disso, avançamos um passo importante na busca pelas bases neurais da ansiedade induzida pela menopausa, já que observamos um padrão de ativação de áreas ansiogênicas e ansiolíticas diferente em fêmeas OVX, em comparação com fêmeas Sham.

8. Referências Bibliográficas

Adhikari A. (2014) Distributed circuits underlying anxiety. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(112):1-6.

American Psychiatry Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5*. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association.

Andreatini, R., et al. (2001) Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: future perspectives . *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 23(4):233-242.

Araújo, A. C., Neto, F. N. (2014) The new north american classification of Mental Disorders - DSM-5. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 16 (1): 67-82.

Azcoitia, I. et al. (2011) Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience*, 191:139-147.

Azcoitia, I. et al. (2017) Neural-derived estradiol regulates brain plasticity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. <http://dxdoi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.04.004>

Baghai, T.C., et al. (2005) Plasma concentrations of neuroactive steroids before and after electroconvulsive therapy in major depression. *Neuropsychopharmacology* 30(6):1181–1186.

Barker, J.M., Galea, L.M.A. (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.

Bastos, C. P. et al. (2015) Object recognition memory deficit and depressive-like behavior caused by chronic ovariectomy can be transitorially recovered by the acute activation of hippocampal estrogen receptors. *Psychoneuroendocrinology*, 57:14-25.

Belelli D., Lambert J. L. (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA (A) receptor. *Nature Reviews Neuroscience*, 6:565–575.

Bayers, J., et al. (2014) Menstrual-cycle dependent fluctuations in ovarian hormones affect emotional memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 110:55–63.

Björntröm, L., Sjöberg, J., & M. (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 19(4):833–842.

Bodnoff, S. R. et al. (1989) A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 97 (2): 277–279.

Borsini, F., Podhorna, J. & Marazziti, D. (2002) Do animal models of anxiety predict anxiolytic like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*, 163:121–141.

Borwin, B., Michaelis, S. (2015) Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3): 327-335.

Brambilla, F., et al. (2003). Neurosteroid secretion in panic disorder. *Psychiatry Research*, 118 (2):107–116.

Branchi, I., et al. (2002) Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *NeuroToxicology*, 23: 375–384.

Brinton, R. D. et al (2008) Progesterone receptors: Form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29: 313-339.

Broberger, C. et al, (1998). Hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *Journal of Comparative Neurology*, 402(4):460-474.

Bromberger, J. T., et al. (2013) Does risk for anxiety increase during the menopausal transition? Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Menopause*, 20 (5):488-495.

Brown T. J., Clark A. S., MacLusky N. J. (1987) Regional sex differences in progesterin receptor induction in the rat hypothalamus: effects of various doses of estradiol benzoate. *Journal of Neuroscience*, 7:2529–2536.

Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I. & Quirk, G.J. (2009) Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *Journal of Neuroscience*, 29:8474–8482.

Cagnacci, A. et al. (1999) Effect of long-term local or systemic hormone replacement therapy on post-menopausal mood disturbances. Influences of socio-economic and personality factors. *Mauritas*, 21: 111-116.

Calhoun, G., Tye, K. M. (2015) Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience*, 18:1394- 1404.

Carrive, P. (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2):27-47.

Casarotto, P. C., et al. (2011) Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behavioural Pharmacology*, 23:80-88.

Chakraborty, T.R., Gore, A.C. (2004) Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine*, 229:977–987.

Chaves, G., et al., (2009). Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. *Physiology & Behavior* 97: 420–425.

Christian, C. A.; Moenter, S. M. (2010) The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin- releasing hormone surges. *Endocrine Reviews*, 31 (4):554-577.

Cole, J. C., Rodgers, R. J. (1995). Ethological Comparison of the Effects Diazepam and Acute/Chronic Imipramine on the Behaviour of Mice in the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (3):473-478.

Crawley, J. N.; Goodwin, F. K. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13:67-170.

Cryan, J.F. & Holmes, A. (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4:775–790.

Cui, J., et. al. (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*. 3(19): 197-209.

Cullinan, W.E., Herman, J.P. & Watson, S.J. (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology*, 332:1–20.

Dalal, P. K., Agarwal, M. (2015) Postmenopausal syndrome . *Indian Journal of Psychiatry*. 57: 222 -232.

Davison, S.L., et al. (2005) Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90:3847–3853.

Degroot, A. & Treit, D. (2004) Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Research*, 1001:60–71.

Dong, H.W., Petrovich, G.D. & Swanson, L.W. (2001) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Research Reviews* 38:192–246.

Dulawa, S.C., Holick, K.A., Gundersen, B. & Hen, R. (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29:1321–1330.

Duvarci, S. & Pare, D. (2014) Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82:966–980.

Duval, E. R., et al. (2015) Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 11: 115–126.

Duvarci, S. & Pare, D. (2014) Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82:966–980.

Edwards H. E., et al. (2001) Progesterin receptors mediate progesterone suppression of epileptiform activity in tetanized hippocampal slices in vitro. *Neuroscience*, 101:895–906.

Felix-Ortiz, A.C. et al. (2013) BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, 79:658–664.

File, S.E. (1985) Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behaviour. *Neuropsychobiology*, 13:55–62.

Flores A, Maldonado R, Berrendero F (2013). Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Frontiers in Neuroscience*, 7: 256. doi.org/10.3389/fnins.2013.00256

Fonseca C. S. et al. (2013) Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101:19-25.

Galea, L.M.A., et al. (2013) Sex, Hormones and Neurogenesis in the Hippocampus: Hormonal Modulation of Neurogenesis and Potential Functional Implications. *Journal of Neuroendocrinology* 25:1039-1061.

Graham, J. D., Clarke, C. L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18(4): 502-519.

Grace, A. A. & Rosenkranz, J.A. (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiology & Behavior* , 7: 489–493.

Graeff F.G., et al. (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2):123-131.

Graeff F.G. (2007) Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 29(1):3-6.

Greene-Schloesser, D. M. et al. (2011) Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior. *Behavioural Brain Research*, 1(221):55–62.

Guimarães, R. A. M., et al. (2015) Spontaneous failure of the estrous cycle induces anxiogenic-related behaviors in middle-aged female mice. *Physiology & Behavior*, 147:319-323.

Hall, C. & Ballachey, E.L. (1932) A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. University of California publications in psychology, 6: 1-12.

Hamstra, D. A., et al. (2016). Mineralocorticoid receptor haplotype moderates the effects of oral contraceptives and menstrual cycle on emotional information processing. *Journal of Psychopharmacology*, 10:1054–1061.

Hamstra, D. A., et al. (2017) Mineralocorticoid receptor haplotype, estradiol, progesterone and emotional information processing. *Psychoneuroendocrinology* 76:162-173.

Hart S. A., Patton J. D., Woolley C. S. (2001) Quantitative analysis of ER α and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rat. *Journal of Comparative Neurology*, 440:144–155.

Havelock, J.C., et al. (2006) The post-menopausal ovary displays a unique pattern of steroidogenic enzyme expression. *Human Reproduction*, 21:309–317.

Henry, B., Vale, W. & Markou, A. (2006) The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *Journal of Neuroscience*. 26:9142–9152.

Heydari, B., Le Melleo, J.M. (2002) Low pregnenolone sulphate plasma concentrations in patients with generalized social phobia. *Psychological Medicine*, 32 (5):929–933.

Hill, M., et al. (2016) Circulating C19 steroids and progesterone metabolites in women with acute depression and anxiety disorders. *Hormone Molecular Biology*, 26(3):153-164.

Hoyer, P.B., Sipes, I.G. (1996) Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36:307–331.

Hoyer, P.B., et al(2001) Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic Pathology*, 29:91–99

Hübner, C., Bosch, D., Gall, A., Lüthi, A. & Ehrlich, I. (2014) *Ex vivo* dissection of optogenetically activated mPFC and hippocampal inputs to neurons in the basolateral amygdala: implications for fear and emotional memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8:64. doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00064

Janak, P.H. & Tye, K.M. (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517:284–292.

Janowsky D.S., Halbreich U., Rausch J (1996) Association among ovarian hormones, other hormones, emotional disorders, and neurotransmitters. In *Psychopharmacology and Women: Sex, Gender, and Hormones* (Jensvold M.F., Halbreich U., Hamilton J.A. eds.). Washington, DC, American Psychiatric Association, pp.85-106.

Jennings, J. H., et al.(2013a). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* , 341:1517–1521.

Jennings, J. H., et al. (2013b). Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature*, 496:224–228.

Kawata M. (1995) Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neuroscience Research*, 24:1–46.

Kempen, T. A., et al. (2011) Accelerated ovarian failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Research*. 1379: 176-187.

Keri M. S., et al., Ventral tegmental area muscarinic receptors modulate depression and anxiety-related behaviors in rats., *Neuroscience Letters* <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.057>

Kheirbek, M.A. et al. (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, 77:955–968.

Kim, M. J., et al. (2011) The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Brain Research Reviews*, 223:403–410.

Kim M. S., Rossi M., Abusnana S., Sunter D., Morgan D.G., Small C. J., et al. (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*. 49(2):177-182.

Kroenke, K. et al. (2007) Anxiety Disorders in Primary Care: Prevalence, Impairment. *Annals of Internal Medicine*, 146(5):317-326.

Krusemark, E. A., et al. (2013) When the Sense of Smell Meets Emotion: Anxiety-State-Dependent Olfactory Processing and Neural Circuitry Adaptation. *The Journal of Neuroscience* 33(39):15324 –15332.

Lagunas, N. et al. (2010) Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Hormones and Behavior*, 58 :786-791.

Lakshmi N., et al. (2010) The Pharmacologic Treatment of Anxiety Disorders: A Review of Progress. *Journal of Clinical Psychiatry*, 71(7):839-854.

Lambert J.J., et al. (1995) Neurosteroids and GAGAA receptor function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16:295–303.

Laughlin, G.A., et al. (2000). Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85:645–651.

Legradi G., Lechan, R. M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 140(8):3643-3652.

Lesson, L. A.; Mahesh, V. B.. Stimulatory and Inhibitory effects of the progesterone on FSH secretion by the anterior pituitary. *Steroid Biochemical Molecular Biology*, 42 (5) :479-491.

Leavitt W. W., Cobb A. D., Takeda A. (1987) Progesterone-modulation of estrogen action: rapid down regulation of nuclear acceptor sites for the estrogen receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 230:49–78.

Li C., et al. (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 101:2185–2190.

Li J., Hu Z., de Lecea L. (2014). The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *British Journal of Pharmacology*, 171 (2): 332–50.

Llaneza , Frye (2009). Progestogens and estrogen influence impulsive burying and avoidant freezing behavior of naturally cycling and ovariectomized rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 93 : 337–342.

Longone, P. et al. (2008) The complex roles of neurosteroids in depression and anxiety disorders. *Neurochemistry International*, 52:596-601.

Lorenzini A., C., Bucherelli, C. & Giachetti, A. (1984) Passive and active avoidance behavior in the light-dark box test. *Physiology & Behavior* , 32:687–689.

Lorenzi, D. R. S. et.al. (2006) Fatores associados à qualidade de vida após menopausa. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 5(52):312-317.

Lohff, J.C., et al. (2005) Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. *Comparative Medicine*, 55:523–527.

Maclusky N. J., et al. (2005) The 17 α and 17 β isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology*, 146:287–293.

Maeng, L. Y., Milad, M. R. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and Behavior*, 76:106-117.

Maffucci, J.A., Gore, A.C. (2006) Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. In: Conn, M.P. (Ed.), *Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press and Elsevier, San Diego, 533–552.

Majewska M. D., et al. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232:1004–1007.

Malacara, J. M. et al. (2004) The relationship of estrogen receptor- α polymorphism with symptoms and other characteristics in post-menopausal women. *Mauritas*, 49: 163-169.

Markram, H. et al. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, 5:793–807.

Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C. & Motanis, H. (2012) Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLOS ONE*, 7, e35853.

Marriott L. K., Korol D. L. (2003) Short-term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal acetylcholine release during place learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80:315–322.

Martin N. M., Smith K. L., Bloom S. R., Small C. J. (2006). Interactions between the melanocortin system and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Peptides*, 27(2):333-339.

McDonald, A.J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55:257–332.

Mellon S. H. (1994) Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78:1003–1008.

Merali, Z., Levac, C. & Anisman, H. (2003) Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. *Biological Psychiatry*, 54:552–565.

Micevych P., Sinchak K.(2008) Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 13;290(1-2):44-50.

- Milad, M. R. & Quirk, G. J. (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 420:70–74.
- Mori, M., Abegg, M.H., Gähwiler, B.H. & Gerber, U. (2004) A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature*, 431:453–456.
- Namburi, P. et al. (2015) A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520:675–678.
- Nascimento, J. O. G., et al. (2010) Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43(9):869-873.
- Nicolas, L.B., Kolb, Y. & Prinssen, E.P.M. (2006) A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, 547:106–115.
- Nieh, E.H. et al. (2015) Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell*, 160:528–541.
- Njung'e, K. & Handley, S.L. (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38:63–67.
- Ochsner, K.N., Bunge, S.A., Gross, J.J. & Gabrieli, J.D.E. (2002) Rethinking feelings: an fMRI study of the cognitive regulation of emotion. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 14:1215–1229.
- Padberg, F., et al. (2002) Plasma concentrations of neuroactive steroids before and after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in major depression. *Neuropsychopharmacology* 27(5):874–878.
- Parkening, T. A., et al. (1982) Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiology of aging*, 3(1):31–35.
- Pearlstein, T. et al. (1997) Mood disorders and menopause. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26(2):279-294.
- Pellow, S., et al. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14:149–167.

Peng W., et al. (2000). Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety. *Journal of Ethnopharmacology* 72:435–441.

Picazo, O. et al. (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.

Pinna, G. et al. (2006) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology*, 186 (3):362–372.

Polisseni, A. F., et al. (2009) Depressão e ansiedade em mulheres climatéricas: fatores associados. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 31(1): 28-34.

Pozzo-Miller L. D., Inoue T., Murphy D. D. (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 81:1404–1411.

Prut, L., Belzung, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugson anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463:3–33.

Pultrini, A. M. et al. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78:1720 – 1725.

Qu D., et al. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(6571):243-247.

Renó, J.J. (2004) Transtornos depressivos da mulher no climatério. *Revista Brasileira de Medicina*, p.199-124.

Rhodes M. E., Harney JP., Frye C. A. (2004) Gonadal, adrenal, and neuroactive steroids' role in ictal activity. *Brain Research*, 1000:8–18.

Rickels, K. et al. (1993) Antidepressants for the Treatment of Generalized Anxiety Disorder. A Placebo-Controlled Comparison of Imipramine, Trazodone, and Diazepam. *Archives of General Psychiatry*, 50(11):884-895. doi:10.1001/archpsyc.1993.01820230054005

Risold, P.Y. & Swanson, L.W. (1996) Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*, 272:1484–1486.

Risold, P.Y. & Swanson, L.W. (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Research Reviews*, 24:115–195.

Rocca, W.A., et al. (2011) Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: clinical evidence for a window of opportunity. *Brain Research*, 1379:188–198.

Rudick C. N., Woolley C. S. (2001) Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat. *Journal of Neuroscience*, 21:6532–6543.

Rupprecht R., Holsboer F. (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22: 410–416.

Sagsöz, N. et al. (2001) Anxiety and depression before and after the menopause. *Archives Gynecology Obstetrics*, 264: 199-202.

Sakurai T., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4):573-85.

Scarpim, K. M., et al. (2009) Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear Receptor Signaling*, 7:1-13.

Scharfman, H. E., MacLusky, N. J. (2014) Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. *Neurobiology of Disease*, 72:180-192.

Schmidt P. J. , Rubinow D. R. (1991) Menopause-related affective disorders: A justification for further study. *The American Journal of Psychiatry*, 148:844-852.

Schmidt, P.J., Rubinow, D.R. (2009) Sex hormones and mood in the perimenopause. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179:70–85.

Schulz K.F., Grimes D. A. (2005) Sample size calculations in randomised trials: mandatory and mystical. *Lancet*. 365:1348-1353.

Segal M., Murphy D. (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Hormones and Behavior*, 40:156–159.

Semeniuk, T., et al. (2001). Neuroactive steroid levels in patients with generalized anxiety disorder. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 13(3):396–398.

Senn, V. et al. (2014) Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron*, 81:428–437.

Sévoz-Couche C., et al. (2013) Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *Journal of Physiology*, 591(7):1871-1887.

Sherwin, B. (1996) Hormones, mood, and cognitive functioning in postmenopausal women. *Obstetrics & Gynecology*. 82(2):20-26.

Snedecor G.W., Cochran W.G. (1967) *Statistical methods*. 6th ed. Iowa: Iowa State University Press, p. 505.

Sophocleous, A., Idris, A. (2014) Rodent models of osteoporosis. *BoneKEy Reports*. 3 (614):1-9.

Stanley B. G., Chin A. S., Leibowitz, S. F. (1985). Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Research Bulletin*, 14(6):521-524.

Sparta, D.R. et al. (2014) Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8,129. doi.org.ololo.sci-hub.cc/10.3389/fnbeh.2014.00

Steel, R. G .D., Torrie J.H. (1980) *Principles and procedures of statistics*. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill.

Suzuki, S. et al. (2016) The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. *Behavioural Brain Research* ,304:120–124.

Takashi Yamamoto, T. et al. (2009) Functional Organization of the Rodent Parabrachial Nucleus. *International Symposium on Olfaction and Taste: Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170: 378–382.

Tovote, P. et al. (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16: 317 – 331.

Treit D., et al. (1981) Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 15(4):619–626.

Trent, N.L. & Menard, J.L. (2010) The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats' open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior* , 101:141–152.

Tye, K., et al. (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471:358-362.

Tye, K. M. & Deisseroth, K. (2012) Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 13:251–266.

Uzunova, V., et al. (1998) Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6):3239–3244.

Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M. & Witter, M.P. (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*. 10:272–282.

Wade, G. N., Gray, J. M. (1979). Gonadal Effects on Food Intake and Adiposity: A Metabolic Hypothesis. *Physiology & Behavior*, 22: 583-593.

Walf, A., Frye C. A. (2010) Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiology & Behavior*, 99: 196-174.

Walf, A., Paris, J. J., Frye, C. A. (2009a). Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 909—916.

Walf, A., Paris, J. J., Frye, C. A. (2009b). Nociceptive and Anxiety-Like Behavior in Reproductively Competent and Reproductively Senescent Middle-Aged Rats. *Gender Medicine*, 6:235-246.

Weiland N. G. (1992) Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. *Endocrinology*, 131:2697–2702.

Wendy A. Koss, Donald R. Gehlert, Anantha Shekhar (2004). Different effects of subchronic doses of 17-h estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Hormones and Behavior* 46:158 – 164.

Wiek, A. (1996) Ovarian hormones, mood and neurotransmitters. *International Review of Psychiatry*, 8(1):17-25.

Williams, J.K. (2005) A mouse model of the perimenopausal transition: importance for cardiovascular research. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25:1765–1766.

Yadav A. V., LA Kawale L. A., VS Nade V. S. (2008). Effect of *Morus alba* L. (mulberry) leaves on anxiety in mice. *Indian Journal of Pharmacology* , 40(1):32-36.

Zamani M. R., Levy W. B., Desmond N. L. (1999) Estradiol increases delayed, N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience*, 129:243–254.

Zenclussen, M. L.; et al. (2014) Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in Endocrinology*. 5(32):1-6.

Zhang, et al. (2016) Postpartum estrogen withdrawal impairs hippocampal neurogenesis and causes depression- and anxiety-like behaviors in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 66: 138–149.

Anexo I

Aprovação da Comissão de Ética

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 392 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Desvendando as bases neurais da ansiedade na menopausa”, que tem como responsável Grace Schenatto Pereira Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 392 / 2015, related to the Project entitled “Unraveling the neural basis of anxiety in menopause”, under the supervision of Grace Schenatto Pereira Moraes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificates expires in 09/12/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 09/12/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br