

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas: Departamento de Fisiologia e Farmacologia

CRISTIANE PERÁCIO BASTOS

**EFEITOS DO ESTRADIOL NA MEMÓRIA E COMPORTAMENTOS
AFETIVOS CAUSADOS PELA PRIVAÇÃO DE HORMÔNIOS OVARIANOS**

BELO HORIZONTE

2015

CRISTIANE PERÁCIO BASTOS

**EFEITOS DO ESTRADIOL NA MEMÓRIA E COMPORTAMENTOS
AFETIVOS CAUSADOS PELA PRIVAÇÃO DE HORMÔNIOS OVARIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Neurofisiologia

Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes

BELO HORIZONTE

2015

“A maioria dos vertebrados acasalam-se somente em períodos de máxima fertilidade das fêmeas, ao contrário dos humanos pois estes comem quando não tem fome, bebem quando não tem sede e fazem amor em todas as estações do ano”

(Livro Fisiologia Médica Essencial)

Dedico este trabalho ao meus queridos pais e irmão,

Vinícius,

familiares e amigos.

Agradecimentos

Agradeço, a DEUS, sua presença em minha vida todos os dias, em todas as horas e em tudo que eu almejo fazer e faço. Agradeço-lhe, Senhor, ter-me dado a força espiritual necessária para continuar a cada novo desafio, por dar-me prudência para lidar com as conquistas, e esperança nos momentos de tristezas e incertezas. Fui em busca de algo que antes parecia distante do meu alcance e, hoje, por sua misericórdia, concluo esta importante etapa. Tornei-me mais forte espiritualmente do que quando comecei. Minha fé foi renovada e nossa relação fortificada! De modo especial, o meu coração ser-lhe-á eternamente grato por ter me dado coragem para encarar o desafio de viver no Alasca; por esta maravilhosa oportunidade profissional e experiência de vida!

Esta conquista somente foi possível porque, nesta caminhada, encontrei alguém que acreditou em mim e se dispôs a me capacitar. Assim, agradeço, de modo muito especial, à professora e minha orientadora Grace, por confiar este trabalho em minhas mãos e por estimular habilidades em mim que eram, até então, desconhecidas. Quando cheguei ao NNC, a você – Grace - eu não tinha muito a oferecer. Somente a minha força de vontade para aprender. E você, soube conduzir, de uma maneira muita sábia, o meu aprendizado, estimulando-me e exigindo o melhor de mim, até nas pequenas coisas.

Agradeço especialmente aos meus pais – José Eustáquio Bastos, e Marília dos Santos Perácio Bastos – e ao meu irmão Júlio César Perácio Bastos: vocês são o alicerce da minha vida, e sem vocês eu não teria chegado tão longe! Obrigada pelo incentivo e carinho e por terem vivenciado esta experiência do doutorado comigo; por suportarem e entenderem, com amor, as minhas escolhas, em especial, durante o ano que estive no doutorado sanduíche. Sei que lhes expus a um sofrimento jamais imaginado com essa distância, mas a fé em Deus sempre nos manteve unidos para superarmos este desafio, que era meu e se estendeu a vocês.

Agradeço a Vinícius, meu companheiro de jornada, em quem encontrei o carinho e o amor necessários para me acalantar, o pulso firme nos momentos de fraqueza e o companheirismo para aceitar as minhas decisões, mesmo com o coração apertado. Sei que não foi fácil para você suportar minhas tantas ausências, mas conseguimos, juntos, conquistar esta vitória!

Aos professores do NNC (Núcleo de Neurociências), Prof. André, Prof. Márcio, Profa. Juliana e Prof. Bruno, agradeço a convivência e os ensinamentos, tanto nas discussões dos nossos seminários quanto nas agradáveis aulas das disciplinas de Neurofisiologia I e II.

Ao professor Abel Buil-Ito, a orientação e os ensinamentos durante o período do doutorado sanduíche na Universidade do Alasca de Fairbanks (UAF) e, em especial, agradeço o acolhimento no laboratório de Neurociência Comportamental e Evolutiva.

Aos professores do departamento, Prof. Rafael, Profa. Maristela e Prof. Fabrício, agradeço as valiosas contribuições ao trabalho durante o exame de qualificação.

Aos demais professores do departamento de Fisiologia e Biofísica agradeço conhecimento compartilhado durante as aulas.

Agradeço à minha motivadora família (tios, primos, madrinha, padrinho, sogros e cunhadas), aos meus vizinhos, e aos meus ex-pacientes, que sempre me colocam em suas orações e celebram comigo cada vitória que conquisto.

Às minhas tias Floriza e Evelize, que com amor e alegria me acolheram em suas residências, em vários momentos em que precisei durante este período, agradeço com ternura.

À tia Eliana e ao primo Daniel, agradeço a correção ortográfica.

Aos meus queridos amigos de anos, que sempre estão comigo e torcem por mim, e àqueles “novos” amigos que aqui conquistei: obrigada a todos vocês pelas palavras de estímulo, pelos momentos de descontração (em família, no sítio do sogro, após os experimentos darem errado) e pela troca de experiências. Serei eternamente grata a Deus por ter vocês em minha vida.

Eu não poderia deixar de agradecer aos meus amigos e familiares que, de maneira especial, me fizeram companhia pela internet, durante as madrugadas no Brasil. Obrigada por não me deixarem deprimir com a solidão e a escuridão.

Agradeço, em especial, à amiga Talita, pelo estímulo constante ao longo desta minha caminhada e por sua presença tão brilhante pelo Skype, quando eu, desesperadamente precisava dela!

Agradeço à amiga de experimentos, Luciana, o empenho com nosso trabalho, e os momentos de alegria para aliviar nossa tensão.

Aos amigos do NNC e do ICB, Onésia, Hércules, Vinícius, Hyorrana, Marina, Flávio, Daniel, Gabriel, Lock, Natália, Laura, Sasha, Thomás, as Anas (Flávia, Carolina, Luiza, Raquel), as Lorenas, Léo, Simões, Henrique, Gabriela, André, Sara, Luana, Rosária, Aryadina, Isabela, sou grata pelo companheirismo no ambiente de trabalho (NNC) e na universidade.

Aos queridos amigos que fiz no Alasca, que tornaram esta experiência mais suave e alegre... Swarup, Malabika, Saurav, Julie, Evgeniia, Josephine, agradeço a convivência no laboratório, no campus da UAF e por terem apresentado o Alasca a mim! Agradeço, também, às brasileiras que lá conheci, Marinete e Léa, que sempre me levavam um pouquinho do Brasil.

Ao coordenador da pós-graduação, Prof. Christopher, e aos secretários Cíntia, Rodner e Nilda, agradeço o eficiente trabalho e a prontidão para nos ajudar.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG agradeço o suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. De maneira especial, à CAPES, agradeço o financiamento do doutorado sanduíche nos EUA.

Às alunas Suellen (in memoriam) e Cristina, que juntamente com a Prof. Grace, iniciaram a linha de pesquisa em “Influência dos hormônios ovarianos na memória”, possibilitando, assim, os primeiros passos para este trabalho.

Sumário

1. Introdução	20
1.1 Estrogênios.....	20
1.2 Memória	25
1.3 Classificação das memórias	26
1.3.1 Quanto ao tempo de duração	26
1.3.2 Quanto ao conteúdo	26
1.4 Memórias declarativas	27
1.5 Memória de reconhecimento de objeto novo e substratos neurais	28
1.6 Memória de condicionamento ao medo e substratos neurais	31
1.7 Influência dos estrogênios nas funções cognitiva e afetiva	34
1.8 Transtorno obsessivo-compulsivo (TOC)	38
 <i>Capítulo I</i>	
2. Justificativa	41
3. Objetivos	42
3.1 Geral	42
3.1 Específicos (<i>Tópicos 1 e 2</i>).....	43
4. Materiais e Métodos	44
4.1 Animais experimentais	44
4.2 Cirurgias	44
4.2.1 Ovariectomia (OVX)	44
4.2.2 Esterotaxia	45
4.3 Histologia	46
4.4 Tarefas comportamentais	46
4.4.1 Reconhecimento do objeto novo (RON)	46

4.4.2 Condicionamento ao medo	47
4.4.3 Suspensão de cauda.....	48
4.4.4 Nado forçado.....	48
4.4.5 Enterrar bolinhas na maravalhas	49
4.4.6 Preferência pela sacarose	49
4.4.7Atividade locomotora	50
4.4.8 Labirinto em cruz elevado	50
4.5 Drogas	50
4.6 Tratamentos farmacológicos	51
4.6.1 Intra-hipocampo e intra-amígdala	51
4.6.2 Intra-peritoneal	52
4.7 Imunohistoquímica	52
4.8 Western Blot	53
4.9 Ressonância magnética estrutural	54
4.10 Análises das imagens	55
4.11 Delineamento experimental	56
4.12 Análise estatística	62
5. Resultados (<i>Tópicos 1 e 2</i>).....	64
 <i>Capítulo II</i>	
6. Justificativa	86
7. Objetivos	87
7.1 Geral	87
7.1 Específicos	87
8. Materiais e Métodos	88
8.1 Animais experimentais	88
8.2 Ovariectomia (OVX)	88

8.3 Tarefas comportamentais	89
8.3.1 Construir ninhos	89
8.3.2 Enterrar bolinhas na maravalhas	89
8.3.3 Campo aberto	90
8.3.4 Reconhecimento do objeto novo (RON)	90
8.4 Dosagem de 17 β estradiol, progesterone e BDNF (ELISA)	91
8.5 Administração de estradiol	92
8.6 Delineamento experimental	92
8.7 Análise estatística	94
9. Resultados	95
10. Discussão	102
11. Conclusão	111
11. Referências Bibliográficas	112

Anexos

Anexo 1	126
Anexo 2	127
Anexo 3	128

Figuras

Figura 1	Biossíntese dos hormônios ovarianos	22
Figura 2	Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização dos receptores de estrogênio	23
Figura 3	Classificação das memórias	27
Figura 4	Regiões do sistema nervoso central envolvidas no processamento da memória do tipo declarativa	29
Figura 5	Interações entre as estruturas do lobo temporal medial envolvidas no processamento da memória de RON.....	30
Figura 6	Desenho esquemático do condicionamento clássico	32
Figura 7	Circuitos neurais envolvidos na resposta de condicionamento ao medo.....	34
Figura 8	Ilustração das áreas delimitadas para as análises de imunohistoquímica.....	56
Figura 9	Delineamento do experimento 1 (<i>Tópico 1</i>)	57
Figura 10	Delineamento dos experimentos 2 e 3	58
Figura 11	Delineamento do experimento 4	59
Figura 12	Delineamento dos experimentos 1 e 2 (<i>Tópico 2</i>).....	60
Figura 13	Delineamento do experimento 3	61
Figura 14	Delineamento do experimento 4	62
Figura 15	Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na tarefa de RON e eficácia de 12 semanas de OVX na função reprodutiva	66
Figura 16	Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX no comportamento do tipo-depressivo, do tipo-compulsivo e anedonia	68
Figura 17	Efeito de 12 semanas de OVX no volume do hipocampo	69
Figura 18	Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na expressão protéica de ER α e ER β no hipocampo	70
Figura 19	Efeito do E ₂ , PPT, DPN e TPBM na memória de RON	72
Figura 20	Efeito do E ₂ , PPT, DPN no comportamento do tipo-depressivo	73
Figura 21	Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na memória de condicionamento ao medo	74
Figura 22	Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na locomoção e no comportamento do tipo-ansiedade	76
Figura 23	Efeito de 12 semanas de OVX na memória de condicionamento ao medo em animais não condicionados e condicionados	77

Figura 24	Desenho esquemático das áreas consideradas para quantificação de c-Fos pós-condicionamento pelo som	77
Figura 25	Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo lateral (LA) da amígdala	78
Figura 26	Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo basolateral (BLA) da amígdala	79
Figura 27	Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação da porção central do núcleo lateral (CEL) da amígdala	80
Figura 28	Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação da porção medial do núcleo central (CEM) da amígdala	81
Figura 29	Efeito da administração de E ₂ na memória de condicionamento ao medo e no comportamento do tipo-ansiedade	83
Figura 30	Delineamento dos experimentos 1 e 2 (<i>Capítulo 2</i>).....	93
Figura 31	Delineamento do experimento 3	94
Figura 32	Efeito de 10 dias de ovariectomia no comportamento do tipo-compulsivo.....	96
Figura 33	Efeito de 10 dias de OVX nos comportamentos do tipo-ansiedade e na memória de RON	97
Figura 34	Concentração sérica dos hormônios ovarianos após 10 dias de OVX	98
Figura 35	Concentrações hipocâmpais de BDNF após 10 dias de OVX	99
Figura 36	Efeito da administração de 17 β -Estradiol no comportamento do tipo-compulsivo, do tipo-ansiedade e na memória de RON	101

Tabelas

Tabela 1	Distribuição do ER α e ER β em tecidos periféricos	24
Tabela 2	Distribuição do ER α e ER β no sistema nervoso central	25
Tabela 3	Tempo de exploração nos objetos até atingir 30s de investigação na tarefa de RON	64
Tabela 4	Representação esquemática dos resultados dos tópicos 1 e 2	84

Abreviaturas

17βHSD	17 β hidroxisteroide deidrogenase
5-HT	Receptor de serotonina 5-hydroxitriptamina
ANOVA	Análise de variância
AP	Ântero-posterior
BA	Núcleo basal da amígdala
BDNF	<i>(Brain-derived neurotrophic factor)</i> Fator neurotrófico derivado do nervo
BIG nest builders	Linhagem de animais que constroem grandes ninhos
BiRD	<i>(Biological Research and Diagnostics Facility)</i> Centro de pesquisa e diagnóstico biológico
BLA	Núcleo basolateral da amígdala
BM	Núcleo basomedial da amígdala
c-Fos	Gene de expressão imediata c-Fos
CA1	Região CA1 do hipocampo
CA2	Região CA2 do hipocampo
CA3	Região CA3 do hipocampo
CEBIO	Centro de bioterismo
CEL	Porção lateral do núcleo central da amígdala
CEM	Porção medial do núcleo central da amígdala
cm	Centímetro
CS	<i>(Conditioned stimulus)</i> Estímulo condicionado
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPN	Agonista do receptor β de estrogênio (2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile)
DV	Dorso-ventral

E1	Estrona
E₂, 17β estradiol	Estradiol
E3	Estriol
EDTA	Ácido etilenodiamínico tetra-acético
ELISA	<i>(Enzyme-linked immunosorbent assay)</i> Ensaio enzimático imunoabsorvente
EP	Erro padrão
ER	<i>(Estrogen receptor)</i> receptor de estrogênio
ERK	<i>(Extracellular Signal Regulated Protein)</i> Proteína reguladora de sinal extracelular
ERα, ERS1	Receptor de estrogênio alfa
ERβ, ERS2	Receptor de estrogênio beta
FSH	<i>(Follicle-stimulating hormone)</i> Hormônio folículo-estimulante
G	Gauge
GF	Fatores de crescimento
GnRH	<i>(Gonadotropin-releasing hormone)</i> Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HRP	<i>(Horseradish peroxidase)</i> (Peroxidase de raiz forte ou rabanete)
i.h.	Intra-hipocampal
i.p.	Intra-peritoneal
IR	Índice de reconhecimento
Kg	Kilograma
KHz	Kilohertz
LA	Núcleo lateral da amígdala
LH	<i>(Luteinizing hormone)</i> Hormônio luteinizante
LL	Látero-lateral
LTP	<i>(Long term potentiation)</i> Potenciação de longa duração

M	Molar
MCD	Memória de curta duração
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
MLD	Memória de longa duração
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
mRNA	RNA (ácido ribonucléico) mensageiro
MT	Memória de trabalho
N	Nanomolar
NaCL	Cloreto de sódio
NaN₃	Azida de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NGS	<i>(Normal goat serum)</i> Soro de cabra normal
°C	Graus Celsius
OVX	Ovariectomia
P450	Citocromo P450
PAG	<i>(Periaqueductal gray)</i> Substância cinzenta periaquedutal
PBS	Tampão fosfato-salino
PE20	Tubo de polipropileno tamanho 20
PFA	Paraformaldeído
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogênio

PPT	Agonista do receptor α de estrogênio (4,4',4''-[4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl]tris-phenol)
PVN	<i>(Paraventricular nucleus of hypothalamus)</i> Núcleo paraventricular do hipotálamo
PVPI	Polivinilpirrolidona-iodo
RIPA	Tampão de RIPA
RME	Ressonância magnética estrutural
RON	Tarefa de reconhecimento de objeto novo
T	Tesla
TBS	Tampão tris fosfato
TE	Tempo de eco
Te2	Área Te2 do córtex de associação visual
TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
TPBM	Antagonista do receptor α de estrogênio (theophylline, 8 [(benzylthio)methyl]- (7Cl,8Cl)
TR	Tempo de repetição
TH	Terapia hormonal
US	<i>(Unconditioned stimulus)</i> Estímulo incondicionado
VMHVL	Porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

Resumo

Déficits cognitivos e desordens afetivas que ocorrem durante o processo da menopausa comprometem a qualidade de vida das mulheres e refletem um prejuízo no funcionamento do encéfalo em decorrência da diminuição de estrogênios. A principal motivação do presente estudo foi a busca pelas alterações moleculares e funcionais que ocorrem no cérebro de fêmeas submetidas à privação de hormônios ovarianos, bem como o efeito da administração aguda de estradiol (E_2) nestas alterações. Utilizamos como modelo de privação hormonal em camundongos, a ovariectomia (OVX). As análises comportamentais demonstraram que o período de 12 semanas de OVX (12 OVX) foi o de maior prejuízo cognitivo e afetivo. A OVX alterou a expressão dos receptores de estrogênios (ERs) no hipocampo (HIP), além de alterar o padrão de expressão de c-Fos da AMI em resposta ao condicionamento ao medo. Já num modelo genético de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) em camundongos, a OVX aumentou ainda mais os comportamentos compulsivos e do tipo-ansiedade, embora não tenha piorado o déficit de memória destas fêmeas. Em contrapartida, a administração de estradiol (E_2) recuperou os déficits encontrados nas fêmeas com TOC. Já nas fêmeas 12 OVX, o E_2 , bem como agonistas e antagonistas de ERs foram efetivos em diminuir os comportamentos depressivos e o déficit de memória HIP-dependente, mas não a ansiedade ou o déficit de memória de medo condicionado ao som, considerado AMI-dependente. Em conjunto, nossos resultados corroboram a hipótese de que a diminuição prolongada de hormônios ovarianos é capaz de alterar em nível molecular e funcional o cérebro de camundongos fêmeas, além de piorar o quadro de transtorno comportamental observado em fêmeas modelo para TOC. Além disso, demonstramos que o E_2 , mesmo de maneira aguda, é capaz de amenizar boa parte dos prejuízos cognitivos e mnemônicos avaliados, embora seu efeito tenha sido mais expressivo em funções HIP-dependentes. Por fim, um grande achado do nosso estudo foi a sugestão de que a OVX a longo prazo altera a excitabilidade do complexo amigdalóide de maneira a comprometer memórias AMI-dependentes.

Palavras-chave: estradiol (E_2), ovariectomia (OVX), reconhecimento do objeto novo, condicionamento ao medo, desordens afetivas, hipocampo, complexo amigdalóide.

Abstract

Cognitive and affective disorders occurred during the menopause impact woman's quality of life and reflect impairments in brain function caused by the estrogens decline. The aim of the present study was to investigate the molecular and functional alterations in the brain of female mice that underwent to hormone deprivation. We also investigated the acute affect of estradiol (E₂) in these alterations. Ovariectomy (OVX) surgery was used as a model to induce hormonal depletion in mice. Behavioral analyses demonstrated that 12 weeks of OVX is a critical time-point to observe cognitive and affective impairments. OVX changed the expression of estrogen receptors (ERs) in the hippocampus (HIP) and also modified the c-Fos expression in the amygdala (AMY) after cued fear conditioning. Furthermore, in a genetic mice model for obsessive-compulsive disorder (OCD), the OVX worsened the compulsive- and anxiety-like behaviors, although did not change the memory deficit already founded. On the other hand, the estradiol (E₂) administration recovered the impairments observed in OCD female mice model. After 12 weeks of OVX, the administration of E₂ and agonists of ERs were effective in decreasing the depressive-like behavior, the HIP-dependent memory deficit. However, E₂ was ineffective to rescue the anxiety-like behavior and cued fear memory impairment caused by OVX. Together, our results support the hypothesis that long-term ovarian hormones deprivation is able to promote molecular and functional changes in the brain of female mice, as well as worsen the behavioral alterations observed in the OCD mice model. In addition, we demonstrated that acute E₂ administration was able to minimize most of the cognitive and affective impairments evaluated, although its effect was more expressive in HIP-dependent functions. Finally, an important finding of the present study was the suggestion that long-term OVX modify the amygdaloid complex excitability, which may compromise the AMY-dependent memory.

Keywords: estradiol (E₂); ovariectomy (OVX); novel object recognition; fear conditioning, mood disorders, hippocampus, amygdaloid complex

1. Introdução

1.1 Estrogênios

Os estrogênios são hormônios esteróides sintetizados a partir do colesterol. Ao ser metabolizado, o colesterol é convertido em pregnenolona na reação catalisada pela enzima P-450. O composto então sintetizado dará origem a androstenediona, que por sua vez irá sintetizar a testosterona, pela ação da enzima 17 β -HSD. O produto final da cadeia de biossíntese será resultado da reação catalisada pela enzima aromatase, que converterá androgênios em estrogênios (GOODMAN, 2009; RIBEIRO, 2012) (Figura 1).

Os estrogênios são encontrados em três formas fisiológicas: a estrona (E1), o estradiol ou 17 β -estradiol (E₂) e o estriol (E3). A estrona é a forma mais encontrada no período pós-menopausa, já o estradiol é o produto mais abundante e mais potente dos estrogênios e predominante durante o período reprodutivo da mulher. A forma menos potente é o estriol, no entanto, possui importância durante a gestação, uma vez que é produzido em grandes quantidades pela placenta (STRAUSS et al., 2004; CUI; SHEN; LI, 2013).

Os ovários são a principal fonte de estrogênios. A produção deste hormônio está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. Neste, o hipotálamo irá secretar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que irá agir na hipófise anterior estimulando a secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) que agem de maneira sinérgica nos folículos ovarianos estimulando a secreção de estrogênios. Na maior parte do ciclo menstrual, os estrogênios agem no hipotálamo diminuindo a secreção de GnRH e na hipófise anterior inibindo a secreção de gonadotrofinas, mecanismo de *feedback negativo*. No entanto, antes da ovulação, o aumento acentuado na concentração plasmática de estrogênios estimula a síntese de GnRH pelo hipotálamo e de LH pela hipófise anterior que culmina com o pico pré-ovulatório desses hormônios, necessários ao processo reprodutivo. Essa ação estimulatória

dos estrogênios no eixo hipotálamo-hipófise-ovários determina o *feedback positivo*. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda são investigados (revisado por CHRISTIAN; MOENTER, 2010).

O sincronismo existente entre as estruturas do eixo hipotálamo-hipófise-ovários também controla as importantes alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo menstrual (mulheres) e estral (roedores) determinantes para o sucesso reprodutivo. O ciclo estral possui quatro fases distintas de acordo com as alterações hormonais, anatômicas e celulares. Na fase de proestro, as concentrações de E₂ aumentam (pico pré-ovulatório), de progesterona diminuem e os folículos ovarianos desenvolvem rapidamente e as concentrações. A ovulação acontece na madrugada da fase de estro depois que as concentrações de LH aumentam. A receptividade sexual acontece a cada 4 a 5 dias, no final do proestro. Já na fase de metaestro, há um aumento nas concentrações de progesterona e diminuição de E₂, sendo que este último começa a se elevar novamente na fase de diestro (CHRISTIAN; MOENTER, 2010; PARKENING; COLLINS; SMITH, 1982).

Sabe-se que a biossíntese desses hormônios também ocorre em outros tecidos tais como glândulas adrenais, tecido adiposo, placenta e também no sistema nervoso central (revisado por NELSON; BULUN, 2001). Esse último tem a habilidade de sintetizar hormônios esteróides a partir da síntese local de colesterol, neste caso chamados de “neuroesteróides”, cuja síntese é independente dos hormônios circulantes (FESTER et al., 2006; HOJO et al., 2004; NAFTOLIN et al., 1996). Além de serem classificados como hormônios ovarianos, os estrogênios também são conhecidos como “esteróides neuroativos”, pois quando sintetizados por glândulas endócrinas são então secretados na corrente sanguínea e agem em tecidos alvos no sistema nervoso central (CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006).

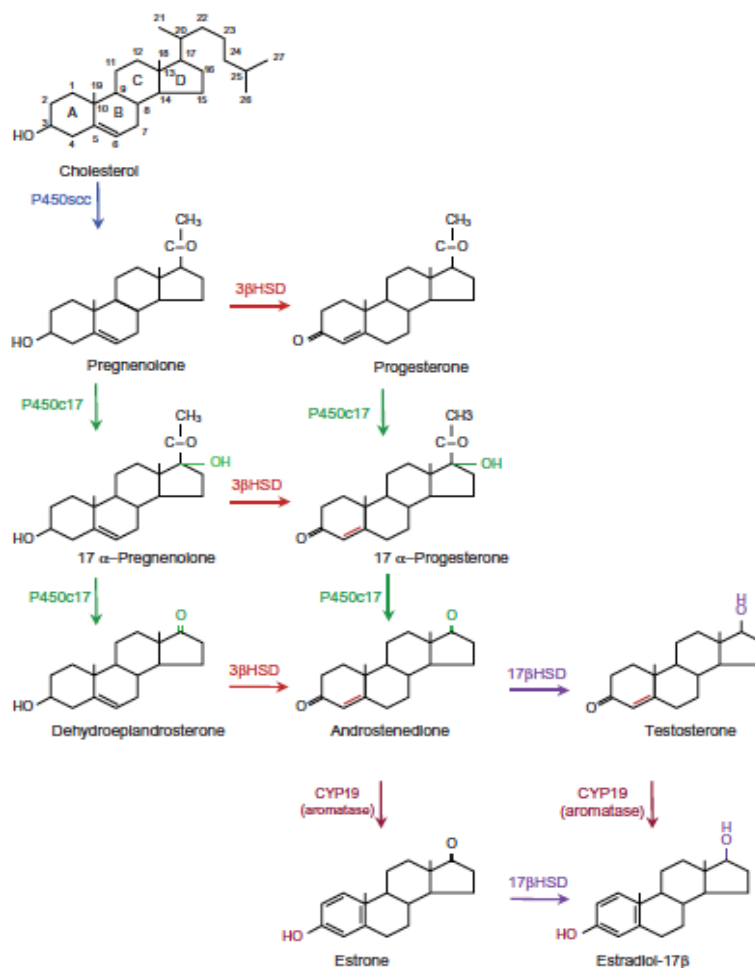


Figura 1. Biossíntese dos hormônios ovarianos (GOODMAN, 2009).

Os estrogênios exercem funções regulatórias importantes em vários processos biológicos, como reprodução, diferenciação e proliferação celular, apoptose, inflamação, metabolismo, homeostase e função cerebral. Seus efeitos se estendem por vários tecidos como pulmão, coração, tecido ósseo, glândulas mamárias, próstata, epidídimo, testículos, útero, ovário, dentre outros (GOODMAN, 2009; MCEWEN et al., 1997).

As ações dos estrogênios em células e tecidos alvos ocorre por meio da ligação do hormônio a receptores específicos. Quando são ativados os receptores presentes na membrana celular, o mecanismo não-genômico acontece, com respostas rápidas que variam de segundos a minutos, ativando segundos mensageiros que desencadeiam cascatas de sinalização

intracelular, que podem ou não ocasionar a fosforilação e ativação de fatores de transcrição. Já o mecanismo genômico envolve a ativação de receptores nucleares ou citoplasmáticos, e o complexo “hormônio-receptor” se liga ao gene promotor na região do elemento responsivo ao estrogênio, neste caso agindo como fatores de transcrição gênica, com respostas lentas que podem ocorrer em horas ou até mesmo dias (revisado por BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; RIBEIRO et al., 2012) (Figura 2).

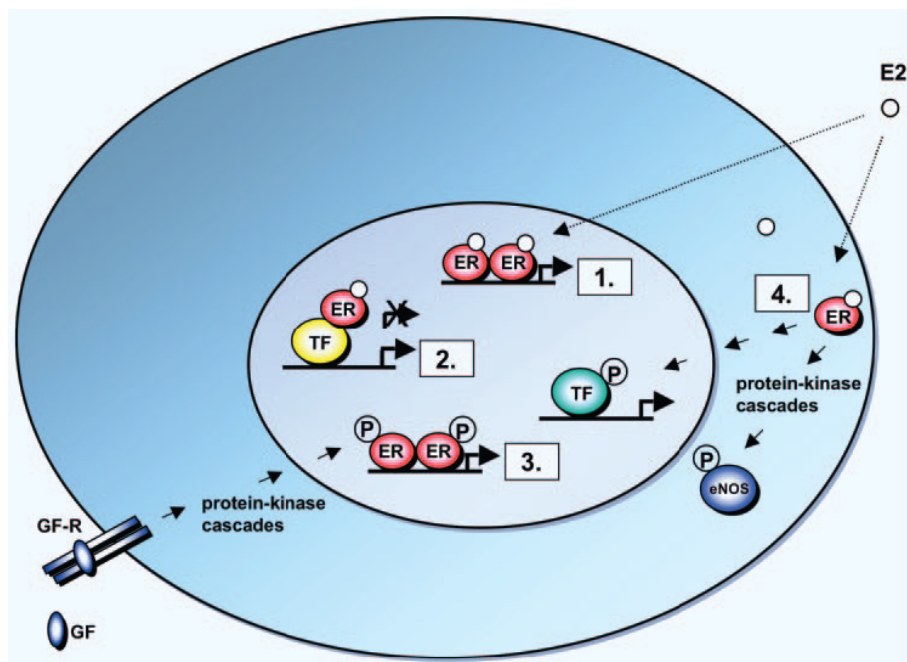


Figura 2. Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização dos receptores de estrogênio. 1. Os receptores de estrogênios (E_2) presentes no núcleo, ao serem ativados se ligam diretamente ao elemento responsivo ao estrogênio localizado no gene promotor. 2. O complexo “hormônio-receptor”, por meio de interações protéicas, será um fator de transcrição (TF). 3. Ações genômicas independentes de ligantes, por ex. quando fatores de crescimento (GF) ativam as cascatas de sinalização da proteína kinase que fosforilam e ativam os receptores de estrogênios nucleares na região do elemento responsivo ao estrogênio. 4. As ações rápidas, não genômicas, ocorrem com a ativação dos receptores de estrogênio presentes na membrana da célula. O complexo formado “hormônio-receptor” ativa as cascatas de sinalização da proteína kinase que alteram o funcionamento de proteínas presentes no citoplasma (ex. ativação de eNos) ou regulando a expressão de genes através da fosforilação e ativação de fatores de transcrição (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005).

Dois tipos de receptores clássicos nucleares podem ser encontrados em diferentes tecidos de humanos e roedores. São eles o ER α (receptor de estrogênio alfa, também conhecido como ERS1) e o ER β (receptor de estrogênio beta ou ERS2), que possuem funções bem distintas e distribuição variável nos tecidos, especialmente no cérebro (KUIPER et al., 1996; MITRA et al., 2003; OSTLUND; KELLER; HURD, 2003).

Os receptores de estrogênio α e β estão presentes em diferentes tecidos periféricos, conforme descrito na Tabela 1 (revisado por CUI; SHEN; LI, 2013):

Subtipos	Distribuição em tecidos periféricos
<i>ERα</i>	Útero, epidídimo, tecido ósseo e tecido adiposo branco, mamas, fígado, rins, próstata, ovários e testículos.
<i>ERβ</i>	Cólon, testículos, tecido adiposo marrom, endotélio vascular, pulmões, bexiga, próstata e ovários.

Tabela 1. Distribuição do ER α e ER β em tecidos periféricos (revisado por CUI; SHEN; LI, 2013).

Além do hipotálamo, regiões importantes para a cognição como hipocampo, amígdala e córtex também expressam ERs (receptores de estrogênio) (Tabela 2) (CUI; SHEN; LI, 2013; MITRA et al., 2003). Logo, a presença de receptores nestas regiões sugere uma influência hormonal em funções cognitivas e afetivas (SUNDERMANN; MAKI; BISHOP, 2010).

Subtipos	Distribuição no sistema nervoso central		
	Intensa	Moderada	Discreta
<i>ERα</i>	Amígdala, núcleo rubro da estria terminal, substância cinzenta periaquedutal e área preóptica.	Córtex, hipotálamo, locus ceruleus, núcleo da espinha trigeminal.	Hipocampo, núcleos da rafe.
<i>ERβ</i>	Amígdala, núcleo rubro da estria terminal, núcleos da rafe e substância negra.	Córtex, globo pálido, hipocampo, locus ceruleus, área preóptica, área tegmentar ventral	Núcleo tegmentar anterior, hipotálamo, oliva inferior, isocórtex, substância cinzenta periaquedutal, núcleo da espinha trigeminal, oliva superior e tálamo.

Tabela 2. Distribuição do ER α e ER β no sistema nervoso central (revisado por CUI; SHEN; LI, 2013).

1.2 Memória

O termo memória refere-se ao processo mediante o qual adquirimos, formamos, conservamos e evocamos informação. As memórias são formadas através de um complexo código de sinais elétricos e bioquímicos, sendo então armazenadas em redes neurais e podendo ser evocadas pelas mesmas redes ou por outras. São ainda moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e pelos estados de ânimo. As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de duração (memória de trabalho, memória de longa e de curta duração) e quanto ao conteúdo, em memórias declarativas e não declarativas (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004).

1.3 Classificação das memórias (Figura 3)

1.3.1 Quanto ao tempo de duração

De acordo com esta classificação, as memórias podem ser:

1. Memória de trabalho (MT) – também conhecida como memória operacional e imediata, devido ao seu tempo de duração ser no máximo três minutos e por apresentar poucas alterações bioquímicas. É processada pelo córtex pré-frontal (GOLDMAN-RAKIC, 1996; IZQUIERDO et al., 1998a).
2. Memória de Curta Duração (MCD) – memórias que duram segundos a horas e são instáveis, ou seja, vulneráveis a perturbações. Sua principal função é manter as informações disponíveis até que estas se consolidem (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO et al., 1998b, 1998c).
3. Memória de Longa Duração (MLD) – cuja característica principal é a manutenção da informação estável, utilizando-se de síntese protéica. Possui mecanismos bioquímicos completamente distintos e ocorre de forma independente e paralela. Pode perdurar por dias, meses e anos (IZQUIERDO et al., 1999; ISQUIERDO, 2002).

1.3.2 Quanto ao conteúdo

Neste aspecto, as memórias podem ser classificadas em não-declarativas e declarativas. As primeiras são processadas principalmente pelo núcleo caudado e cerebelo e estão relacionadas com capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais. São exemplos: memória de procedimento, *priming*, condicionamento clássico e aprendizado não associativo (habituação/sensibilização) (BAYLEY; SQUIRE, 2003; IZQUIERDO, 2002). Já as memórias declarativas são processadas pelas estruturas do lobo temporal medial e registram fatos, eventos e conhecimentos.

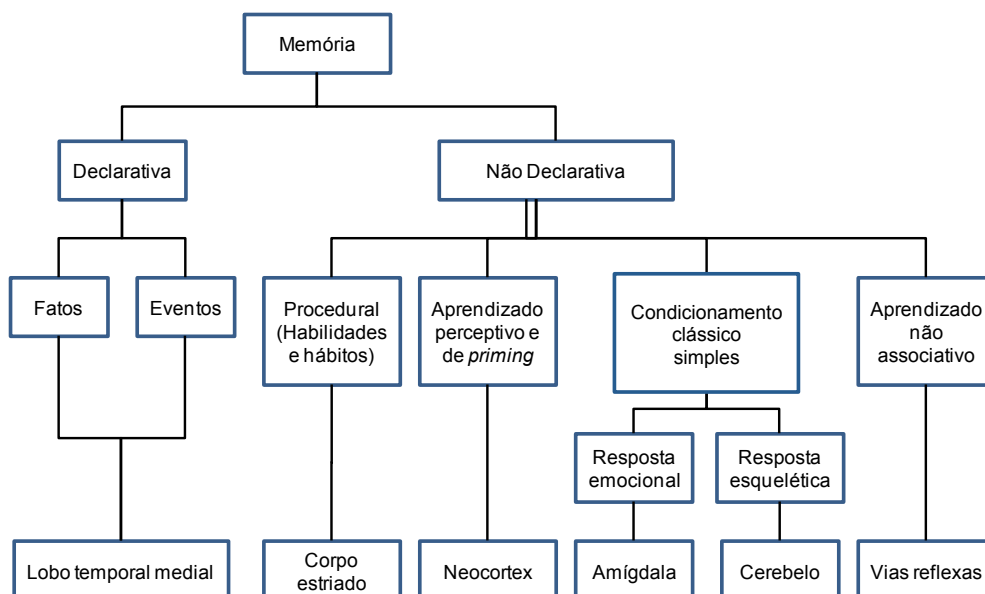


Figura 3. Classificação das memórias (segundo BAYLEY; SQUIRE, 2003).

1.4. Memórias declarativas

As memórias declarativas registram fatos, eventos e conhecimentos e podem ser divididas em: (1) semânticas, que estão relacionadas com conhecimentos gerais e (2) episódicas, que é autobiográfica (BAYLEY; SQUIRE, 2003; IZQUIERDO, 2002).

A memória do tipo episódica, descrita inicialmente por TULVING (1972), é considerada um dos principais sistemas de memórias neurocognitivas. É a “memória para eventos pessoalmente experimentados”, autobiográfica, que fornece informações sobre o que, quando e onde ocorreu um evento específico. A memória episódica já foi descrita como estritamente humana, uma vez que consiste na lembrança consciente de uma experiência pessoal única, que pode ser verbalmente explicitada, declarada. Os animais não podem verbalizar experiências, mas são capazes de vivenciar experiências individuais; assim acredita-se que os mesmos apresentem uma memória episódica similar aos humanos. Por exemplo, animais são capazes de modificar seus comportamentos frente a diferentes componentes de um contexto (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2005).

CLAYTON e DICKINSON (1998) descreveram evidências claras nas quais os animais possuíam características desse tipo específico de memória humana, porém a descreveu como uma memória semelhante à episódica (“*episodic-like memory*”) porque não existem formas de identificar se a lembrança em animais é conscientemente acompanhada de recordação.

1.5 Memória de reconhecimento de objetos e substratos neurais

Para investigar a memória do tipo episódica em camundongos, a tarefa de reconhecimento do objeto novo (RON) é rotineiramente utilizada. Ela acessa a habilidade exploratória natural de roedores expostos à novidade. Nesse modelo de aprendizagem, a diferença no tempo de exploração entre um objeto previamente conhecido (familiar) e um objeto novo é a medida do desempenho da memória (BERTAINA-ANGLADE et al., 2006) pois a preferência pelo objeto novo significa que a apresentação do objeto familiar existe na “memória” do animal (revisado por BIALA, 2012). Esta tarefa também oferece a possibilidade de obter informação rápida, além de não requerer exposição a um estímulo aversivo e também a restrição hídrica ou alimentar (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007).

Os substratos neurais que processam esse tipo de memória são hipocampo e córtex perirrinal, estruturas que fazem parte do lobo temporal (BIALA, 2012). Esse lobo abrange uma região grande do encéfalo que inclui a amígdala, a formação hipocampal (giro dentado e regiões CA1, CA2 e CA3), subículo, os córtex entorrinal, perirrinal e parahipocampal (SIMONS; SPIERS, 2003; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1991). NADEL e HARDT, 2011, revisaram as estruturas específicas do lobo temporal que participam do processamento de uma memória episódica (Figura 4).

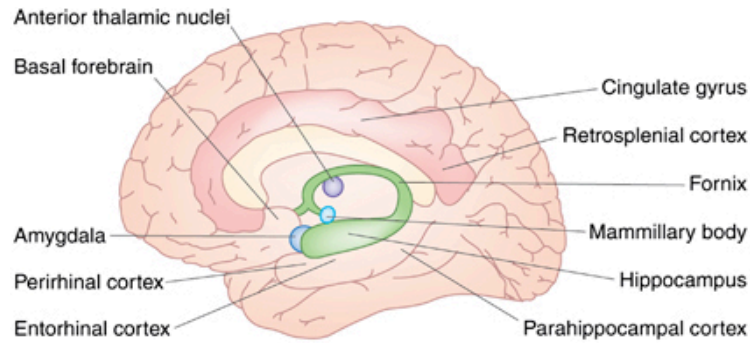


Figura 4. Regiões do sistema nervoso envolvidas no processamento da memória do tipo declarativa episódica em humanos. A. Regiões cerebrais importantes para a memória episódica são núcleo talâmico anterior, prosencéfalo basal, amígdala, córtex perirrinal, entorrinal e parahipocampal, hipocampo, corpo mamilar, fórnix, córtex retrosplenial e giro do cíngulo (NADEL; HARDT, 2011).

Estudos que utilizaram experimentos com lesões cerebrais em modelos murinos evidenciam que a memória de reconhecimento do novo objeto é dependente de regiões como córtex perirrinal (BARKER; WARBURTON, 2011; BARKER et al., 2007; SEOANE; TINSLEY; BROWN, 2012) e hipocampo dorsal (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004; BROADBENT et al., 2010; CLARK et al., 2012). A apresentação à novidade, que é crucial nas tarefas que investigam a memória de reconhecimento, modula diferentemente a excitabilidade dos neurônios dessas regiões. No córtex perirrinal, a frequência de disparos dos neurônios é maior durante o comportamento de escolha (AHN; LEE, 2015) enquanto que os neurônios do hipocampo aumentam os disparos no momento da detecção do objeto novo (FRANÇA et al., 2014).

Da mesma forma, pesquisas que investigam a expressão de c-Fos (gene de expressão imediata) após a exposição à novidade apontam que a ativação neuronal aumenta na região CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, córtex perirrinal e entorrinal lateral (ALBASSER; POIRIER; AGGLETON, 2010; VANELZAKKER et al., 2008). Um estudo recente, utilizando diferente paradigma que, além do componente da novidade (apresentação do objeto novo) oferece recompensa, identificou a participação do cortex perirrinal e do hipocampo na memória de reconhecimento do objeto não-visual. Nessa tarefa, os animais foram desafiados a

realizar o teste sem a dica do componente visual (no escuro) e os resultados demonstraram que a ativação neuronal mais significativa em regiões de cortex perirrinal e hipocampo dorsal foram indicativos de que essas regiões participam da consolidação da memória de reconhecimento mesmo quando a estratégia utilizada pelo animal passa a ser a informação tátil ou olfativa (ALBASSER et al., 2013).

Foi proposto por ALBASSER e colaboradores (2010) um modelo de correlação de áreas, para elucidar as diferentes interações entre as estruturas do lobo temporal durante o processamento da memória de reconhecimento de objeto novo. Este modelo aponta para o papel do circuito tri-sináptico do hipocampo induzido pela novidade (Figura 5).

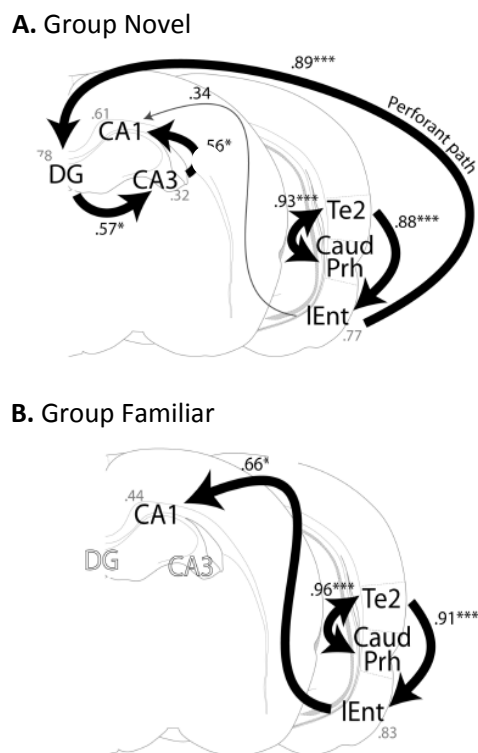


Figura 5. Interações entre as estruturas do lobo temporal medial envolvidas no processamento da memória de reconhecimento do objeto. A. No grupo exposto ao objeto novo, as informações aferentes provenientes da via perfurante (regiões de córtex entorrinal, perirrinal caudal e área Te2 do córtex de associação visual) dirigem-se ao circuito tri-sináptico do hipocampo (giro denteado, CA3 e CA1). B. No grupo exposto ao objeto familiar as informações da via perfurante são conduzidas diretamente para a região CA1 do hipocampo.

1.6 Memória de condicionamento ao medo e substratos neurais

O medo é um comportamento inato, que envolve a modulação dos sistemas cognitivo e afetivo. Nos animais, a resposta de medo garante o sucesso evolutivo, uma vez que os protege do perigo. Também o medo pode ser condicionado, e neste caso é uma das respostas emocionais mais pesquisadas. Para sua investigação, um dos métodos mais utilizados é o condicionamento ao medo pavloviano ou clássico (revisado por LEDOUX, 2014). O procedimento consiste na apresentação de um estímulo que seja biologicamente neutro (ex. som; estímulo condicionado) concomitante a um estímulo nocivo ou doloroso (ex. choque, estímulo incondicionado). Com o aprendizado, o animal exibe comportamentos específicos ao medo (ex. *freezing*) frente à apresentação ao estímulo condicionado. As respostas ao medo requerem ajustes fisiológicos que são controlados pelo sistema nervoso autônomo (ex. aumento da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e frequência respiratória), sistema nervoso periférico (com alterações de sensibilidade à dor e a expressão de reflexos do estado alerta) e sistema endócrino (liberação de adrenocorticóides, cortisol e epinefrina) (LEDOUX, 2000) (Figura 6).

A amígdala, ou complexo amigdalóide, é o substrato principal para que a informação de condicionamento ao medo seja processada e esta memória aprendida. Ela se localiza na região subcortical do lobo temporal medial e é formada por múltiplos núcleos interconectados que são o complexo basolateral (BLA), que se divide em lateral (LA), basal (BA) e basomedial (BM) e núcleo central (que se divide em porção lateral e medial, CEL e CEM respectivamente). A amígdala também participa na percepção, modulação e integração das funções associadas à ansiedade, atenção, aprendizado e memória de cunho emocional, além do comportamento reprodutivo e social (revisado por JANAK; TYE, 2015; QUIRK et al., 2003).

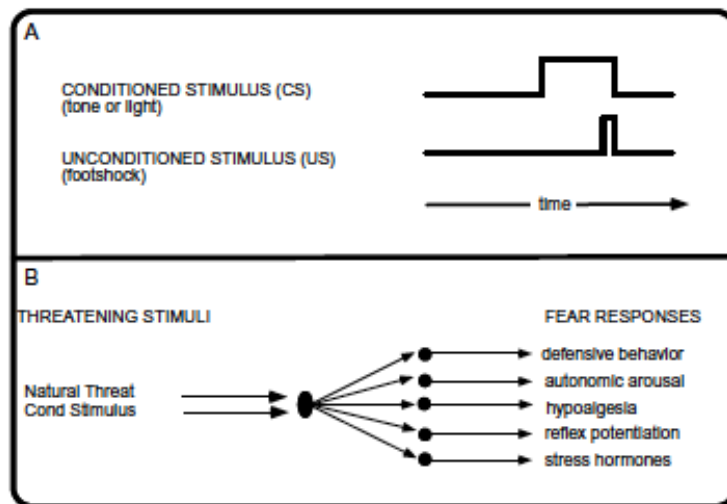


Figura 6. Desenho esquemático do condicionamento clássico. A. O condicionamento ao medo envolve o pareamento de um estímulo neutro, condicionado (*conditioned stimulus* – CS), que pode ser um som ou uma luz) a um estímulo incondicionado (*unconditioned stimulus* – US) (ex. choque nas patas). B. Após o condicionamento, a apresentação do estímulo condicionado remete à respostas fisiológicas típicas de uma situação de ameaça natural. As respostas ao medo podem ser: comportamentos defensivos, estado de alerta autonômico, hipoalgesia, potenciação de reflexo, liberação de hormônios estressores (LEDOUX, 2000).

Durante o condicionamento ao medo, as informações do estímulo condicionado e incondicionado, provenientes de regiões do tálamo e córtex auditivo e somatosensorial, respectivamente, são transmitidas para o núcleo lateral da amígdala (LA). Os inputs do estímulo condicionado chegam à região dorsal da amígdala lateral, onde as interações com o estímulo incondicionado irão induzir plasticidade nas células deste núcleo para disparar ou estocar a informação. A LA, por sua vez, faz conexões com os outros núcleos do complexo basolateral (BA e BM), bem como com o núcleo central. O complexo BLA também faz conexões com regiões corticais, principalmente córtex pré-frontal, o hipocampo e áreas associativas sensoriais (Figura 7) (revisado por MEDINA et al., 2002).

Já o núcleo central é considerado a principal eferência do complexo amigdalóide, sendo responsável por mediar o processamento das informações captadas pela BLA até a codificação destes sinais em respostas comportamentais de medo. As informações do estímulo condicionado são então repassadas do núcleo basolateral para o central (CE), cujas conexões são complexas, pois envolvem a ativação de circuitos intrínsecos. A memória de medo condicionado se consolida quando as eferências provenientes do CE ativam a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e as respostas comportamentais e fisiológicas ao medo são exibidas (revisado por HERRY; JOHANSEN, 2014; JANAK; TYE, 2015).

Os roedores também expressam a resposta condicionada pelo medo quando colocados numa caixa e este ambiente é pareado a um choque. Este aprendizado associativo denomina-se condicionamento ao medo pelo contexto, e requer regiões como amígdala e hipocampo para seu processamento. O estímulo inicial de representação do contexto (ambiente) demanda ação do hipocampo e a comunicação entre este substrato e os núcleos basal e acessório da amígdala. Conseqüentemente estas informações são transmitidas para o núcleo central da amígdala que envia eferências para a PAG e as respostas de medo condicionadas pelo contexto são expressas (LEDOUX; LEDOUX, 2000).

A complexidade das interações entre os núcleos do complexo amigdalóide pode ser, em parte atribuída, às diferentes populações de neurônios que modulam esta estrutura. Enquanto os núcleos LA e BLA possuem mais de 80% de neurônios glutamatérgicos, o núcleo CE é composto predominantemente por neurônios inibitórios gabaérgicos, embora algumas células possam ser responsivas a diferentes neurotransmissores (CIOCCHI et al., 2010; PARE; DUVARCI, 2012).

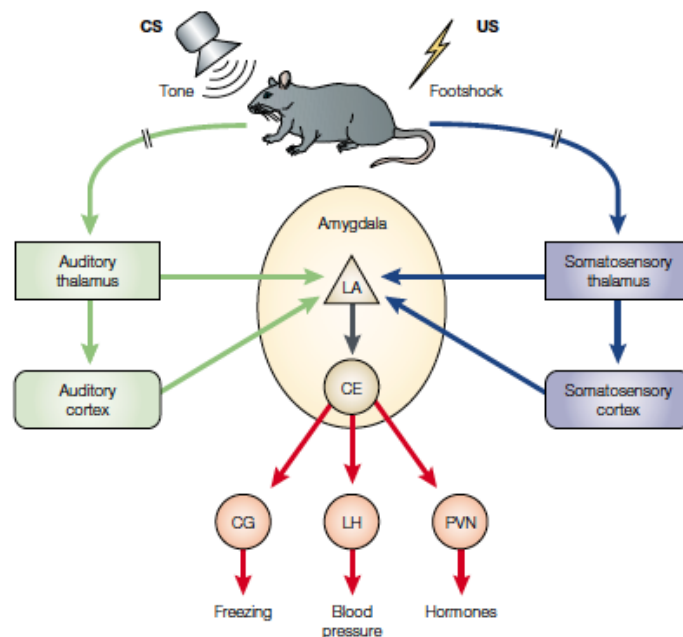


Figura 7. Circuitos neurais envolvidos na resposta de condicionamento ao medo. CS Estímulo condicionado (CS) pareado ao estímulo incondicionado (US) e regiões envolvidas no condicionamento: tálamo e córtex auditivos, região somatossensorial do córtex e tálamo, núcleos lateral e central da amígdala. As respostas defensivas de *freezing* são processadas pela substância cinzenta central (CG), as respostas pressóricas no hipotálamo lateral (LH) e o controle hormonal pelo hipotálamo paraventricular (PVN) (MEDINA et al., 2002).

1.7 Influência dos estrogênios nas funções cognitiva e afetiva

O papel regulador dos hormônios femininos nas funções cognitivas e afetivas tem sido evidenciado a partir das alterações ocorridas à partir da menopausa e ao longo do ciclo menstrual. Mulheres no período peri- e pós-menopausa, muitas vezes queixam-se de perda de memória ou piora da mesma acompanhada por dificuldades de lembrar palavras e números, sendo muito frequentes as dificuldades de concentração e transtornos de humor, como depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo (AGUILAR-ZAVALA et al., 2012; SOARES, 2014; TERAUCHI et al., 2012; UGUZ et al., 2010).

A literatura demonstra um efeito positivo da terapia hormonal (TH) em mulheres, no período pós-menopausa, em melhorar o desempenho na memória espacial e discriminativa olfativa (DOTY et al., 2015) e na memória verbal (ALHOLA et al., 2010; BERENT-

SPILLSON et al., 2011; SHERWIN; GRIGOROVA, 2011; WROOLIE et al., 2011). Com relação à função afetiva, os sintomas de transtornos de humor parecem ser minimizados pela TRH (ĐOKOVIĆ et al., 2015; RUIZ et al., 2011; TOFFOL; HEIKINHEIMO; PARTONEN, 2015). Similarmente, estudos apontam que a combinação da TRH e antidepressivos também tem efeitos positivos na redução dessas comorbidades (LIU et al., 2004; NAGATA; NOZAKI; NAKANO, 2005) e que a descontinuidade do tratamento pode aumentar a susceptibilidade à depressão (SCALI et al., 2010). No entanto, outros achados evidenciam que a terapia hormonal não melhora os sintomas de transtornos afetivos no período da pós-menopausa (JOFFE et al., 2011; RASGON et al., 2007).

Sabe-se que os efeitos da terapia hormonal na função cognitiva e afetiva em mulheres são ainda muito questionáveis, pois existem controvérsias (ESPELAND et al., 2013; GORENSTEIN et al., 2011; MAKI; HENDERSON, 2012). Ressalta-se ainda que a indicação para a TRH deve considerar, entre outros fatores, a janela de oportunidade da mulher, que consiste em um período no qual a TRH será eficaz, uma vez adotada nos estágios iniciais (FISCHER; GLEASON; ASTHANA, 2014; HENDERSON, 2009) pois, iniciada tardiamente, ela poderá ser ineficaz ou até mesmo deletéria para a função cognitiva e afetiva (revisado por MAKI, 2013).

Apesar de camundongos não exibirem uma menopausa, a remoção dos ovários (ovariectomia – OVX) pode ser utilizada como um modelo para o estudo de alterações fisiológicas decorrentes da privação de hormônios ovarianos (GEE; FLURKEY; FINCH, 1983; MENG et al., 2011).

No aspecto cognitivo, os estudos evidenciam que os efeitos benéficos da administração aguda de E₂ em recuperar o prejuízo na memória de RON podem estar diretamente relacionados à mecanismos que favorecem a plasticidade hipocampal tais como o aumento da acetilação de genes promotores de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro)

(FORTRESS et al., 2014) maior ativação de vias de sinalização da proteína kinase (MYSKIW et al., 2008), aumento da magnitude de LTP (potenciação de longa duração) nas sinapses de CA3-CA1 (VEDDER et al., 2013), aumento da sinalização glutamatérgica (BOULWARE; HEISLER; FRICK, 2013) e o crescimento de espinhas dendríticas (PHAN et al., 2012).

Além disso, a administração de agonistas dos receptores ER α e ER β no hipocampo dorsal parecem recuperar danos na memória de RON, pela ativação das vias de sinalização da proteína ERK (BOULWARE; HEISLER; FRICK, 2013; PEREIRA et al., 2014; TUSCHER et al., 2014). No entanto, o efeito favorável da administração aguda de E₂ na consolidação da memória de RON parece ser tempo-dependente. Se a administração de E₂ é realizada imediatamente pós-treino há recuperação do prejuízo cognitivo, o que não acontece se a administração for realizada em tempos superiores, por ex. três horas após o treino (FERNANDEZ et al., 2008).

Em se tratando da influência dos estrogênios na memória de condicionamento ao medo, os resultados são ainda escassos. A administração subcutânea de diferentes estrogênios e em diferentes doses em ratas ovariectomizadas por uma semana não favoreceu a memória de condicionamento pelo som, no entanto houve aumento da resposta de *freezing* em animais submetidos ao condicionamento pelo contexto (BARHA; DALTON; GALEA, 2010). O estudo recente de MCDERMOTT e colaboradores (2015) corroboram estes achados, uma vez que o benefício da administração de E₂ só foi verificado na memória condicionada pelo contexto e não pelo som.

Em estudo utilizando camundongos knockout para o ER β , machos e fêmeas apresentaram um comprometimento na memória de condicionamento pelo contexto e somente os machos apresentaram redução na resposta de *freezing* condicionada pelo som (DAY et al., 2005). Já a administração de agonista ER β , mas não de ER α , aumenta a generalização do medo à contextos neutros (LYNCH et al., 2014).

O efeito antidepressivo e ansiolítico do E₂ é alvo de constante investigação. A administração de E₂ no hipocampo parece reduzir o comportamento do tipo-depressivo, na tarefa de nado forçado (WALF; FRYE, 2007). O efeito antidepressivo do E₂, parece ser dependente, em parte, de mecanismos que modulam a função hipocampal como o aumento da atividade dos receptores serotoninérgicos (5-HT) e de BDNF em ratas adultas (KISS et al., 2012a), a supressão da síntese de óxido nítrico em camundongos fêmeas (HEYDARPOUR et al., 2013) e por favorecer a neurogênese, na combinação com fluoxetina (VEGA-RIVERA et al., 2015). Estudos também sugerem a participação do ERβ em potencializar os efeitos antidepressivos induzidos pelo E₂ (JACOME et al., 2010; WALF; FRYE, 2007).

O E₂ também modula o comportamento do tipo-ansiedade. Na inibição da síntese de estrogênios utilizando-se um inibidor de aromatase, os efeitos ansiogênicos foram potencializados em camundongos ovariectomizados (MENG et al., 2011). Em ratas submetidas à OVX, o efeito ansiolítico da administração de E₂ no hipocampo foi identificado na tarefa de labirinto em cruz elevado (WALF; FRYE, 2007). A amígdala também parece ser um substrato importante para modular o comportamento do tipo-ansiedade. Foi demonstrado que administração de E₂ na amígdala medial (FRYE; WALF, 2004) e basolateral teve efeito ansiolítico, e neste último estudo, associado a aumento na ativação do sistema glutamatérgico (DE JESÚS-BURGOS; TORRES-LLENZA; PÉREZ-ACEVEDO, 2012). Juntos, estes dados ressaltam o papel dos estrogênios em modular a função cognitiva e afetiva.

1.8 Transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e estrogênios

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é classificado como uma desordem de ansiedade caracterizada por pensamentos obsessivos persistentes (períodos de ansiedade/aflição) e comportamentos repetitivos compulsivos que tendem a amenizar a ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). As obsessões podem ser temáticas, como o medo de contaminação, dúvidas patológicas, necessidade de simetria/ordem e somáticas como as obsessões de agressividade. Os comportamentos compulsivos repetitivos de verificar, lavar, procurar, contar, ordenar e buscar podem estar presentes (DORON; MOULDING, 2009).

No TOC, as funções cognitivas e afetivas são extremamente prejudicadas. Resultados de testes neurocognitivos e de análise de imagem em humanos, elucidam déficits na memória verbal/fluência (KASHYAP et al., 2012) e na memória espacial (NAKAO et al., 2009; VAN DER WEE et al., 2007). O prejuízo na memória espacial também foi verificado em ratas com comportamento do tipo-compulsivo na tarefa de labirinto aquático de Morris, que acessa a memória espacial (JITHENDRA; MURTHY, 2010). Já a depressão parece ser uma comorbidade comum em humanos com este tipo de transtorno (PERIS et al., 2010; REMIJNSE et al., 2013).

A literatura aponta como possíveis causas neurofisiológicas a redução da ativação do circuito córtico-estriato-tálamo-cortical (AHMARI et al., 2013), diminuição da modulação serotoninérgica (SCHILMAN et al., 2010), gabaérgica (EGASHIRA et al., 2013) e glutamatérgica (EGASHIRA et al., 2012). Alterações genéticas associadas ao sistema glutamatérgico também podem estar envolvidas (PORTON et al., 2013; ROTGE et al., 2010). No entanto, os mecanismos neurais do TOC ainda não são bem esclarecidos, principalmente pela carência de modelos animais. Em 2011, foi validado um modelo de camundongos obtidos por meio de seleção natural, com comportamento do tipo-compulsivo não induzido

caracterizado pelo teste de “construir ninhos”. Através dos testes comportamentais e farmacológicos foram identificadas duas linhagens: animais com comportamento não compulsivo “Small Nest Builders” e animais com comportamento compulsivo “Big Nest Builders” (GREENE-SCHLOESSER et al., 2011).

Outro foco de investigação no TOC é com relação ao papel modulatório dos hormônios ovarianos. Em animais intactos, a administração aguda de estradiol em fêmeas na pré-puberdade exerceu um efeito anti-compulsivo (FLAISHER-GRINBERG et al., 2009) enquanto que camundongos machos com deficiência estrogênica (knockout para enzima aromatase) apresentaram comportamento do tipo-compulsivo (HILL et al., 2007). Já em ratas ovariectomizadas, a administração concomitante de estradiol e progesterona foi capaz de reduzir o comportamento do tipo-compulsivo (LLANEZA et al., 2012).

Em dados ainda não publicados (MITRA et al., 2014) foi identificado um dimorfismo sexual entre os animais da linhagem “Big Nest Builders”, onde os machos apresentam o comportamento do tipo-compulsivo mais pronunciado do que as fêmeas, no teste de “construir ninhos”. Baseado nestas evidências, estabelecemos a hipótese de que, os hormônios ovarianos, especialmente o estradiol, teria efeito protetor em minimizar o comportamento do tipo-compulsivo em um modelo experimental de TOC não induzido.

Em conjunto, estas evidências sugerem que a diminuição da modulação estrogênica em substratos neurais como hipocampo e amígdala, pode aumentar a vulnerabilidade à transtornos afetivos e a prejuízos na função cognitiva.

Capítulo I

Efeito do estradiol nas memórias de reconhecimento do objeto novo/condicionamento ao medo e nas funções afetivas após a ovariectomia crônica.

2. Justificativa

O hipocampo e o complexo amigdalóide são estruturas recrutadas na expressão de comportamentos associados ao medo, ansiedade, depressão, atenção, aprendizado e memória. Além disso, ambas as estruturas expressam receptores de estrogênios (MITRA et al., 2003), o que torna essas regiões potencialmente sensíveis aos efeitos modulatórios desses hormônios.

Em situações de diminuição nas concentrações de estradiol, como na pós-menopausa e após a ovariectomia, tanto funções cognitivas quanto afetivas podem estar comprometidas. Contudo, poucos estudos tem se dedicado a investigar se os prejuízos na memória e na função afetiva em modelos murinos submetidos à privação de hormônios ovarianos são consequências de um desbalanço na atividade hipocampal e do complexo amigdalóide e ainda se de alguma forma os circuitos intrínsecos da amígdala são modulados pelos estrogênios.

Logo, estudos que investiguem o papel de substratos como hipocampo e amígdala tornam-se altamente relevantes por favorecer a compreensão das alterações fisiológicas que ocorrem como consequência da privação hormonal crônica. Os resultados obtidos podem agregar subsídios para auxiliar o avanço de terapias que sejam mais adequadas para minimizar tanto os danos cognitivos e afetivos que podem surgir a partir da senescência ovariana.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do estradiol sobre a cognição e a função afetiva causadas pela privação crônica de hormônios ovarianos.

Tópico 1 - Efeito da privação hormonal na memória de reconhecimento do objeto novo e na função afetiva

3.1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na memória de reconhecimento do objeto novo;
- ✓ Verificar a eficácia de 12 semanas de ovariectomia em parâmetros periférico e central da função reprodutiva;
- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia em comportamentos do tipo-depressivo, do tipo-compulsivo e anedonia;
- ✓ Verificar o efeito de 12 semanas de ovariectomia no volume hipocampal;
- ✓ Verificar o efeito de 1 e 12 semanas de ovariectomia na expressão hipocampal de ER α e ER β ;
- ✓ Investigar o efeito da administração intra-hipocampal de estradiol (E₂), agonistas ER α e ER β e antagonista ER α na consolidação da memória de reconhecimento do objeto novo de fêmeas submetidas a 12 semanas de ovariectomia;
- ✓ Investigar o efeito da administração sistêmica e intra-hipocampal de estradiol (E₂), agonistas ER α e ER β no comportamento do tipo-depressivo induzido por 12 semanas de ovariectomia.

Tópico 2 - Influência da privação hormonal na memória de condicionamento ao medo e na função afetiva

3.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na memória de condicionamento ao medo pelo som;
- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na memória de condicionamento ao medo pelo contexto;
- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na atividade locomotora;
- ✓ Verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia no comportamento do tipo-ansiedade;
- ✓ Verificar o padrão de ativação neuronal no complexo amigdalóide de fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas submetidas ao experimento de condicionamento ao medo pelo som;
- ✓ Investigar se a administração sistêmica de estradiol (E₂) recupera o déficit de memória de condicionamento ao medo pelo som e o comportamento do tipo-ansiedade;
- ✓ Investigar o efeito da administração de estradiol no núcleo basolateral da amígdala sobre a consolidação e evocação da memória de medo condicionado pelo som em fêmeas após 12 semanas de ovariectomia.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados para os experimentos do capítulo I camundongos C57BL/6 fêmeas de 8-12 semanas de idade, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo cinco animais por gaiola) dentro de uma estante ventilada. 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 protocolos experimentais foram conduzidos durante a fase clara do ciclo (das 10:00hs às 16:00hs) e os animais tiveram livre acesso à água e ração, exceto quando devidamente explicitado.

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG aprovou todos os experimentos, sob o protocolo nº 120/2011.

4.2. Cirurgias

4.2.1 Ovariectomia (OVX) / Sham

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução a 3%, manutenção entre 1.5-2%). A região abdominal lateral foi tricotomizada e higienizada com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI). A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente na região abaixo da última vértebra lombar e o ovário foi exposto e removido no grupo OVX. Foi realizado no grupo controle (sham) procedimento similar, no entanto, após a identificação e exposição dos ovários, eles não foram removidos. A pele foi posteriormente suturada e o procedimento foi realizado bilateralmente em cada animal. Após os procedimentos, os animais receberam uma dose única intramuscular de analgésico, anti-inflamatório e anti-térmico Banamine (0.3mg/kg) (CAPETTINI et al., 2011; FONSECA et al., 2013) e tiveram até uma semana para

se recuperarem antes dos experimentos. Os animais foram mantidos, após a cirurgia, por um período de 1, 6 e/ou 12 semanas, de acordo com os protocolos experimentais. Alguns animais tiveram o útero removido e pesado após 12 semanas da cirurgia, como maneira de verificar a eficiência da privação crônica dos hormônios ovarianos.

4.2.2 Estereotaxia

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) por via intraperitoneal e posicionados no aparelho estereotáxico. A região da cabeça foi tricotomizada e o crânio foi exposto através de uma incisão com bisturi. O perióstio foi removido, o bregma e o lambda foram alinhados. As coordenadas estereotáxicas foram adaptadas de PAXINOS e FRANKLIN (2004). O bregma foi a referência e as coordenadas utilizadas para a implantação das cânulas guia no hipocampo e na amígdala foram respectivamente, em mm,: Ântero-posterior (AP):-1.9; látero-lateral (LL):+/-1.6; dorso-ventral (DV):-1.0 e (AP): -1.1; (LL): ± 3.2 e DV: -5.1.

Foi realizada a trepanação bilateral utilizando-se uma broca odontológica nos locais de interesse das coordenadas AP e LL. As cânulas guias (7mm) foram colocadas num adaptador que foi fixado à torre do estereotáxico e foram abaixadas lentamente através dos orifícios abertos anteriormente até atingirem a coordenada DV. As cânulas foram fixadas com cimento de zinco e o adaptador foi retirado. Uma cânula oclusora foi colocada no interior de cada cânula guia para evitar a incidência de oclusão. Um parafuso foi fixado sobre a calota craniana no osso frontal para aumentar a fixação do capacete. A região do crânio exposta foi coberta por acrílico dentário formando o capacete (LAZARONI et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). A cirurgia foi realizada quando os animais completaram 11 semanas da cirurgia de ovariectomia. Os animais permaneceram por uma semana em recuperação até o início dos experimentos.

4.3 Histologia

Ao final dos experimentos comportamentais, os animais com cânulas guias foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram os cérebros removidos, estocados por um dia em solução de PFA (paraformaldeído) 4% e por dois dias em solução de sacarose 30%. Cortes coronais (100µm de espessura próximos à cânula guia) foram obtidos usando-se um criostato. As fatias foram então coradas com vermelho neutro e os locais das microinjeções foram identificados com o auxílio de microscópio. Somente os animais que tiveram correta localização das cânulas foram considerados para as análises estatísticas (LAZARONI et al., 2012; PEREIRA et al., 2014)

4.4 Tarefas comportamentais

Os experimentos comportamentais foram realizados nos períodos de 1, 6 e/ou 12 semanas após a cirurgia Sham e/ou OVX e no período da tarde. Os experimentos referentes à administração de drogas foram conduzidos somente nos animais ovariectomizados após 12 semanas da cirurgia.

4.4.1 Reconhecimento do Objeto Novo (RON)

A tarefa de RON acessa uma memória não espacial dependente de hipocampo (Fernandez et al., 2008; Pereira et al., 2014) e baseia-se na premissa de que camundongos têm preferência natural por novidade. O protocolo utilizado foi descrito por GRESACK; FRICK, (2006). A habituação foi realizada no primeiro dia, no qual os animais foram colocados em uma caixa de plástico (50cm x 40cm x 20 cm) e tiveram 5 minutos para livre exploração. A fase de treino foi realizada 24hs depois da habituação. Os grupos foram re-habituaados durante 1 minuto na caixa e após foram apresentados a dois objetos idênticos. O tempo de

investigação em ambos os objetos até se atingir 30s totais de exploração foi mensurado. Quantificamos como exploração todas as vezes que o animal tocou o objeto com as patas dianteiras, nariz ou com as vibrissas. Na fase de escolha, realizada 24hs depois da sessão de treino, um dos objetos familiar ao animal foi trocado por um objeto novo. O tempo utilizado para acumular 30 segundos de exploração dos objetos foi registrado. A caixa foi higienizada com álcool 70% a cada novo teste para prevenir adaptações olfativas. Para a escolha dos objetos foram considerados o peso e a altura apropriados, para se evitar tanto o movimento do animal sobre o objeto quanto o movimento do objeto da sua posição inicial (CAPETTINI et al., 2011; FONSECA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). Foram avaliados diferentes coortes de animais nos intervalos de 1, 6 e 12 semanas pós cirurgia de OVX/Sham.

4.4.2 Condicionamento ao medo

O condicionamento ao medo acessa um aprendizado do tipo associativo, que permite que um estímulo condicionado, por ex. um som, ao ser pareado a um estímulo incondicionado (ex. choque), possa gerar uma resposta de medo condicionado (revisado por LEDOUX, 2014).

A tarefa foi realizada na caixa de condicionamento ao medo (dimensões de 390 x 470 x 320mm), contendo dois compartimentos diferentes e um assoalho acoplado ao estimulador elétrico, um emissor de som na região posterior e um sistema de filmagem no topo (Insight, Brasil). A caixa de condicionamento foi alojada no interior de uma caixa de isolamento acústico (530 x 650 x 500mm). Para a tarefa de condicionamento ao medo pelo som, o protocolo de treino foi realizado com as seguintes etapas: 120 segundos de habituação inicial seguidos por 30s de exposição ao som de 1KHz (estímulo condicionado, CS, do inglês *conditioned stimulus*) e nos últimos 2s o som foi pareado a um choque de 0.7mA (estímulo

incondicionado, US, do inglês *unconditioned stimulus*). Em seguida, o animal permaneceu na caixa por 30s e logo após retornou para a sua gaiola.

Para testar se o animal condicionou o som ao choque, 24h pós-treino, o animal foi colocado numa nova caixa (contexto diferente) e após 180s de habituação o mesmo som usado na sessão de treino foi aplicado por mais 180s. O comportamento de “*freezing*” (ausência de movimentos, exceto os respiratórios) foi mensurado. Para testar se o animal condicionou o contexto ao choque, cerca de 1 a 2 minutos após o teste, realizamos um segundo teste. Este teste consistiu em colocar o animal na mesma caixa (contexto) do dia do treino durante 300s. O comportamento de “*freezing*” (ausência de movimentos, exceto os respiratórios) foi contabilizado no período de apresentação do som (JASNOW; SCHULKIN; PFAFF, 2006).

4.4.3 *Suspensão de cauda*

O teste de suspensão de cauda consiste na análise da imobilidade induzida pela postura de suspensão como medida de comportamento depressivo (STERU et al., 1985). Os animais foram fixados individualmente pela cauda a uma haste de metal (50cm de altura) com o auxílio de uma fita adesiva. Os animais permaneceram suspensos nesta posição e o tempo total de imobilidade induzida pela suspensão foi registrado por 5 minutos. A imobilidade foi considerada pela ausência de movimentos nas patas traseiras e dianteiras. Após o teste, a fita adesiva foi delicadamente removida da cauda e os animais foram recolocados à suas gaiolas. Diferentes coortes de animais foram testados nos intervalos de 1, 6 e 12 semanas para se evitar adaptação ao ambiente do teste.

4.4.4 Nado Forçado

O teste de nado forçado é uma tarefa utilizada para se inferir sobre o comportamento tipo-depressivo em roedores e foi conduzido como descrito por PORSOLT; LE PICHON; JALFRE (1977). Os animais foram individualmente colocados num cilindro de vidro vertical (17cm de diâmetro x 27 cm de altura) contendo água na temperatura de 25 a 27°C. Foi permitido aos animais o movimento livre na água e foi quantificado o tempo de imobilidade durante 5 minutos. A imobilidade foi considerada como o tempo em que o animal permaneceu em flutuação realizando apenas movimentos respiratórios. O movimento de patas traseiras e/ou dianteiras unilateral ou bilateral foi desconsiderado. Após 24 horas do teste de suspensão de cauda, os mesmos animais foram utilizados para esta tarefa.

4.4.5 Enterrar bolinhas na maravalha

É um teste utilizado para detectar o comportamento do tipo-compulsivo. Os animais foram individualmente colocados em uma caixa de acrílico (37cm x 21cm x 14cm) contendo 20 bolinhas de gude separadas entre si. As bolinhas são colocadas por cima da maravalha, que foi colocada a uma profundidade de 5cm na caixa. A duração do teste é de 20min e ao final foi mensurado o número de bolinhas, no mínimo 2/3 enterradas na maravalha. O comportamento do tipo-compulsivo é atribuído ao maior número de bolas de gude enterradas (GREENE-SCHLOESSER et al., 2011; TERAUCHI et al., 2012).

4.4.6 Preferência pela sacarose

A preferência pela sacarose foi investigada utilizando-se o método de escolha entre duas opções de garrafas. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas e foram habituados, por 8 horas, a duas garrafas contendo água. 18 horas antes do início do teste, eles foram mantidos em privação hídrica. O teste consistiu na colocação de duas garrafas no topo

das gaiolas: uma contendo água e a outra contendo uma solução de sacarose imediatamente após o início do teste 3%. Ambas as garrafas foram pesadas antes do teste e no período de 1 hora e 36 horas após o início do teste. A preferência pela sacarose foi quantificada utilizando a seguinte fórmula: $[\text{consumo de sacarose} / (\text{consumo de sacarose} + \text{consumo de água})]$ (IMAI et al., 2013). Os mesmos animais OVX/Sham foram testados nos intervalos de 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias.

4.4.7 Atividade Locomotora

Utilizou-se o sistema automatizado (*Actitrack v2.7.13.*) para mensurar a atividade locomotora 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias. O aparato consiste em uma arena em acrílico que é acoplada a um sistema externo de infravermelho (25x25cm). Este sistema permite monitorar a distância total percorrida horizontalmente na arena, em centímetros. O animal permaneceu na arena por 5min em livre exploração. A caixa foi higienizada com álcool 70% antes que um novo teste fosse iniciado (BRANCHI; ALLEVA; COSTA, 2002).

4.4.8 Labirinto em cruz elevado

O aparato utilizado para a realização do teste consiste num labirinto em cruz de acrílico, que fica elevado a 30cm do solo e formado por quatro braços, sendo dois abertos (30cm comprimento) e dois fechados (30cm de comprimento e altura de 50cm). É um método comumente utilizado para avaliar o comportamento do tipo-ansiedade. A premissa do teste é a que animais que exibem o comportamento do tipo-ansiedade tendem a permanecer por menos tempo nos braços abertos do labirinto. Durante 5 minutos os animais exploraram livremente o labirinto e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi mensurado (FERREIRA-VIEIRA et al., 2014; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007).

4.5 Drogas

Utilizamos 17 β -Estradiol (E₂, Sigma-Aldrich) encapsulado em ciclodextrina (CDX) na dose de 10 μ g/ μ L (FERNANDEZ et al., 2008), para a administração intra-hipocampal (i.h.) e intra-núcleo basolateral da amígdala (intra-BLA) e na dose de 0.2mg/kg, para a administração intra-peritoneal (i.p.) (GRESACK; FRICK, 2006). A solução controle utilizada foi ciclodextrina dissolvida em salina 10%.

Os agonistas seletivos do receptor de estrogênio alfa - ER α (4,4',4"-[4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl]tris-phenol [PPT]), beta - ER β (2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile [DPN]) e o antagonista seletivo do ER α (theophylline, 8 [(benzylthio)methyl]-(7CI,8CI) [TPBM]), foram administrados i.h. nas doses de 1 μ g/ μ l (PEREIRA et al., 2014), 2 μ g/ μ l (PEREIRA et al., 2014; WALF; FRYE, 2007) e 250ng/ μ l (PEREIRA et al., 2014), respectivamente. O veículo utilizado foi DMSO 50%.

4.6 Tratamentos farmacológicos

4.6.1. Intra-hipocampo e intra-amígdala

No momento da infusão, as cânulas oclusoras foram removidas delicadamente e uma agulha injetora (30G de 8mm para infusão no hipocampo e 12mm para infusão na amígdala) foi introduzida dentro da cânula guia. A agulha injetora foi acoplada a um tubo de polietileno (PE20) que foi conectado a uma micro-seringa Hamilton de 10 μ l. As drogas foram administradas no volume de 0.5 μ l/lado, numa velocidade de 0.5 μ l/min. Após o procedimento de infusão, a agulha injetora foi mantida por 1min na mesma posição, para evitar a difusão da droga dentro do tubo de injeção (LAZARONI et al., 2012; PEREIRA et al., 2014).

Para a tarefa de reconhecimento do objeto novo, as drogas foram injetadas imediatamente e 3hs após a sessão de treino (FERNANDEZ et al., 2008). Para a tarefa de

nado forçado, as drogas foram injetadas 10min antes do teste (WALF; FRYE, 2007). Para a tarefa de condicionamento ao medo, as drogas foram injetadas imediatamente após a sessão de teste ou 30min antes da sessão de treino.

4.6.2. Intra-peritoneal

Para testar o efeito antidepressivo e ansiolítico dos estrogênios, os animais receberam a administração intra-peritoneal de E₂, 15 min antes da tarefa de nado forçado e 30 min antes do a tarefa de labirinto em cruz elevado. Na tarefa de condicionamento ao medo pelo som, os grupos receberam o E₂ intra-peritoneal 30min antes da tarefa. Diferentes grupos de animais foram utilizados nos experimentos para evitar traços de memória do ambiente do teste que pudessem interferir nos resultados.

4.7 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) i.p. e perfundidos, por meio do auxílio de uma bomba de perfusão (6ml/min), com paraformaldeído (PFA) a 4% e tampão fosfato salina (PBS) 0,01M. Para a análise da expressão de c-Fos, os grupos foram eutanasiados 1 hora e meia após a sessão de treino na tarefa de condicionamento ao medo pelo som. Conseqüentemente, os cérebros foram removidos e pós-fixados em PFA 4% por 12 horas à temperatura de 4°C. Após esse período, eles foram transferidos para uma solução de sacarose 30% e mantidos nesta solução até a saturação (tempo de saturação estimado em 48 horas). Os cérebros foram congelados em isopentano 99% e mantidos a -45°C por 1 minuto. Com a utilização de um criostato, foram realizados cortes coronais com espessura de 40µm desde a coordenada do Bregma -1,34mm a -2,06mm, como referência o início e o final da porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial (VMHVL) e amígdala, segundo (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). As fatias foram

armazenadas a -20°C em solução crioprotetora (PBS, sacarose 20%, etilenoglicol 15%, NaN₃ 0.05%).

Utilizando-se o método *free-floating*, as fatias foram lavadas 3 vezes em 0.01M de tampão tris fostato salina (TBS) e incubadas por 10 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. Após este procedimento, as fatias foram novamente lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS/ Triton X-100 0.3% e incubadas por 2hs em solução de bloqueio [normal goat serum (NGS) 3% em TBS/0.3% de Triton X-100]. Em seguida, o anticorpo primário anti-ER α (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-542, anticorpo policlonal purificado de coelho) ou anti-Fos (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-52, anticorpo policlonal purificado de coelho) foi adicionado e incubado à temperatura ambiente por 12hs. No próximo dia, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS com 0.3% de Triton X-100 e incubadas com anticorpo secundário (1:1000, biotilado anti-coelho, anti-IgG, Vector Laboratories) por 2hs em temperatura ambiente. As fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS com 0.3% de Triton X-100 e incubadas no complexo avidina-biotina peroxidase (1:250 em TBS, Vector Laboratories) durante 1 hora em temperatura ambiente.

Subsequentemente, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS e 3 vezes de 6 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 15 minutos. Finalmente as fatias foram colocadas em lâminas gelatinizadas, secas ao ar ambiente, desidratadas em xilol e cobertas com lamínulas fixadas com entellan (FONSECA et al., 2013)

4.8 Western Blot

Os animais foram eutanasiados 1 ou 12 semanas após as cirurgias de OVX/Sham. Os hipocampus foram então dissecados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C.

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de RIPA contendo 150mM de NaCl, 50 mM de Tris pH=7.4, 1mM de EDTA, 1% de Nonidet P40, 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0.5% de deoxicolato de sódio e centrifugados a 13000rpm por 15min a 4°C (FERREIRA-VIEIRA et al., 2014). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos plásticos e estocados a -80°C. A quantificação proteica foi feita pela técnica de Bradford e quantidades iguais de proteínas (50µg) dos tecidos foram separadas por eletroforese (Bio-Rad System) e transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Milipore, MA). As membranas foram incubadas por 24hs com os seguintes anticorpos: anti- ER α (ER α 1:750, Santa Cruz Biotechnology, sc-542, anticorpo policlonal purificado de coelho), anti-ER β (ER β 1:250, Santa Cruz Biotechnology, sc-6821, anticorpo policlonal purificado de cabra) e anti β -actina (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-69879, anticorpo monoclonal purificado de camundongo), sendo o último usado como normalizador de proteína.

Para visualizar a quimiluminescência, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) anti-coelho (#170-6515 Bio-Rad), anti-cabra (#172-1034 Bio-Rad) e anti-camundongo (#172-1011 Bio-Rad), durante 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e sensibilizadas com solução de Immobilom Forte (Millipore Corporation, USA). A quantificação das bandas aparentes foi feita utilizando a medida de densitometria pelo software Image J (Version 1.44p, National Institute of Health). Os valores foram expressos pela razão de ER α / β -actin or ER β / β -actin.

4.9 Ressonância Magnética Estrutural (RME)

Após 12 semanas das cirurgias sham e OVX, os animais foram submetidos à análise do volume do hipocampo pela técnica de ressonância magnética estrutural. Foram inicialmente anestesiados com isoflurano (indução a 3% e manutenção a 1.5%) e oxigênio (1.5%), liberados na máscara facial acoplada ao nariz do animal. A cabeça do animal foi

fixada a um suporte para evitar artefatos de movimento durante as análises.

As imagens foram obtidas utilizando-se um magneto de 4.7T NMR (Oxford Systems) controlado por console de imagens UNITY Inova-200 (Varian). O protocolo de imagiologia consistiu em imagens de múltiplas varreduras coronais (TR=3000ms, TE=50ms), 20 contínuas, 1mm de espessura.

As análises foram feitas utilizando-se os softwares Bamboo Tablet Driver V5.2.5 WIN (WACOM Technology Corporation, USA) e MeVisLab (MeVis Medical Solutions AG, Fraunhofer).

4.10 Análise das imagens

As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico Axio imager M2, utilizando objetiva com aumento de 10 vezes, e foram tiradas fotos da porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial e da amígdala. As análises das marcações foram feitas utilizando-se o programa Image-J. Para a região do hipotálamo, foi delimitada a porção lateral do núcleo ventromedial (VMHVL) (Figura 8A) e para a amígdala os núcleos lateral (LA), basolateral (BLA), porção lateral do núcleo central (CEL) e porção medial do núcleo central (CEM) (Figura 8B).

Para a quantificação da expressão de ER α no VMHVL, após as delimitações das áreas foi então definida uma faixa limite (*threshold*) entre regiões marcadas e o fundo, compreendendo os cinquenta (50) tons mais escuros em uma escala de 256 tons de cinza. Como resultado, a intensidade média/densidade de área marcada foi quantificada. Para quantificação de células c-Fos⁺, o mesmo procedimento foi dotado inicialmente, no entanto, foram obtidos os valores do número de partículas (marcações) nas áreas delimitadas. Foi

utilizada uma média de quatro fatias por animal. Inicialmente foi feita uma média dos valores obtidos para cada animal e posteriormente foi feita a média das fatias para cada grupo.

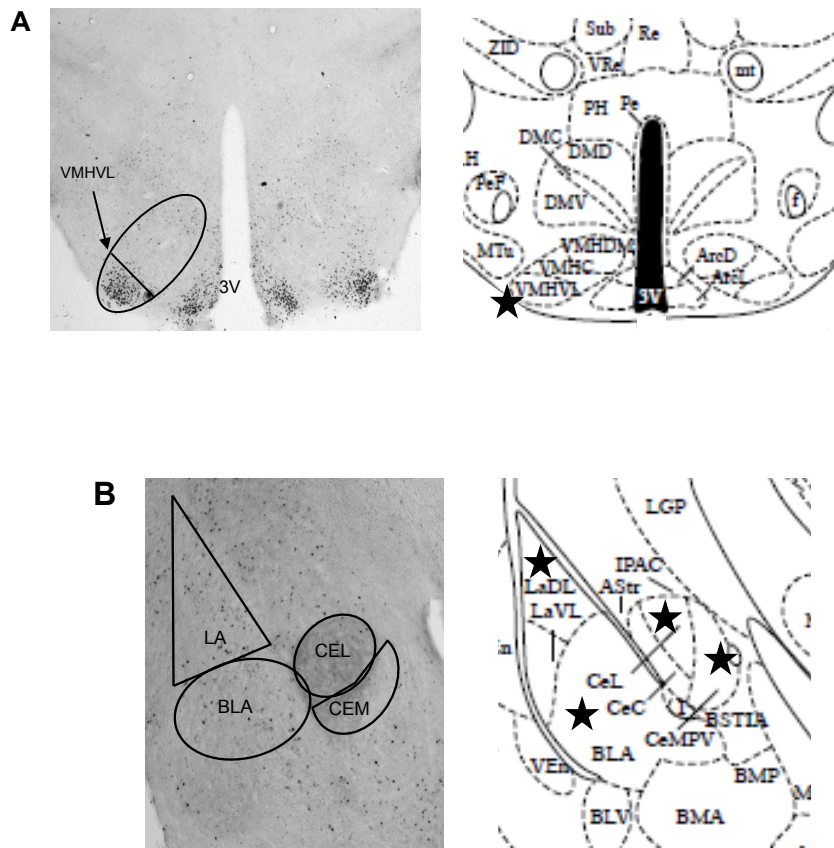


Figura 8. Ilustração das áreas delimitadas, segundo Paxinos e Franklin (2004) para as análises de imunohistoquímica no (A) VMHVL e (B) núcleos da amígdala. ★ indicam as regiões consideradas para as análises.

4.11 Delineamento Experimental

Tópico 1 - Influência da privação hormonal na memória de reconhecimento do objeto novo e na função afetiva

Experimento 1

O experimento 1 teve como objeto verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na memória de reconhecimento do objeto novo. Para tanto, os animais foram

inicialmente submetidos às cirurgias Sham-controle/ OVX e testados na tarefa RON nos tempos 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias. Alguns animais após 12 semanas das cirurgias tiveram o volume do hipocampo analisado, pela técnica de ressonância magnética estrutural (RME).

Alguns animais após 1 e 12 semanas de OVX, foram eutanasiados e tiveram o hipocampo dissecado e preparado para posterior análise proteica da expressão de ER α e ER β (Figura 9).

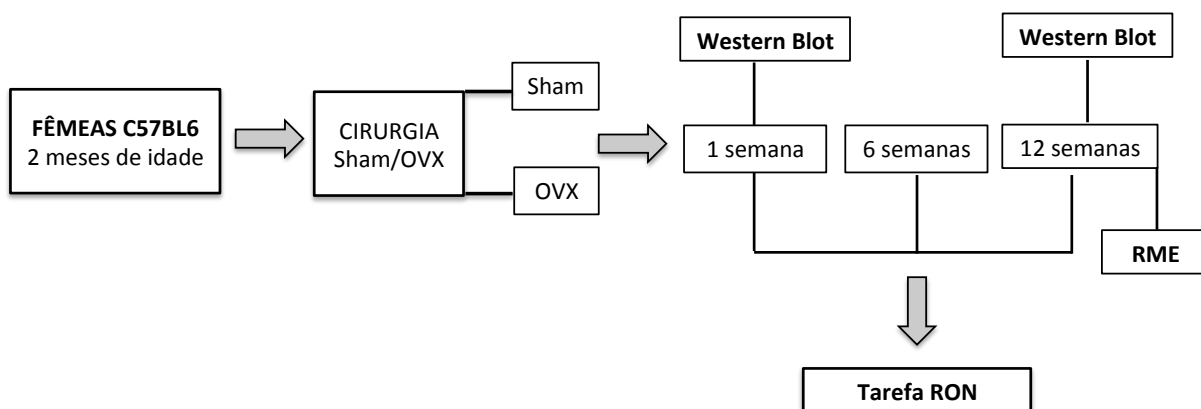


Figura 9. Delineamento do experimento 1.

Experimentos 2 e 3

O experimento 2 teve como objeto verificar o efeito de 12 semanas de ovariectomia na função reprodutiva. Para tanto, alguns animais, após 12 semanas das cirurgias Sham-controle/ OVX, foram reutilizados do experimento 3 e eutanasiados para as análises do peso relativo do útero e da expressão de ER α na porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial (VMHVL).

O experimento 3 teve como objetivo investigar o efeito tempo-dependente da ovariectomia nos comportamentos do tipo-depressivo, do tipo-compulsivo e anedonia. Para

tanto, os animais foram inicialmente submetidos às cirurgias Sham-controle/OVX e testados nos tempos 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias nos seguintes testes: suspensão de cauda, nado forçado, enterrar bolinhas e preferência pela sacarose. Grupos diferentes de animais foram utilizados para evitar traços de memória que pudessem levar à adaptação do ambiente (Figura 10).

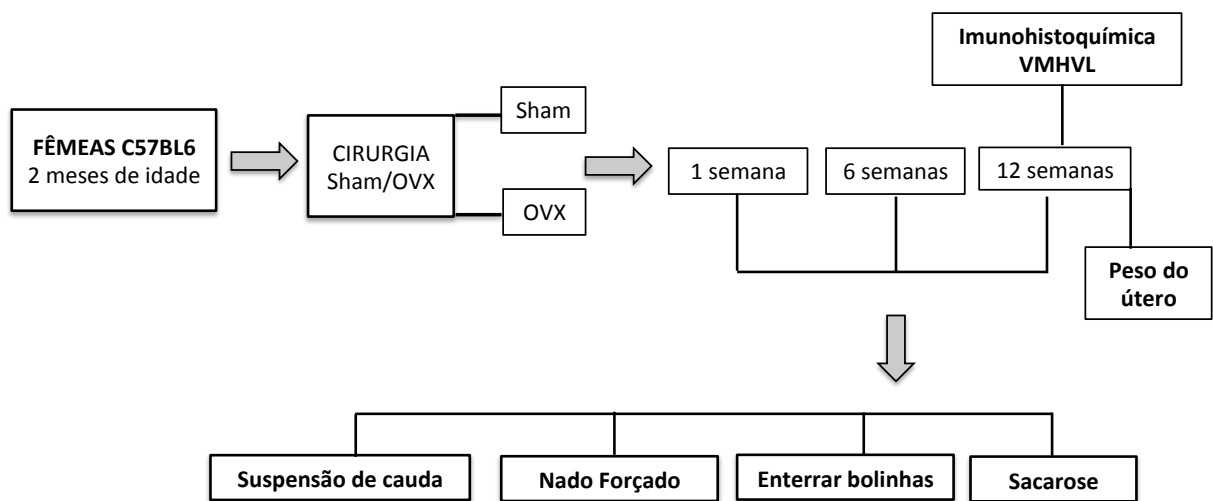


Figura 10. Delineamento dos experimentos 2 e 3.

Experimento 4

O experimento 4 foi planejado para verificar se a administração de E_2 , ou dos agonistas do $ER\alpha$ (PPT) e $ER\beta$ (DPN) ou do antagonista do $ER\alpha$ (TPBM) poderia ser capaz de reverter o déficit na memória de RON e também o comportamento do tipo-depressivo. Os grupos animais foram inicialmente submetidos somente à cirurgia de OVX e quando completaram 11 semanas de OVX foram submetidos a uma segunda cirurgia (estereotáxica) para a implantação de cânulas no hipocampo dorsal. Após uma semana de recuperação da segunda cirurgia, os procedimentos de administração das drogas foram realizados. Outros grupos de animais receberam somente a administração intra-peritoneal de E_2 .

Para a tarefa de RON, diferentes grupos de animais foram submetidos à administração de E₂ imediatamente e 3hs após a sessão de treino, enquanto outros grupos receberam, imediatamente após a sessão de treino, PPT ou DPN ou TPBM. Já na tarefa de nado forçado, alguns animais receberam, 15 min antes do início da tarefa, o E₂ (intra-peritoneal e intra-hipocampal), enquanto outros grupos receberam intra-hipocampo o PPT ou DPN (Figura 11).

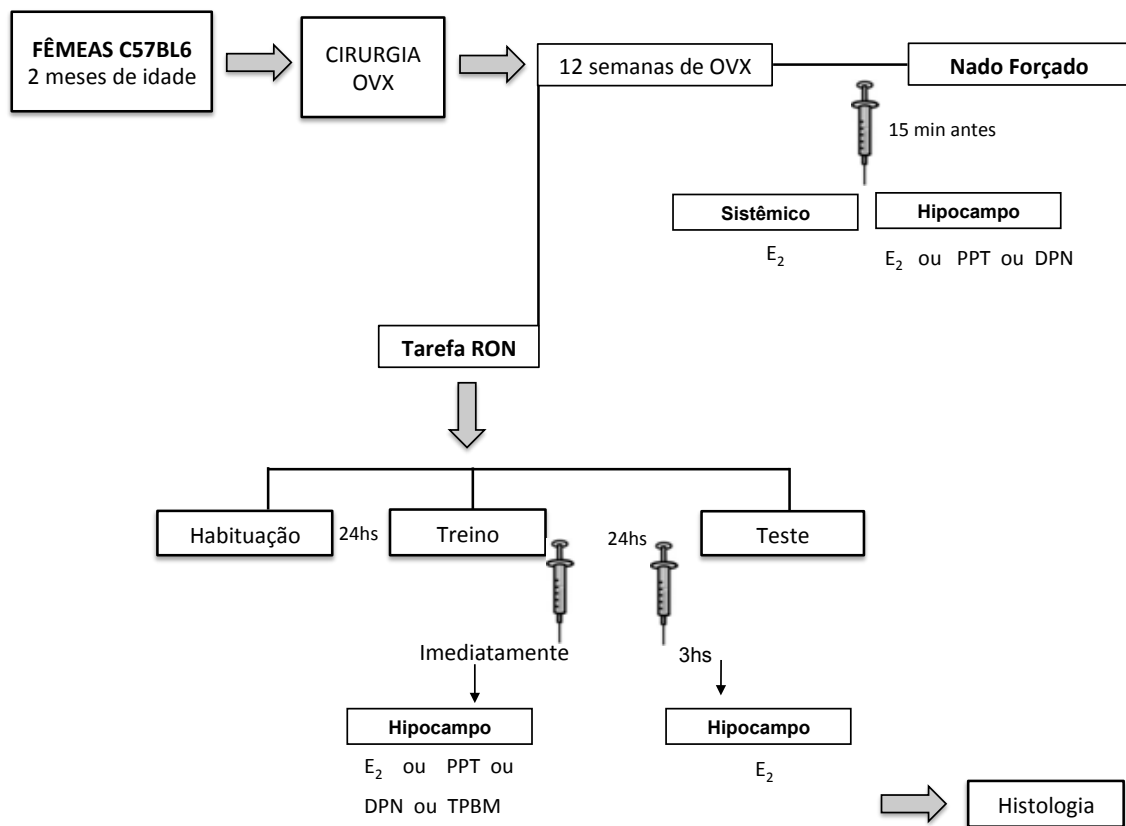


Figura 11. Delineamento do experimento 4.

Tópico 2 - Influência da privação hormonal na memória de condicionamento ao medo e na função afetiva

Experimentos 1 e 2

O experimento 1 teve como objeto principal verificar o efeito tempo-dependente da ovariectomia na memória de condicionamento ao medo pelo som e de condicionamento ao medo pelo contexto. Para tanto, os grupos foram inicialmente submetidos às cirurgias Sham-controle/ OVX e testados nas tarefas 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias. No experimento 2, o objetivo foi investigar o efeito tempo-dependente da ovariectomia no comportamento do tipo-ansiedade e na atividade locomotora, assim os grupos realizaram o teste de labirinto em cruz elevado e de campo aberto, respectivamente após 1, 6 e 12 semanas após as cirurgias Sham-controle/OVX (Figura 12).

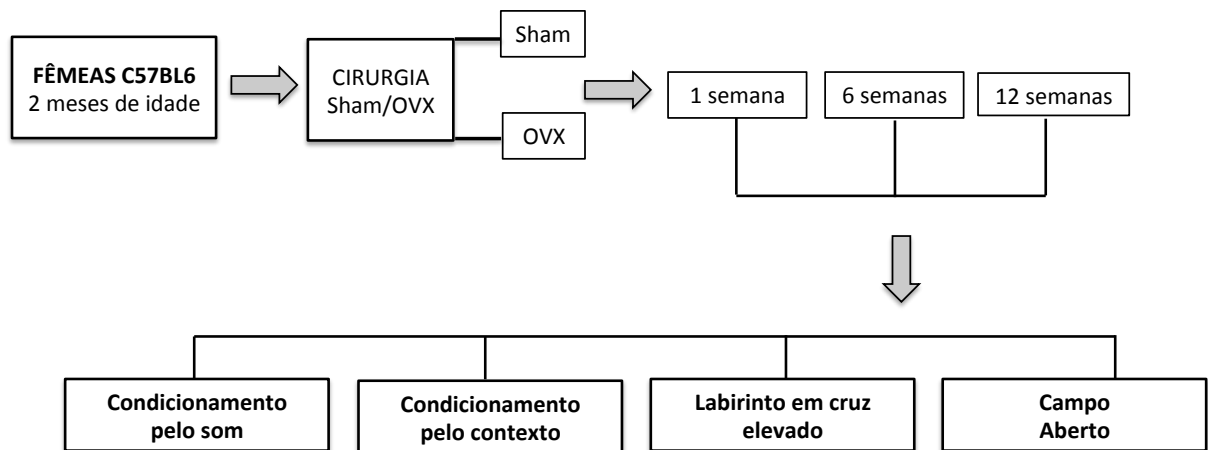


Figura 12. Delineamento dos experimentos 1 e 2.

Experimento 3

O experimento 3 foi planejado para verificar qual seria o perfil de ativação de neurônios do complexo amigdalóide de fêmeas OVX por 12 semanas após o condicionamento ao medo pelo som. Os grupos foram inicialmente submetidos às cirurgias Sham-controle/OVX e testados na tarefa de condicionamento ao medo pelo som após 12 semanas das cirurgias. Para este experimento, os grupos Sham-controle e OVX foram subdivididos em: grupos controles (não condicionados) e os grupos que foram condicionados pelo som. Os grupos foram eutanasiados e perfundidos 1h e 30min após serem testados para posteriores análises de imunohistoquímica para marcação do gene de expressão imediata (c-Fos) nos núcleos da amígdala (LA, BLA, CEL e CEM) (Figura 13).

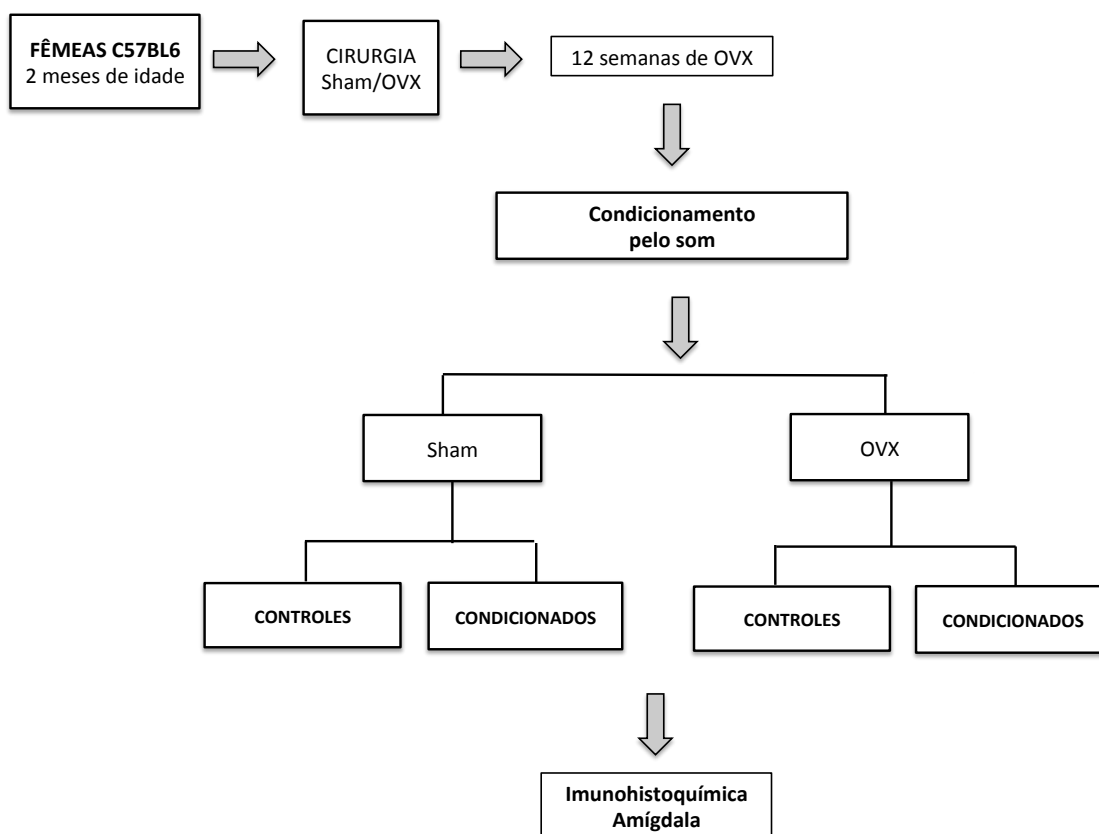


Figura 13. Delineamento do experimento 3.

Experimento 4

O experimento 4 teve como objetivo verificar se a administração de E₂ poderia reverter o déficit na memória de condicionamento ao medo pelo som e o comportamento do tipo-ansiedade. Assim, alguns grupos de animais foram submetidos à cirurgia de OVX e ao completarem 11 semanas, foram submetidos a uma segunda cirurgia (estereotáxica) para a implantação de cânulas no núcleo basolateral da amígdala (BLA). Após uma semana de recuperação, os procedimentos de administração de drogas foram realizados. No entanto, outros grupos de animais, após completarem 12 semanas das cirurgias, receberam a administração i.p. de E₂ (Figura 14).

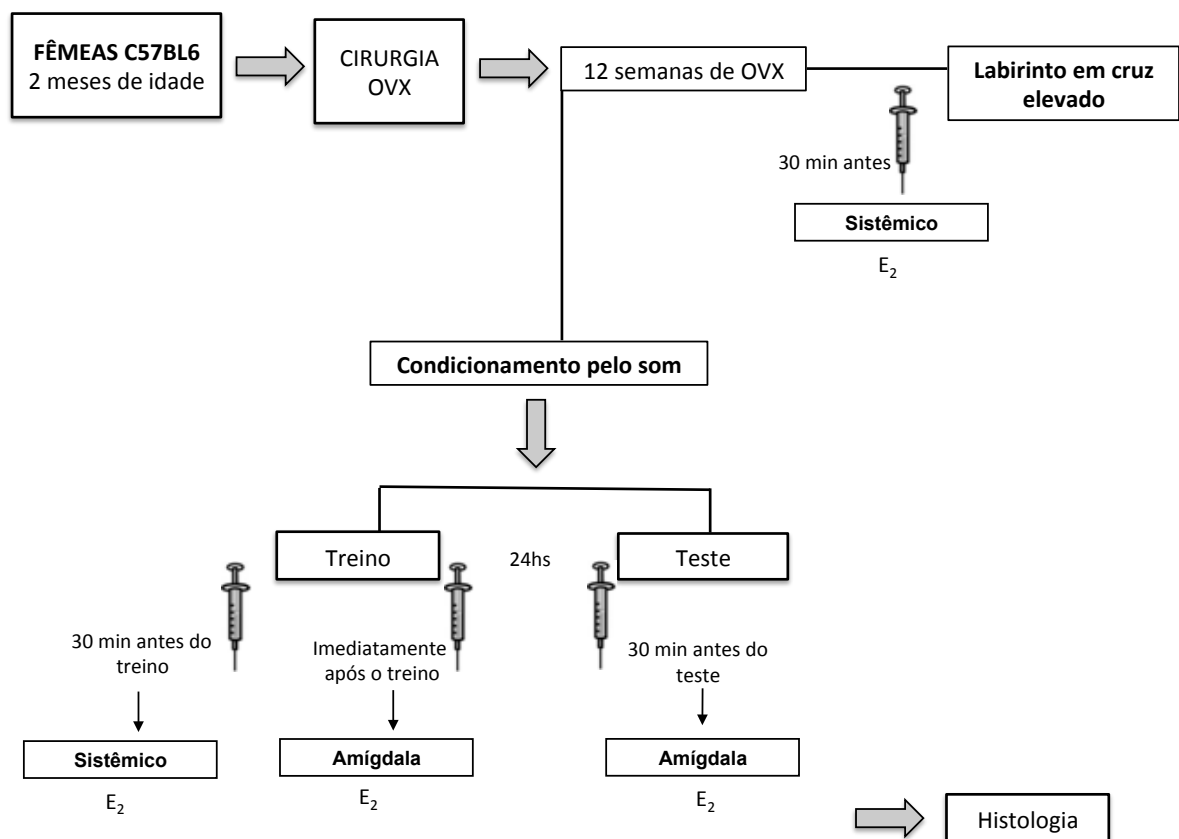


Figura 14. Delineamento do experimento 4.

4.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Graph Pad Prism 4. No primeiro tópico do capítulo 1, para determinar se o tempo de exploração no objeto novo foi diferente de 15s, o teste t de uma amostra foi usado (GRESACK; FRICK, 2006; PEREIRA et al., 2014). Utilizando-se a análise de variância de duas vias (Two way ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni, foi possível identificar diferenças entre os grupos na tarefa de suspensão pela cauda, nado forçado, enterrar bolinhas, preferência pela sacarose e nas análises do volume hipocampal. Para a comparação entre os grupos com relação às variáveis peso do útero, tempo de exploração nos objetos, expressão protéica e tempo de imobilidade após a administração intra-peritoneal de E_2 foi usado o teste t não pareado. A ANOVA de uma via foi utilizada para a comparação entre os grupos que receberam a administração de agonistas/antagonista dos receptores de estrogênios na tarefa de nado forçado.

No segundo tópico do capítulo 1, as análises da ANOVA de duas vias e o pós teste de Bonferroni permitiram identificar as diferenças existentes entre os grupos que realizaram os experimentos de condicionamento ao medo pelo som, o condicionamento ao medo pelo contexto, o comportamento do tipo-ansiedade, a atividade locomotora e também o condicionamento ao medo nos grupos não condicionados e condicionados. Para as análises da expressão de c-Fos nos núcleos da amígdala pós condicionamento, a ANOVA de duas vias foi usada. O teste t não pareado foi utilizado para detectar as diferenças entre os grupos que receberam a administração de E_2 sistêmico e intra-amígdala, tanto na tarefa de condicionamento ao medo pelo som quanto na tarefa de labirinto em cruz elevado.

O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$ e os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP) da média.

5. Resultados

Tópico 1 - Influência da privação hormonal na memória de reconhecimento do objeto novo e na função afetiva

12 semanas de ovariectomia prejudicam a memória de reconhecimento do objeto novo

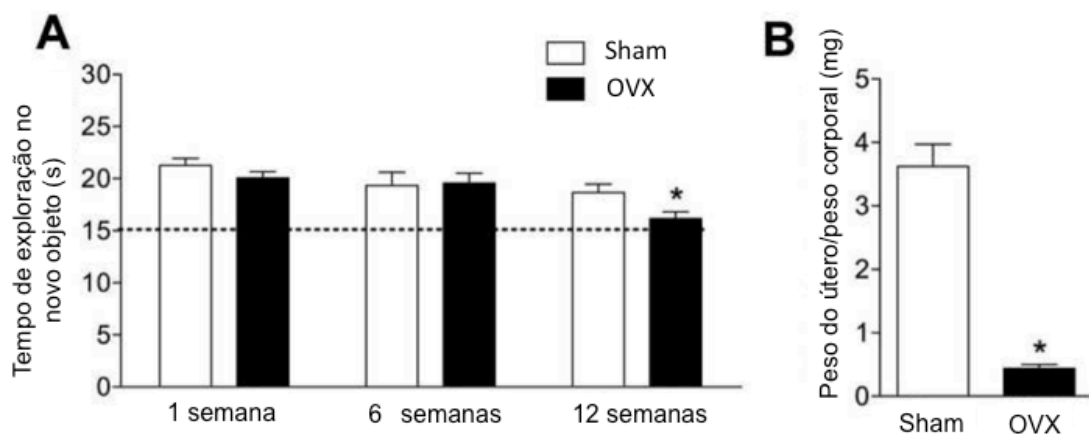
As análises do test *t* de uma amostra demonstraram que animais ovariectomizados por 12 semanas exploram menos o objeto novo ($t(9)=0.11$; $p=0.91$) quando comparados aos controles ($t(9)=5.71$, $p=0.0003$), indicando prejuízo na memória de reconhecimento do objeto novo. Após 1 semana, tanto o grupo sham ($t(12)=10.94$, $p<0.0001$) quanto o grupo OVX ($t(14)=8.48$, $p<0.0001$) exploraram mais o novo objeto e o mesmo foi verificado nos grupos após 6 semanas das cirurgias (Sham: $t(8)=3.41$, $p=0.0092$; OVX: $t(6)=4.82$, $p=0.0029$) (Figura 15A), indicando nenhum prejuízo na memória. No entanto, os grupos não diferiram em relação ao tempo necessário para acumular 30s de exploração no objeto novo e familiar, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tempo total para completar 30s de exploração nos objetos (média ± EPM)

Tempo de cirurgia (seg)	1 semana	6 semanas	12 semanas
SHAM	516,8 ± 69,3	623,3 ± 82,7	390,4 ± 50,8
OVX	504,6 ± 66,3	670 ± 109,7	423,8 ± 52,1
P valor	0,90	0,73	0,65

Tabela 3. Tempo de exploração nos objetos até atingir 30s de investigação na tarefa de RON.

A eficácia de 12 semanas de ovariectomia em alterar parâmetros da função reprodutiva foi investigada de duas maneiras: pelo efeito periférico no peso do útero e central na expressão de ER α na porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial (VMHVL) após 12 semanas de OVX. Foi detectada significativa redução no peso do útero no grupo OVX em comparação ao grupo sham-operado ($t(16)=8.94$, $p<0.0001$) (Figura 15B). Além disso, a análise quantitativa da expressão de ER α na porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial demonstrou que houve diminuição na expressão deste receptor após a ovariectomia em comparação ao grupo controle ($t(9)=2.825$, $p=0.0199$) (Figura 15C). As análises qualitativas corroboram estes resultados (Figura 15D).



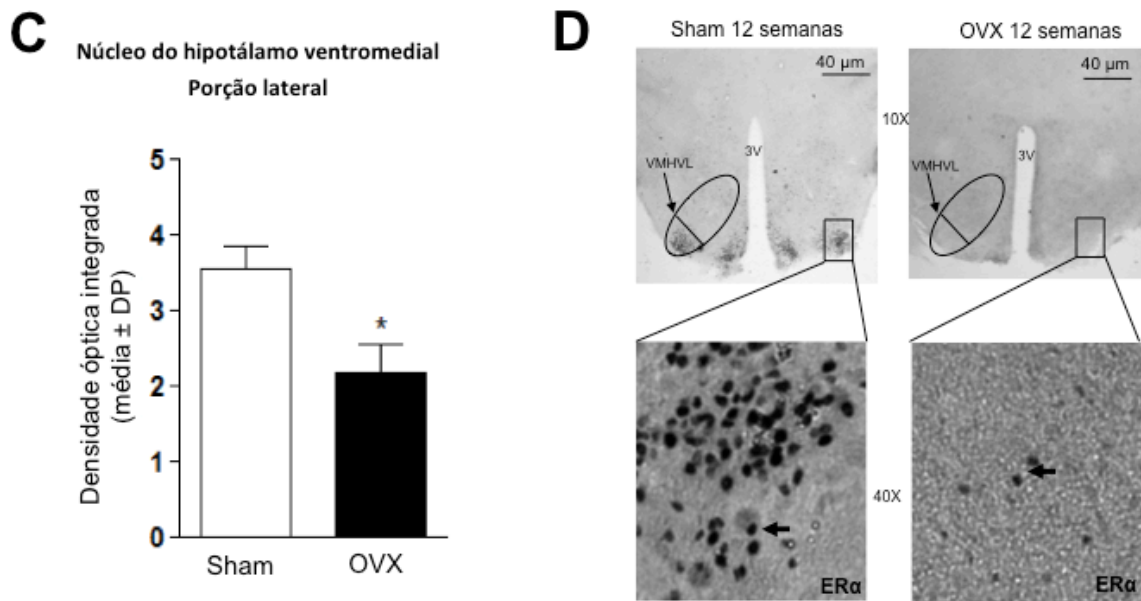


Figura 15. Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na tarefa de RO e eficácia de 12 semanas de OVX na função reprodutiva. **(A)** Os animais foram testados 1 semana (Sham n=13, OVX n=15), 6 semanas (Sham n=9, OVX n= 7) ou 12 semanas (Sham n=6, OVX n=6) após as cirurgias. * (P<0.05) indica diferença entre os grupos Sham e OVX no mesmo tempo analisado. **(B)** Animais eutanasiados após 12 semanas das cirurgias Sham (n=9) e OVX (n=9) tiveram a medida do peso relativo do útero verificada. * (P<0.05) indica diferença entre os grupos **(C)** Alguns animais Sham (n=5) e OVX (n=6) foram perfundidos para a análise da densidade óptica da expressão de ERα na divisão ventrolateral do núcleo do hipotálamo ventromedial. * (P<0.05) indica diferença entre os grupos. **(D)** Imagem ilustrativa da densidade óptica de ERα na divisão ventrolateral do núcleo do hipotálamo ventromedial nos grupos Sham e OVX após 12 semanas de cirurgia.

***A ovariectomia progressivamente induz ao comportamento do tipo-depressivo,
mas não ao comportamento do tipo-compulsivo e anedonia***

As análises da ANOVA de duas vias detectaram alguma interação entre o tempo e a cirurgia ($F_{2,31}=3.7$; $p=0.03$) e o principal efeito do tempo ($F_{2,31}=6.28$; $p=0.005$), mas não da cirurgia ($F_{1,31}=1.89$; $p=0.17$) em camundongos que realizaram o teste de suspensão pela cauda. As análises *post-hoc* demonstraram diferença entre os grupos sham e OVX após 12 semanas de cirurgia ($p<0.001$) (Figura 16A). Para melhor caracterizar o comportamento do tipo-depressivo, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado. Por meio das análises

da ANOVA de duas vias foi possível verificar uma interação entre o tempo e a cirurgia ($F_{2,31}=7.08$; $p=0.002$). Também foram identificados efeitos significativos do tempo ($F_{1,31}=17.29$; $p<0.001$) e cirurgia ($F_{2,31}=14.81$; $p<0.0001$). Houve diferença significativa entre os grupos sham e OVX tanto com 1 semana quanto 12 semanas após as cirúrgicas, demonstrado pelas análises de *post-hoc* (Figura 16B). Esses resultados apontam que, 12 semanas de OVX induziu a um comportamento tipo-depressivo, aumentando o tempo de imobilidade em ambos os testes.

Com relação ao comportamento do tipo-compulsivo, as análises da ANOVA de duas vias não detectaram interação entre os fatores cirurgia e tempo ($F_{2,41}=2.71$; $p=0.07$) bem como o efeito da cirurgia ($F_{1,41}=0.001$; $p=0.96$) mas o efeito principal do tempo ($F_{2,41}=5.61$; $p=0.007$). Por meio das análises *post-hoc* foi possível verificar que o grupo ovariectomizado após 12 semanas reduziu o número de bolinhas enterradas na maravalha em comparação ao grupo sham-controle e os grupos com 6 e 12 semanas de OVX (Figura 16C).

A diminuição da motivação e anedonia são associados à depressão e ao comportamento do tipo-depressivo, no entanto, o presente estudo não detectou esta relação. As análises da ANOVA de duas vias identificaram interação entre os fatores ($F_{1,7}=0.02$; $p=0.96$) e um efeito principal da cirurgia ($F_{1,31}=0.78$; $p=0.4$) e do tempo ($F_{1,31}=17.09$; $p=0.003$), indicando que ambos os grupos preferiram a solução de sacarose 3% após 1 semana de OVX (Figura 16D). Após 6 (Figura 16E) e 12 (Figura 16F) semanas das cirurgias os resultados apontaram que não houve interação entre os fatores tempo e cirurgia (6 semanas: $F_{1,8}=1.54$; $p=0.24$; 12 semanas: $F_{1,8}=1.2$; $p=0.29$) ou o efeito principal da cirurgia (6 semanas: $F_{1,8}=0.14$; $p=0.71$; 12 semanas: $F_{1,8}=0.17$; $p=0.68$). O principal efeito do tempo indicou que ambos os grupos tiveram preferência pela solução de 3% de sacarose durante os tempos analisados (6: $F_{1,8}=12.78$; $p=0.007$; 12: $F_{1,8}=61$; $p<0.0001$), sugerindo que 12 semanas de OVX não ocasionou anedonia.

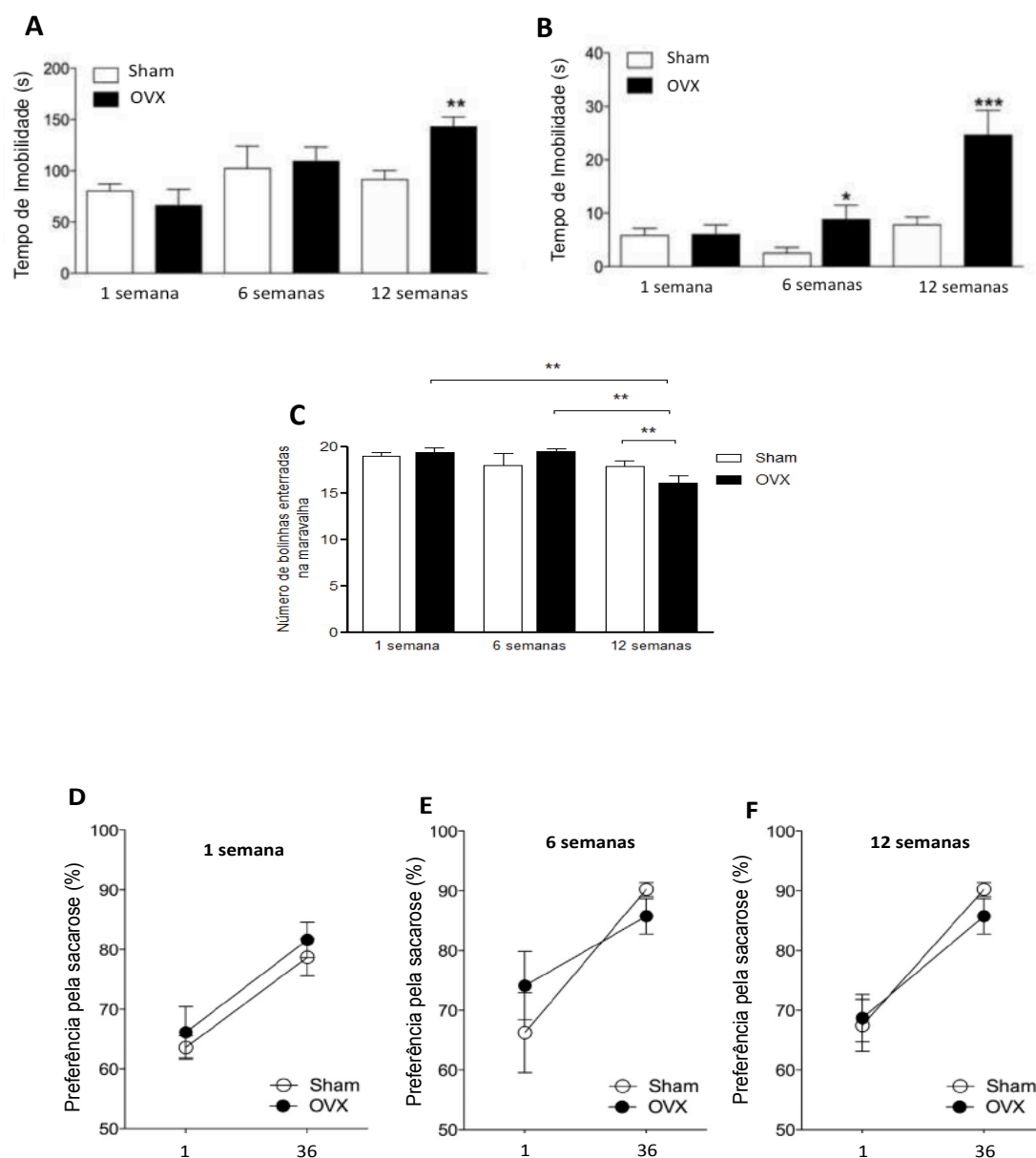


Figura 16. Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX nos comportamentos do tipo-depressivo, do tipo-compulsivo e anedonia. **(A)** Os grupos foram testados na tarefa de suspensão de cauda 1 semana (Sham n=5, OVX n=6), 6 semanas (Sham n=5, OVX n=5) ou 12 semanas (Sham n=9, OVX n=7) após as cirurgias. ** (P<0.01) indica diferenças entre o grupo Sham e OVX no mesmo tempo analisado **(B)** Os grupos foram testados na tarefa de nado forçado 1 semana (Sham n= 5, OVX n=6), 6 semanas (Sham n=6, OVX n=5) ou 12 semanas (Sham n=7, OVX n=6) após as cirurgias. * (P<0.05) e ** (P<0.01) indicam diferenças entre os grupos no mesmo tempo analisado. **(C)** Os grupos foram testados na tarefa de enterrar bolinhas 1 semana (Sham n=8, OVX n=8), 6 semanas (Sham n=6, OVX n=6) ou 12 semanas (Sham n=10, OVX n=10) após as cirurgias. ** (P<0.01) indicam diferenças entre os grupos OVX e entre os animais Sham/OVX após 12 semanas a cirurgia. O teste de preferência pela solução de sacarose 3% foi avaliado 1h e 36 horas após o início do teste. Os mesmos animais foram testados com 1 semana **(D)**, 6 semanas **(E)** e 12 semanas **(F)** após as cirurgias (n=5 por grupo).

A ovariectomia crônica não altera o volume do hipocampo

O volume do hipocampo é sensível às alterações nas desordens psiquiátricas, especialmente na depressão (SHELIN et al., 2002). Assim, o volume do hipocampo foi quantificado em animais sham e OVX após 12 semanas das cirurgias, utilizando-se a técnica de ressonância magnética estrutural por segmentação (MeVisLab- Bremen, Germany). Por meio da ANOVA de duas vias foi possível verificar que não houve nenhuma interação entre os fatores região e cirurgia ($F_{1,16}=0.001$; $p=0.97$) (Figura 17C). Também não houve diferença significativa entre as diferentes regiões do hipocampo analisadas ($F_{1,16}=1.1$; $p=0.3$), ainda que o volume da região dorsal (Figura 17A) foi maior do que a ventral (Figura 17B) em ambos os grupos ($F_{1,16}=181$; $p<0.0001$).

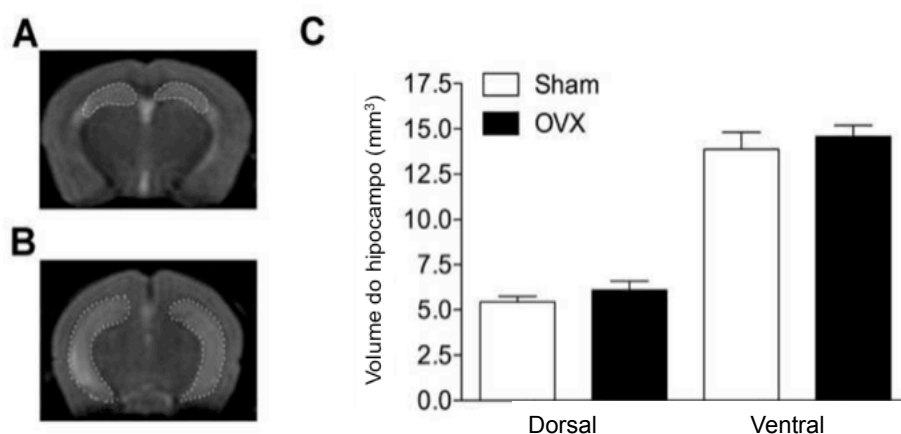


Figura 17. Efeito de 12 semanas de OVX no volume do hipocampo. Os grupos de animais Sham (n=5) e OVX (n=5) após 12 semanas das cirurgias, tiveram seus hipocampus analisados pela Ressonância Magnética Estrutural (RME). Imagens representativas da segmentação do hipocampo dorsal (A) e ventral (B). (C) Quantificação do volume do hipocampo.

A expressão de ERα no hipocampo é sensível à ovariectomia

Uma vez que não foi detectada alteração anatômica no hipocampo ao longo de 12 semanas de OVX, decidimos investigar se a OVX seria capaz de alterar parâmetros neuromoleculares, como a expressão dos ERs no hipocampo. Após 1 semana das cirurgias,

não foi verificada alteração na expressão do ER β no hipocampo ($t(7)=0.9$, $p=0.39$) de ambos os grupos (Figura 18B), no entanto houve diminuição na expressão do ER α ($t(8)=2.36$, $p=0.04$) em animais que se submeteram à OVX (Figura 18A). Por outro lado, após 12 semanas de cirurgia, houve aumento na expressão do ER α no hipocampo somente nos animais ovariectomizados ($t(9)=2.28$, $p=0.04$) (Figura 18C) e novamente não houve alteração na expressão do ER β ($t(11)=0.31$, $p=0.75$) (Figura 18D). Assim, o resultados demonstram que a expressão de ER no hipocampo é sensível às concentrações de estradiol (E_2).

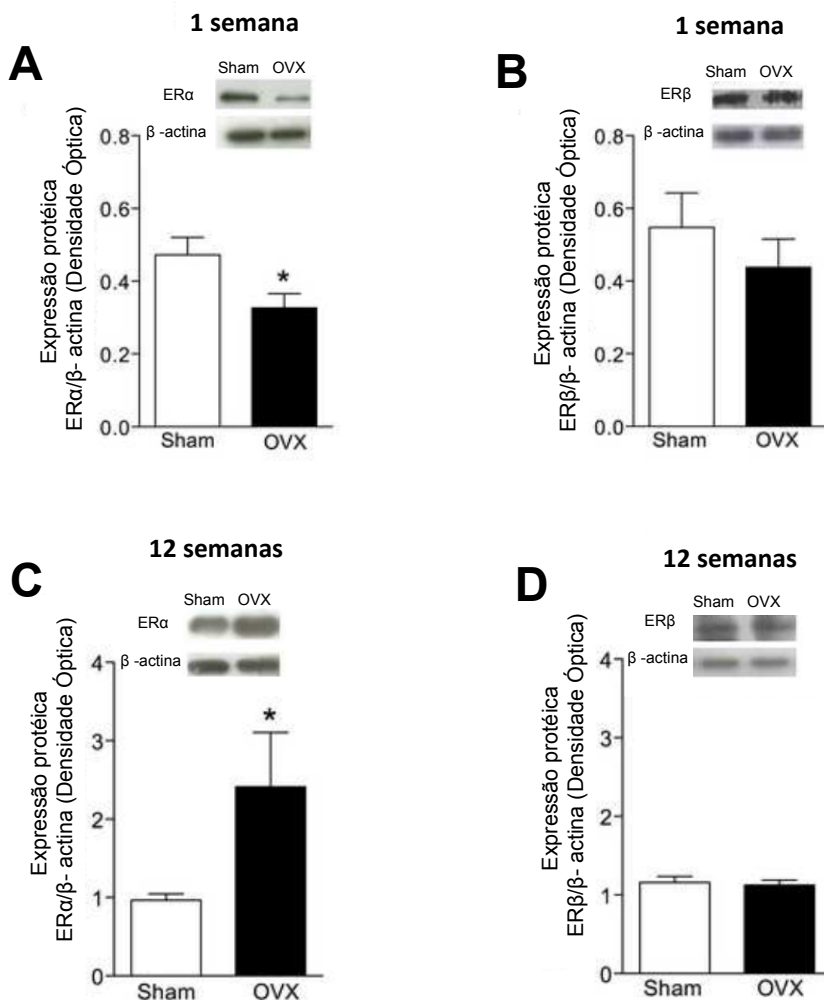


Figura 18. Efeito de 1 e 12 semanas de OVX na expressão protéica de ER α e ER β no hipocampo. Expressão de ER α após (A) 1 semana (Sham=4, OVX=6) e (C) 12 semanas (Sham=6, OVX=5) após as cirurgias. Expressão protéica de ER β após (B) 1 semana (Sham=4, OVX=5) e (D) 12 semanas (Sham=7, OVX=6) após as cirurgias. * ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

A administração de E₂ no hipocampo, nos estágios iniciais da consolidação, previne os déficits de memória causados pela ovariectomia crônica

Uma única dose de E₂ administrada no hipocampo, imediatamente após a sessão de treino na tarefa foi capaz de reverter o déficit encontrado na memória de reconhecimento do objeto novo, após 12 semanas de ovariectomia ($t(5)=2.71$, $p=0.04$) em comparação aos controles (CDX $t(6)=0.87$, $p=0.41$) (Figura 19A). O mesmo efeito não foi verificado quando a administração de E₂ intra-hipocampal ocorreu nos períodos tardios da consolidação, por ex. 3hs após a sessão de treino. Neste caso, o E₂ foi incapaz de reverter o déficit cognitivo (CDX: $t(5)=1.36$, $p=0.22$; E₂: $t(7)=0.42$, $p=0.68$) (Figura 19B).

O próximo experimento visa investigar a relação de causa/consequência entre o aumento na expressão de ER α no hipocampo e o déficit de memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo, após 12 semanas de OVX. Ao ser bloqueado o ER α hipocampal, utilizando-se o antagonista TPBM administrado imediatamente após a sessão de treino, não houve prevenção do déficit de memória de reconhecimento do objeto novo ocasionado por 12 semanas de OVX ($t(5)=0.06$, $p=0.95$), sugerindo nenhuma relação entre o aumento da expressão deste receptor no hipocampo com os danos mnemônicos.

Com o intuito de investigar se a ativação específica dos receptores de estradiol hipocampais seria capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento do objeto novo, os agonistas específicos de ER α (PPT) e ER β (DPN) foram administrados em doses intra-hipocampais já padronizadas (PEREIRA et al., 2014) e imediatamente após a sessão de treino. Os animais do grupo controle, que receberam DMSO 50%, não foram capazes de distinguir o objeto novo do familiar ($t(7)=0.95$, $p=0.37$). Já aqueles que receberam PPT ($t(4)=0.03$, $p=0.03$) e DPN ($t(5)=3.41$, $p=0.01$) tiveram maior tempo de exploração no novo objeto, sugerindo que foram capazes de prevenir o déficit de memória após 12 semanas de

OVX (Figura 19C). A localização da cânula no hipocampo dorsal está representada na figura 19D.

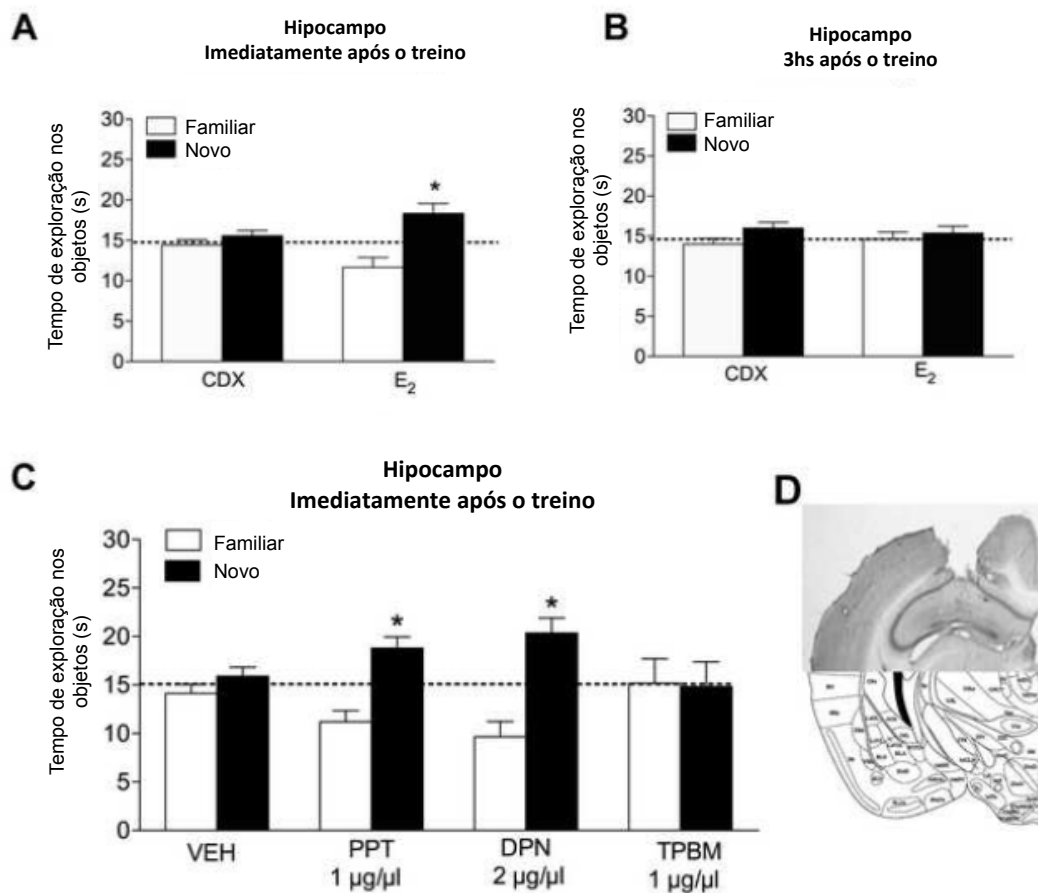


Figura 19. Efeito do E₂, PPT, DPN e TPBM na memória de RON. Os grupos foram ovariectomizados e após 12 semanas tiveram cânulas implantadas bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Os animais receberam 0.5µL/lado de ciclodextrina (CDX) ou estradiol (E₂) (A) imediatamente (CDX n=6, E₂ n=6) ou (B) 3hs após a sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo (CDX n=7, E₂ n=8). (C) Outro grupo de animais recebeu 0.5µL/lado de DMSO 50% (VEH n=8), agonista ER α (PPT n=5), agonista ER β (DPN n=6) ou antagonista ER α (TPBM n=6) imediatamente após o treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo. (D) Imagem ilustrativa da localização da cânula na região CA1 do hipocampo dorsal (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). * (P<0.05) indica diferenças entre o mesmo grupo de acordo com o tempo de exploração no objeto familiar e novo.

A ativação do ER β no hipocampo previne o comportamento do tipo-depressivo causado pela ovariectomia crônica

O efeito antidepressivo do E₂ e DPN, quando administrado no hipocampo, já é conhecido (WALF; FRYE, 2007). Assim, no presente estudo foi investigado se esse efeito antidepressivo poderia ser visualizado mesmo apesar de longos períodos de privação de hormônios ovarianos, como 12 semanas de OVX. As análises da ANOVA de uma via demonstraram que tanto o E₂ e DPN ($F_{3,34}=4.6$; $p=0.008$) foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade dos animais OVX na tarefa de nado forçado, indicando efeito antidepressivo. Já o PPT teve efeito contrário, pois não diminuiu o tempo de imobilidade dos animais na tarefa. (Figura 20B). Concomitantemente, a administração periférica de E₂ teve efeito similar à administração central no hipocampo, em reduzir o tempo de imobilidade dos animais na tarefa de nado forçado, após 12 semanas de OVX ($t(8)=2.33$, $p=0.04$) (Figura 19A).

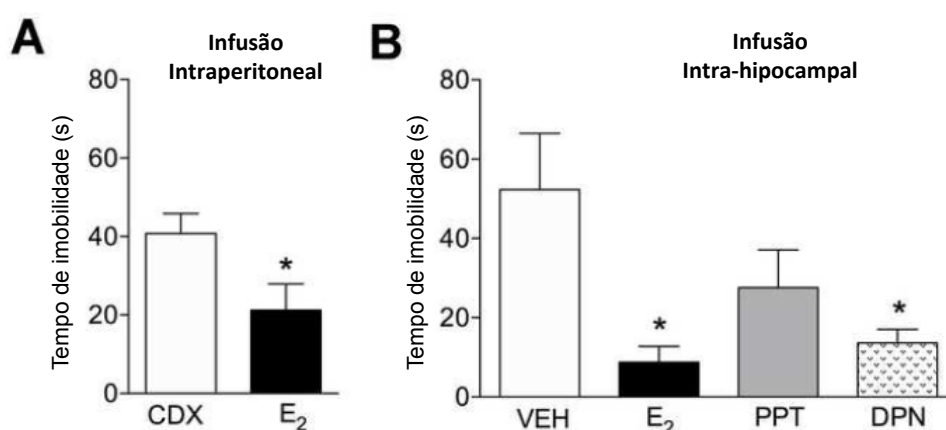


Figura 20. Efeito do E₂, PPT e DPN no comportamento do tipo-depressivo. Os grupos foram ovariectomizados (OVX) e após 12 semanas realizaram a tarefa de nado forçado. **(A)** Os animais receberam ciclodextrina (CDX n=6, E₂ n=6). **(B)** Outro grupo de animais ovariectomizados por 12 semanas, tiveram cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal bilateralmente. 20 minutos antes do teste, os animais receberam 0.5 μ L/lado de DMSO 50% (VEH n=10), estradiol (E₂ n=8), agonista ER α (PPT n=6), agonista ER β (DPN n=10). * ($P<0.05$) indica diferença dos grupos CDX ou VEH.

Tópico 2 - Influência da privação hormonal na memória de condicionamento ao medo e na função afetiva

12 semanas de ovariectomia prejudica a memória de condicionamento ao medo pelo som, mas não pelo contexto

As análises obtidas pela ANOVA de duas vias identificaram uma interação entre os fatores tempo e cirurgia ($F_{2,37}=8.59$; $p=0.0009$) e um efeito principal do tempo ($F_{2,37}=14.98$; $p<0.0001$), mas não da cirurgia ($F_{1,37}=2.35$; $p=0.1340$) em animais que foram submetidos à tarefa de condicionamento ao medo pelo som. As análises *post-hoc* demonstraram diferença entre os grupos sham e OVX após 12 semanas de cirurgia ($p<0.001$) (Figura 21A).

Entretanto, não houve interação entre os fatores tempo e cirurgia ($F_{2,41}=1.07$; $p=0.3519$) em camundongos que realizaram a tarefa de condicionamento ao medo pelo contexto (Figura 21B).

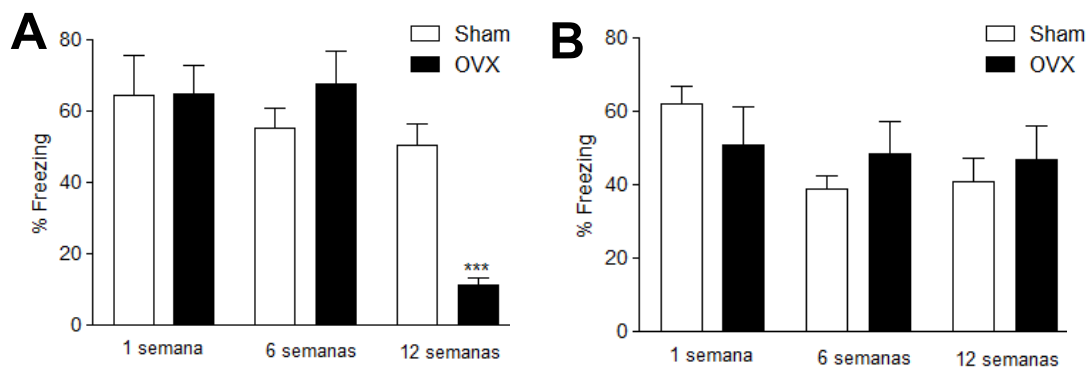


Figura 21. Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na memória de condicionamento ao medo. **(A)** Os grupos foram condicionados ao medo pelo som 1 (Sham n=5, OVX n=5), 6 (Sham n= 10, OVX n=7) e 12 (Sham n=6, OVX n=10) semanas após as cirurgias sham e OVX. **(B)** Condicionamento ao medo pelo contexto após 1 (Sham n=5, OVX n=5), 6 (Sham n=10, OVX n=7) e 12 (Sham n=6, OVX n=10) semanas após as cirurgias sham e OVX. *** ($P<0.001$) indica diferença entre os grupos no mesmo tempo analisado

A ovariectomia induz à hipolocomoção e ao comportamento do tipo-ansiedade

No experimento a seguir, o objetivo foi verificar se a atividade locomotora dos animais com 12 semanas de OVX poderia estar comprometida de maneira a justificar a ausência do comportamento de *freezing*.

As análises da ANOVA de duas vias detectaram interação entre os fatores tempo e cirurgia ($F_{2,54}=3.73$; $p=0.0303$) para a atividade locomotora e o efeito da cirurgia ($F_{2,54}=3.23$; $p=0.0474$) e do tempo ($F_{1,54}=11.95$; $p=0.0011$) (Figura 22A). Diferenças entre os grupos foram identificadas pelo pós-teste de Bonferroni após 12 semanas das cirurgias, onde animais OVX tiveram redução da atividade locomotora em comparação aos seus controles, contraditoriamente ao que inicialmente foi hipotetizado.

A amígdala participa da modulação do comportamento do tipo ansiedade (TYE et al., 2011) e em decorrência do prejuízo já verificado na memória amígdala-dependente, questionou-se se 12 semanas de OVX poderia ocasionar um comportamento do tipo-ansiedade. As análises da ANOVA de duas vias detectaram interação entre os fatores tempo e cirurgia ($F_{2,61}=6.78$; $p=0.0022$) e o efeito do tempo ($F_{2,61}=5.74$; $p=0.0052$) e da cirurgia ($F_{1,61}=8.56$; $p=0.0048$). As análises *post-hoc* demonstraram diferença entre os grupos sham e OVX após 6 ($p<0.01$) e 12 ($p<0.05$) semanas de cirurgia, indicando a presença de comportamento do tipo-ansiedade. (Figura 22B).

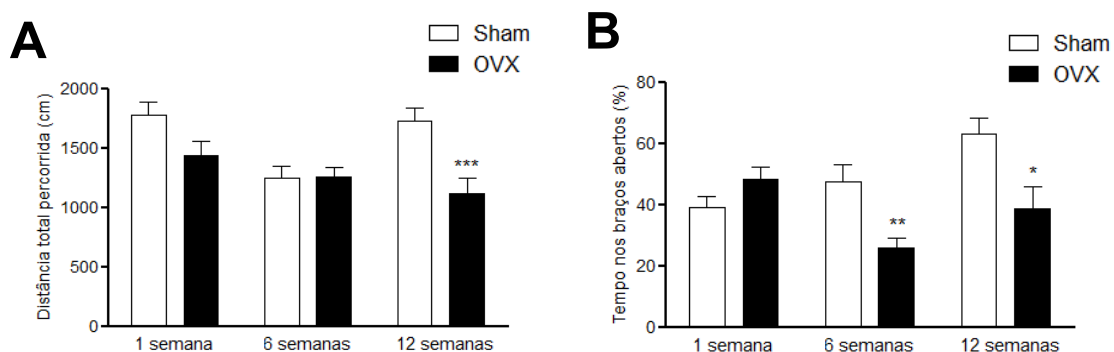


Figura 22. Efeito de 1, 6 e 12 semanas de OVX na atividade locomotora na arena e no comportamento do tipo-ansiedade na tarefa de labirinto em cruz elevado. **(A)** A atividade locomotora foi analisada 1 (Sham n=10, OVX n= 11), 6 (Sham n=10, OVX n=8) e 12 (Sham n=7, OVX n=8) após as cirurgias Sham e OVX. **(B)** Os grupos foram testados 1 (Sham n=12, OVX n= 14), 6 (Sham n=12, OVX n=15) e 12 (Sham n=8, OVX n=6) após as cirurgias Sham e OVX. * (P<0.05), ** (P<0.01) e *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos no mesmo tempo analisado.

A ovariectomia crônica prejudica a memória de condicionamento ao medo pelo som e altera o padrão de ativação dos núcleos da amígdala

Considerando o prejuízo na memória de condicionamento ao medo pelo som encontrado após 12 semanas de OVX e papel do complexo amigdalóide para a consolidação desta memória, nós nos perguntamos se haveriam mudanças no perfil de ativação deste substrato. As análises comportamentais realizadas pela ANOVA de duas vias identificaram uma interação entre os fatores condicionamento e cirurgia ($F_{1,25}=21.91$; $p<0.0001$), bem como o efeito do tempo ($F_{1,25}=41.93$; $p<0.0001$) e da cirurgia ($F_{1,25}=63.73$; $p<0.0001$) na % de *freezing* entre os grupos de animais não condicionados (controles) e condicionados pelo som. O teste *post-hoc* demonstrou que a resposta de *freezing* foi maior nos animais do grupo controle que foram condicionados em comparação aos controles não condicionados e naqueles condicionados ovariectomizados ($p<0.001$), neste último reproduzindo os dados já encontrados de prejuízo na memória de medo condicionada pelo som induzido pela

ovariectomia (Figura 23). A avaliação quantitativa da expressão gênica de c-Fos revelou alterações significativas no perfil de ativação do complexo amigdalóide nos animais sham e OVX não condicionados e após o condicionamento ao medo pelo som. A expressão de c-Fos foi verificada na amígdala nos núcleos lateral (LA), basolateral (BLA), porção lateral do núcleo central (CEL) e na porção medial do núcleo central (CEM) (Figura 24A). A marcação das células c-Fos positivas estão ilustradas no aumento de 40x na figura 24B.

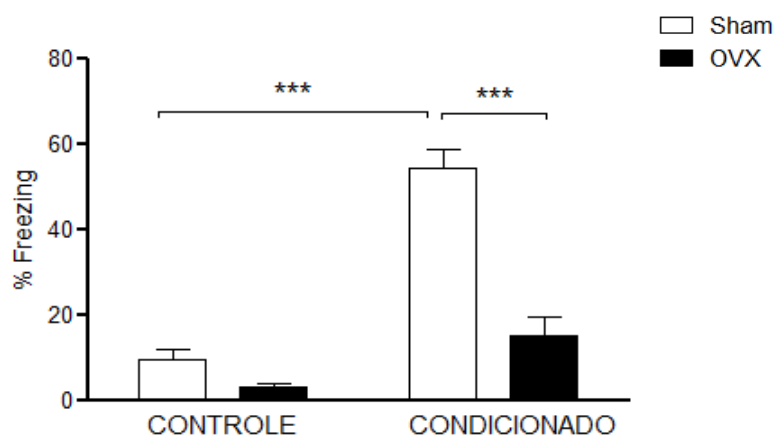


Figura 23. Efeito de 12 semanas de OVX na memória de condicionamento ao medo em animais controles (não condicionados) (sham n=7; OVX n= 7) e condicionados (sham n=7; OVX n=8). Análise quantitativa da resposta de *freezing* não condicionada (exposição ao som) e condicionada pelo som em animais. *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

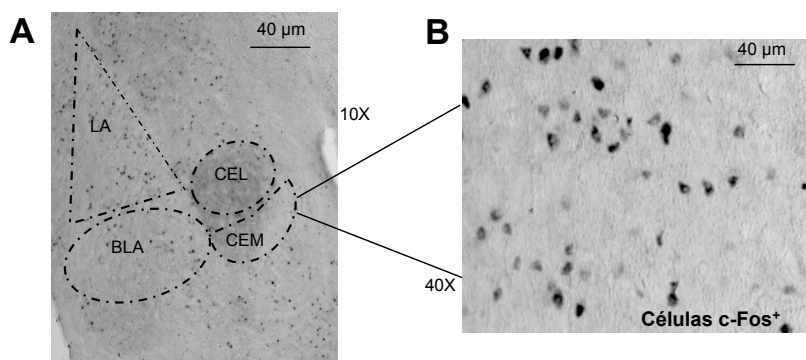


Figura 24. Desenho esquemático das áreas consideradas para quantificação de c-Fos pós-condicionamento pelo medo. (A) Desenho esquemático dos núcleos do complexo amigdalóide considerados para a quantificação de células c-Fos positivas no aumento de 10x. (B) Imagem ilustrativa das células c-Fos positivas no aumento de 40x.

A ovariectomia crônica aumenta a ativação do núcleo lateral (LA) da amígdala pós condicionamento pelo som

No núcleo lateral da amígdala não foi detectada interação entre ambos os fatores condicionamento e cirurgia ($F_{1,23}=4.02$; $p=0.061$), no entanto houve o efeito principal do condicionamento ($F_{1,23}=4.58$; $p=0.043$) e não da cirurgia ($F_{1,23}=0.028$; $p=0.866$) em animais que realizaram o teste de memória de condicionamento ao medo pelo som. As análises *post-hoc* identificaram que houve aumento na expressão de c-Fos no núcleo lateral em animais ovariectomizados condicionados quando comparados aos respectivos controles não condicionados ($p<0.05$) (Figura 25A). As imagens ilustrativas são representativas das diferenças obtidas na expressão de c-Fos entre os grupos controles não condicionados sham (Figura 25B) e OVX (Figura 25D) e nos grupos submetidos ao condicionamento sham (Figura 25C) e OVX (Figura 25E).

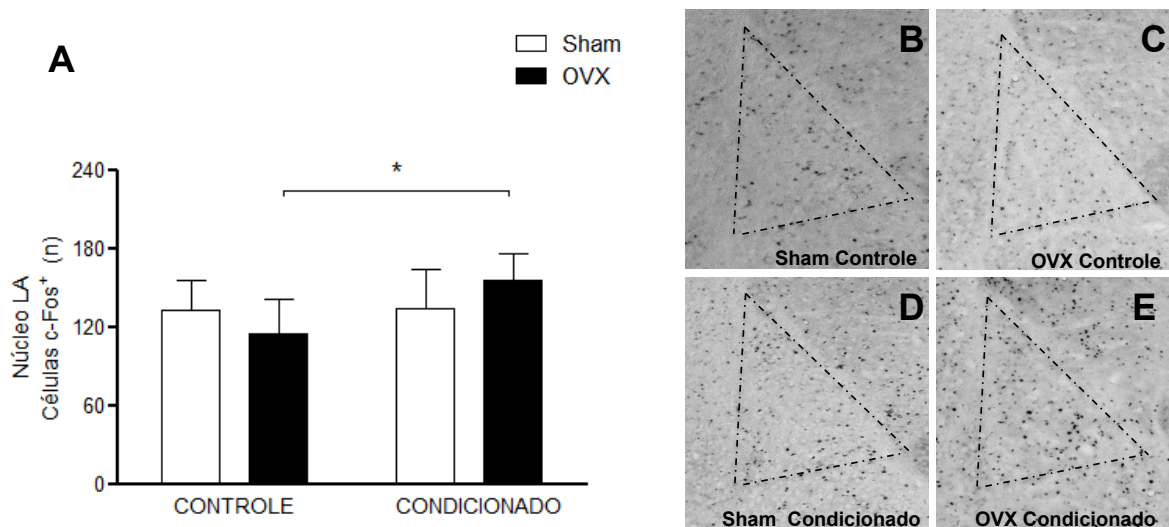


Figura 25. Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo lateral (LA) da amígdala pós condicionamento ao medo. **(A)** Quantificação de células c-Fos positivas nos grupos controles expostos somente ao som (Sham n=7, OVX n=7) e condicionados ao medo pelo som (Sham n=5, OVX n=7). Imagens ilustrativas da marcação de c-Fos nos diferentes grupos analisados: sham controles **(B)** e condicionados **(D)**; OVX controles **(C)** e condicionados **(E)**. * ($P<0.05$) indica diferença entre os grupos.

A ovariectomia crônica aumenta a ativação do núcleo basolateral (BLA) da amígdala pós condicionamento pelo som

As análises da ANOVA de duas vias detectaram, no núcleo basolateral da amígdala, nenhuma interação entre os fatores condicionamento e cirurgia ($F_{1,20}=3.989$; $p=0.0060$), no entanto houve o principal efeito do condicionamento ($F_{1,20}=4.385$; $p=0.04$) e da cirurgia ($F_{1,20}=11.18$; $p=0.0032$) em camundongos submetidos ao condicionamento ao medo pelo som. As diferenças entre os grupos foram identificadas pelo teste *post-hoc*, que evidenciou aumento na expressão de c-Fos apenas no grupo OVX condicionado em comparação aos grupos: sham condicionados ($p<0.01$) e os grupos controles não condicionados sham ($p<0.001$) e OVX ($p<0.001$) (Figura 26A). As imagens obtidas pela imunohistoquímica demonstram as diferenças entre os diferentes grupos de animais controles sham (Figura 26B) e OVX (Figura 26D) e submetidos ao condicionamento ao som sham (Figura 26C) e OVX (Figura 26E).

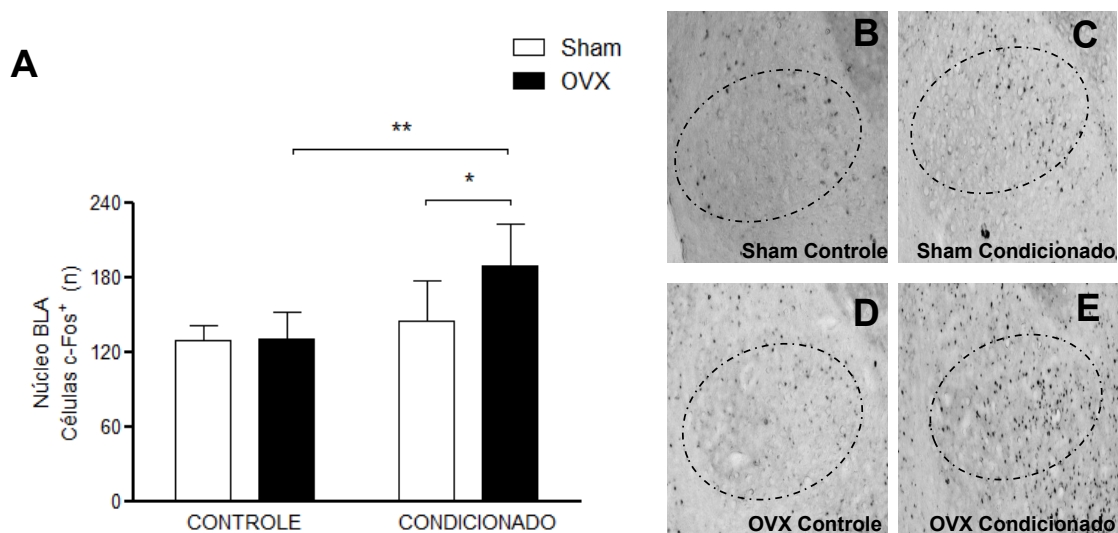


Figura 26. Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo basolateral (BLA) da amígdala pós condicionamento ao medo. (A) Quantificação de células c-Fos positivas nos grupos controles expostos somente ao som (Sham n=7, OVX n=7) e condicionados ao medo pelo som (Sham n=6, OVX n=7). Imagens ilustrativas da marcação de c-Fos nos diferentes grupos analisados: sham controles (B) e condicionados (D); OVX controles (C) e condicionados (E).** ($P<0.01$) e *** ($P<0.001$) indicam diferenças entre os grupos.

A ovariectomia crônica aumenta a ativação da porção lateral do núcleo central (CEL) da amígdala pós condicionamento

Quanto à expressão de c-Fos no núcleo central da amígdala, as análises da ANOVA de duas vias demonstraram que houve interação entre os fatores condicionamento e tempo, tanto na porção lateral ($F_{1,22}=12.07$; $p=0.0021$) quanto na medial ($F_{1,22}=11.82$; $p=0.0023$), em camundongos sham e ovx que foram condicionados na tarefa ou não. Desta maneira, prosseguimos com as análises utilizando o test t de uma amostra. Foi identificada redução na expressão de c-Fos na porção lateral do núcleo central em animais OVX controles comparados aos sham controles ($t(12)=2.708$ $p=0.01$). Entretanto, após o condicionamento pelo som, a expressão de c-Fos em animais ovariectomizados aumentou em relação aos controles condicionados ($t(10)=2.236$ $p=0.04$) (Figura 27A). As figuras 27B a 27E ilustram as diferenças entre os grupos na expressão de células c-Fos positivas/área.

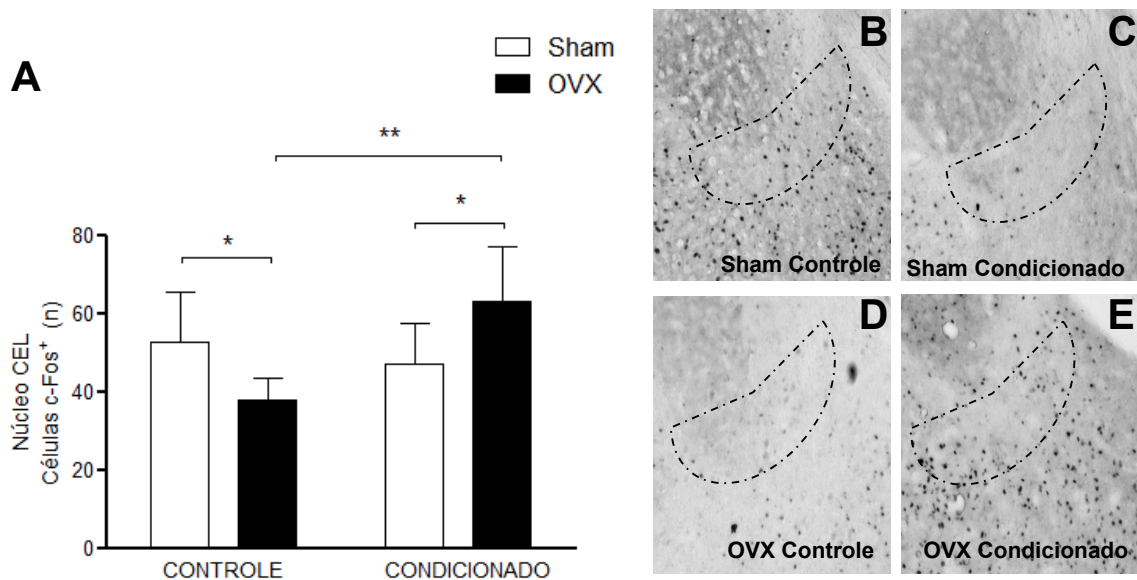


Figura 27. Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo núcleo central (CEL) da amígdala pós condicionamento ao medo. (A) Quantificação de células c-Fos positivas nos grupos controles expostos somente ao som (Sham n=6, OVX n=7) e condicionados ao medo pelo som (Sham n=5, OVX n=7). Imagens ilustrativas da marcação de c-Fos nos diferentes grupos analisados: sham controles (B) e condicionados (D); OVX controles (C) e condicionados (E). * ($P<0.05$) e ** ($P<0.01$) indicam diferenças entre os grupos.

A ovariectomia crônica aumenta a ativação da porção medial do núcleo central (CEM) da amígdala pós condicionamento

O perfil de ativação da porção medial do núcleo central da amígdala foi similar ao encontrado para a porção lateral. Animais ovariectomizados e expostos somente ao som apresentaram uma diminuição na expressão de c-Fos neste núcleo ($t(10)=4.181$ $p=0.001$) e, após serem condicionados, houve aumento significativo na expressão desta proteína ($t(10)=2.293$ $p=0.04$). (Figura 28A). Pelas análises qualitativas é possível visualizar as diferenças encontradas na quantidade de células c-Fos positivas ativadas/área nos grupos controles sham (Figura 28B) e OVX (Figura 28D) e nos grupos sham (Figura 28C) e OVX (Figura 28E) condicionados.

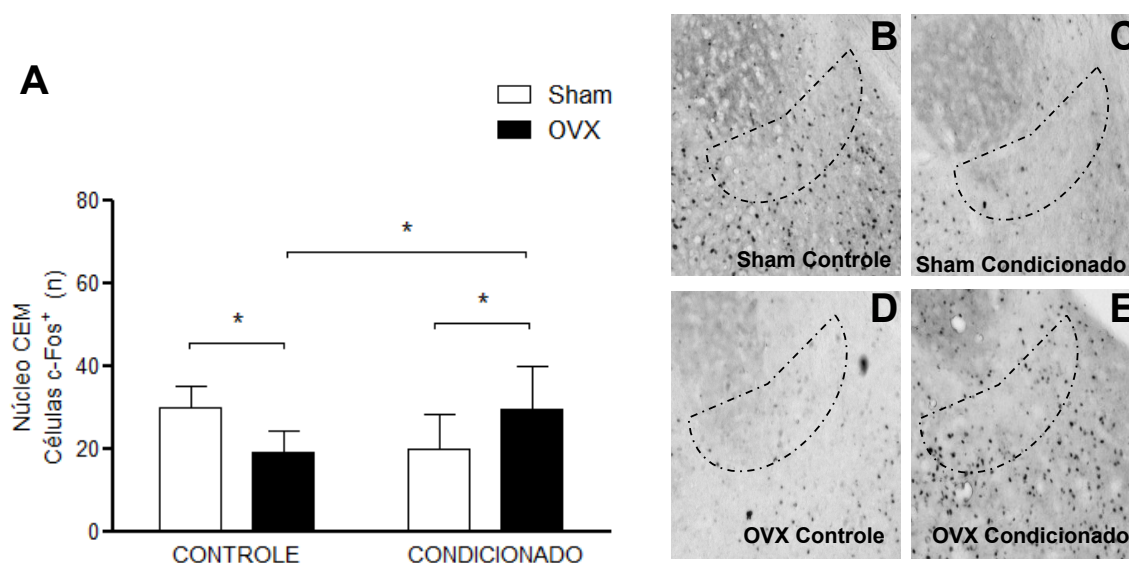


Figura 28. Efeito de 12 semanas de OVX no perfil de ativação do núcleo central da amígdala (CEM) pós condicionamento ao medo. (A) Quantificação de células c-Fos positivas nos grupos controles expostos somente ao som (Sham n=7, OVX n=7) e condicionados ao medo pelo som (Sham n=6, OVX n=7). Imagens ilustrativas da marcação de c-Fos nos diferentes grupos analisados: sham controles (B) e condicionados (D); OVX controles (C) e condicionados (E). * ($P<0.05$) e *** ($P<0.001$) indicam diferenças entre os grupos.

A administração de E₂ sistêmico e na amígdala não previne o prejuízo na memória de condicionamento; sistemicamente o E₂ não altera o comportamento do tipo-ansiedade

A ação promnésica do estradiol já é descrita na literatura (FERNANDEZ et al, 2008, PEREIRA et al, 2014). Para testar se a recuperação da modulação estrogênica no complexo amigdalóide seria capaz beneficiar a memória de condicionamento ao medo pelo som na consolidação deste aprendizado, os grupos então receberam a administração intra-amígdala de E₂ e veículo (ciclodextrina –CDX). Como foi observado previamente que o E₂ no hipocampo administrado imediatamente após o treino na tarefa de RON foi capaz de prevenir os danos cognitivos causados por 12 semanas de OVX, foi questionado se, neste caso, a memória de condicionamento ao medo também pudesse ser favorecida pelo efeito do E₂ agindo na consolidação desta memória. Desta maneira, os animais receberam E₂ imediatamente após serem treinados na tarefa de condicionamento ao medo pelo som, no entanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi detectada ($t(8)=0.581$, $p=0.57$) (Figura 29B).

O próximo experimento teve como objetivo verificar se a sinalização de E₂ no complexo amigdalóide na fase de aquisição da memória pudesse ser benéfica, entretanto, novamente não foi verificada diferença significativa entre os grupos na administração de E₂ 20min antes da sessão de treino na tarefa de condicionamento ao medo ($t(9)=0.467$, $p=0.65$) (Figura 29A). Por último, administramos o E₂ sistemicamente e os animais foram submetidos treinados e testados na tarefa de condicionamento ao medo pelo som e resultado semelhante aos anteriores foram detectados, com a resposta de *freezing* similar entre os grupos ($t(9)=1.552$, $p=0.155$) (Figura 29C).

O estradiol é também conhecido por seu efeito ansiolítico em camundongos. Esta hipótese foi testada e, após a administração de E₂ sistemicamente, 20 min antes da tarefa de labirinto em cruz elevado, não foi verificada diferença significativa no tempo de permanência dos animais nos braços abertos de ambos os grupos ($t(12)=1.27$, $p=0.2281$) (Figura 29D).

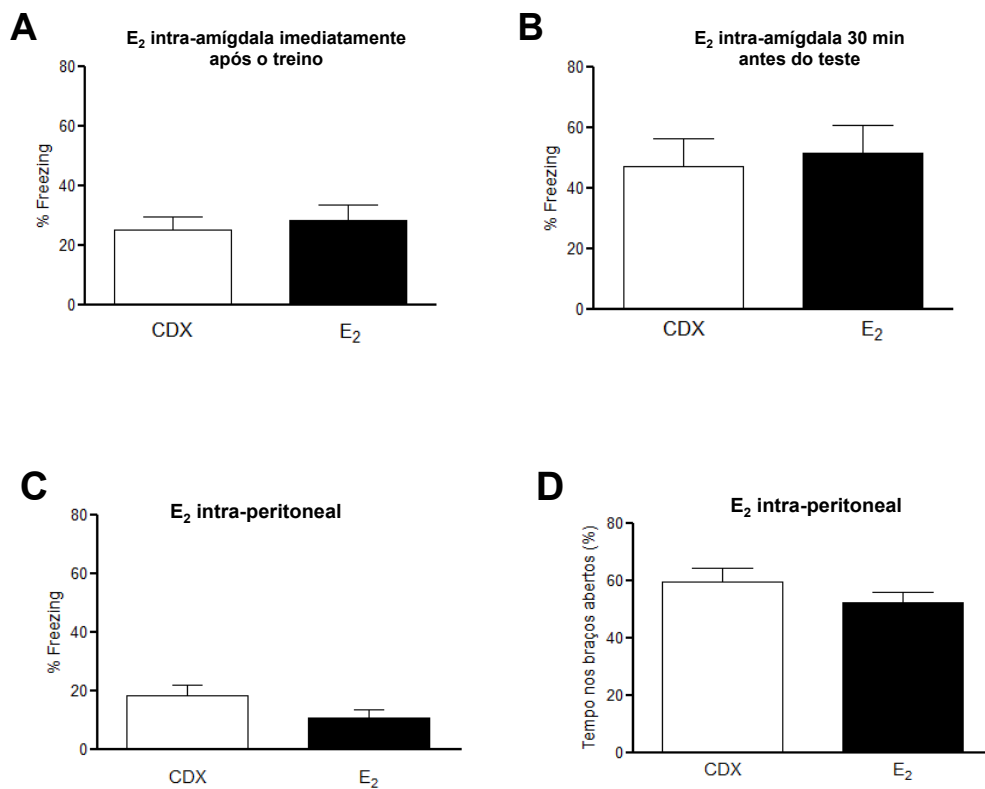


Figura 29. Efeito da administração de E₂ na memória de condicionamento ao medo pelo som e no comportamento do tipo-ansiedade. **(A)** Os grupos receberam a administração de E₂ intra-amígdala 20min antes da sessão de treino (CDX n=6, E₂ n=5), **(B)** imediatamente após a sessão de treino (CDX n=5, E₂ n=5) e **(C)** periféricamente (CDX n=6, E₂ n=5) para serem testados na tarefa de condicionamento ao medo pelo som. O tempo de *freezing* não diferiu entre os grupos que receberam veículo (CDX), indicando nenhum efeito do E₂ em prevenir o prejuízo cognitivo. **(D)** A administração periférica de E₂ também não aumentou o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, indicando efeito não ansiolítico do E₂ (CDX n=7, E₂ n=7).

Os principais resultados de acordo com variáveis comportamentais e neuromoleculares analisadas estão esquematizados na Tabela 4 abaixo:

VARIÁVEIS	1 semana OVX	6 semanas OVX	12 semanas OVX	
			+ E ₂	
<i>Comportamentais</i>				
Memória de RON	✓	✓	×	✓ PPT e DPN hipocampo
Memória de Medo	✓	✓	×	×
Comportamento tipo-depressivo	✓	×	×	✓ DPN hipocampo e i.p.
Comportamento tipo-ansiedade	✓	×	×	×
Comportamento tipo-compulsivo	✓	✓	✓	—
Atividade Locomotora	✓	✓	×	—
<i>Neuromoleculares</i>				
Expressão de ER α				
Hipocampo	↓		↑	
Hipotálamo (VMHVL)	—		↓	
Expressão de ER β				
Hipocampo	⊙	—	⊙	
Expressão de c-Fos				
BLA			↑	Após o condicionamento ao medo pelo som
LA	—		↑	
CEL			↑	
CEM			↑	

Tabela 4. Representação esquemática dos resultados dos tópicos 1 e 2. Legenda: ✓ função preservada; × função prejudicada; ↑ aumento; ↓ diminuição; ⊙ sem alteração; — não avaliado.

Capítulo II

Doutorado Sanduíche: Papel do estradiol no comportamento do tipo-compulsivo, do tipo-ansiedade e na cognição em um modelo experimental de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) não induzido após a ovariectomia aguda.

6. Justificativa

Os dados clínicos e genéticos no TOC demonstram que há um dimorfismo sexual, e que os sintomas parecem variar de acordo com os efeitos modulatórios dos hormônios ovarianos. Além disso, os tratamentos de primeira linha para o TOC, são os inibidores da recaptação de serotonina, no entanto, muitos pacientes permanecem parcialmente ou completamente não responsivos ao tratamento medicamentoso.

Dessa forma, investigar como os estrogênios modulam a compulsão se faz necessário, para que os eventos reprodutivos que ocorrem ao longo da vida mulher, em especial nas que sofrem com o TOC, possam ser amenizados e futuras terapias possam ser consideradas.

7. Objetivos

7.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do estradiol nas alterações cognitiva e afetiva causadas pela privação aguda de hormônios ovarianos em um modelo experimental de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) não induzido.

7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o efeito de 10 dias de ovariectomia no comportamento do tipo-compulsivo;
- ✓ Verificar o efeito de 10 dias de ovariectomia no comportamento do tipo-ansiedade;
- ✓ Verificar o efeito de 10 dias de ovariectomia na memória de reconhecimento do objeto novo;
- ✓ Identificar as concentrações periféricas de E₂ e progesterona após 10 dias de ovariectomia e nos grupos sham-controles;
- ✓ Identificar as concentrações hipocámpicas de BDNF após 10 dias de ovariectomia e nos grupos sham-controles;
- ✓ Verificar se a administração intra-peritoneal de E₂ reverte os comportamentos do tipo-compulsivo e do tipo-ansiedade;
- ✓ Verificar o efeito da administração intra-peritoneal de E₂ na memória de RON.

8. Materiais e Métodos

8.1 Animais experimentais

O capítulo II foi desenvolvido durante o estágio de doutorado sanduíche na Universidade do Alaska Fairbanks (UAF) - EUA. Foram utilizados camundongos fêmeas selecionados geneticamente com comportamento do tipo-compulsivo não induzido (BIG nest builders) e animais controles, com 8-10 semanas de idade, fornecidos pelo biotério da UAF (BiRD-Biological Research and Diagnostics Facility). Os animais foram mantidos no máximo três por gaiola, em uma sala com a temperatura ambiente mantida à $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de 40-70% e controle do ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Todos os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo. Os animais tiveram livre acesso à água e ração.

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UAF (IACUC - Institutional Animal Care and Use Committee) aprovou previamente os experimentos: experimentos comportamentais e de análises bioquímicas (568518-2) (Anexo 2) e os experimentos de infusão de E_2 (631126-6) (Anexo 3).

8.2 Cirurgia de ovariectomia (OVX)

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução a 3%, manutenção entre 1.5-2%). A região abdominal lateral foi tricotomizada e higienizada com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI). A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente na região abaixo da última vértebra lombar e os ovários foram expostos e removidos. Os animais sham tiveram somente os ovários identificados, expostos e recolocados na cavidade abdominal sem a sua remoção. O procedimento foi realizado bilateralmente em cada animais (FONSECA et al., 2013). Todos os experimentos comportamentais e de análises bioquímicas foram conduzidos

após 10 dias das cirurgias sham e/ou OVX.

8.3 Testes comportamentais

8.3.1 Construir ninhos

O comportamento de construir ninhos é um parâmetro amplamente utilizado e eficaz para inferir sobre o comportamento do tipo-compulsivo em roedores. O teste baseia-se na premissa de que animais com comportamento tipo-compulsivo tendem a utilizar mais material para construir seus ninhos. No primeiro dia, os camundongos foram colocados individualmente nas gaiolas e receberam no topo de cada grade, um rolo de algodão previamente pesado. No segundo dia, os rolos de algodão foram retirados, novamente pesados, os animais reagrupados e transferidos para gaiolas limpas. O escore total foi definido pela quantidade de algodão utilizada por um período de 24 horas de teste, dado pelo seguinte cálculo: peso inicial do rolo de algodão/ peso final do rolo de algodão (GREENE-SCHLOESSER et al., 2011).

8.3.2 Enterrar bolinhas na maravalha

É um também utilizado para detectar o comportamento do tipo-compulsivo. Os animais foram individualmente colocados em uma caixa de acrílico (37cm x 21cm x 14cm) contendo 20 bolinhas de gude separadas entre si. As bolinhas são colocadas por cima da maravalha, que foi colocada a uma profundidade de 5cm na caixa. A duração do teste é de 20min e ao final foi mensurado o número de bolinhas, no mínimo 2/3 enterradas na maravalha. O comportamento do tipo-compulsivo é atribuído ao maior número de bolas de gude enterradas (GREENE-SCHLOESSER et al., 2011).

8.3.3 Campo aberto

O teste de campo aberto possibilita a análise da atividade locomotora (número total de entradas nos quadrantes) e do comportamento do tipo-ansiedade (mensuração da permanência do animal no centro do campo aberto). Além disso é uma excelente ferramenta para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas (PRUT; BELZUNG, 2003). Os animais foram individualmente colocados em uma arena de acrílico (39cm x 39cm x 30cm), separadas por 25 quadrantes e durante um período de 3 minutos foram quantificados o número de entradas nos quadrantes centrais da arena. A preferência do animal por entrar mais vezes no espaço central é um indicativo do comportamento do tipo-ansiedade (VAN DER WEE et al., 2007).

8.3.4 Reconhecimento do objeto novo (RON)

O teste de reconhecimento do objeto novo acessa uma memória não espacial hipocampo-dependente. No primeiro dia, os animais foram habituados individualmente a uma caixa de acrílico (37cm x 21cm x 14cm) por 3min. No próximo dia, foram colocados na mesma caixa e foi permitida a exploração a dois objetos idênticos por 3min. Para testar a memória de curta duração, após um intervalo de 4 horas do treino, os animais foram testados na tarefa, com a colocação de um objeto novo no lugar de um objeto familiar (previamente conhecido pelo animal). O tempo de exploração foi considerado quando o animal tocou com as patas dianteiras, as vibrissas ou com o nariz os objetos. O índice de reconhecimento (IR) foi a medida calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{Tempo de exploração no novo objeto}}{\text{Tempo de exploração total nos objetos}}$$

O valor do IR pode variar de 0 a 1. Valores de IR iguais a 0.5 equivale ao tempo de

exploração igual no objeto novo e no familiar. Quando este valor é maior de 0.5 significa que o animal permaneceu mais tempo que a chance na exploração do novo objeto, sugerindo a preferência do animal pelo mesmo, neste caso, apresentando este tipo de memória intacta (FONSECA et al., 2013).

8.4 Dosagem das concentrações de 17 β -estradiol, progesterona e BDNF (ELISA)

As concentrações séricas de 17 β -estradiol/progesterona (Cayman chemical, Ann Arbor) e de BDNF hipocampal (Promega, Madison, WI) foram determinados utilizando-se os kits para análise imunoenzimática (ELISA), seguindo os protocolos de instruções dos fabricantes.

Para as dosagens das concentrações séricas de 17 β -estradiol e progesterona, foram utilizadas placas de 96 poços revestidas com anticorpo anti-coelho IgG origem de camundongo, onde foram adicionadas as amostras, a curva padrão, o traço de estradiol/progesterona conjugado e o anticorpo primário de coelho anti-17 β -estradiol e anti-progesterona. Depois da incubação por 60min em temperatura ambiente, os poços foram lavados por 5 vezes e novamente incubados por 60min com o reagente Ellman, que contém o substrato de ligação para produzir a reação colorimétrica. Os dados foram expressos por pg/ml. Para a dosagem de BDNF no hipocampo, método semelhante ao descrito acima foi utilizado, acrescido do tratamento ácido nas amostras para se atingir o pH < 3 com 1N de HCL, incubados por 15min à temperatura ambiente, seguidos por neutralização do pH à aproximadamente 8 com 1N de NaOH. Este tratamento é utilizado pois aumenta a biodisponibilidade dessa proteína. Os homogenatos tratados foram então incubados em placa de 96 poços revestidas com anticorpo anti-BDNF.

Utilizando um espectrofotômetro (ELX800, Universal Microplate Reader, BIOTEK) as absorbâncias foram mensuradas e os cálculos para a dosagens das concentrações das

proteínas em questão foram realizados, normalizando-se pela quantidade de proteína total por amostra.

8.5 Administração de estradiol

Os animais foram ovariectomizados e após 8 dias receberam 17 β -Estradiol (Sigma-Aldrich) na dose de 0.1mg/kg (WALF et al., 2008). O 17 β -Estradiol foi suspenso em óleo de milho 100% (Sigma Aldrich) e administrado subcutâneo, na região do dorso da nuca do animal. O grupo controle recebeu apenas óleo de milho como veículo.

Para a realização dos experimentos comportamentais nos testes de construir ninhos, enterrar bolinhas e campo aberto, os animais receberam uma única dose de 17 β -Estradiol 48 horas antes dos testes (WALF et al., 2008). Na tarefa de reconhecimento do objeto novo, a administração da droga ocorreu imediatamente após a sessão de treino (FERNANDEZ et al., 2008) no nono dia de ovariectomia.

8.6 Delineamento Experimental

Experimentos 1 e 2

O experimento 1 teve como objeto verificar o efeito de 10 dias de ovariectomia nos comportamentos do tipo-compulsivo, do tipo-ansiedade e na memória de reconhecimento do objeto novo. Para tanto, os animais do grupo controle e BIG nest builders foram inicialmente submetidos às cirurgias Sham-controle/OVX e assim subdivididos em 2 grupos. Os grupos foram testados após 10 dias das cirurgias nas seguintes tarefas: construir ninhos, enterrar bolinhas, campo aberto e reconhecimento do objeto novo (RON).

Para a realização do experimento 2, após as tarefas comportamentais, os animais foram eutanasiados e o sangue e hipocampus foram coletados para os experimentos das

dosagens das concentrações séricas de E_2 /progesterona e de BDNF, respectivamente (Figura 30).

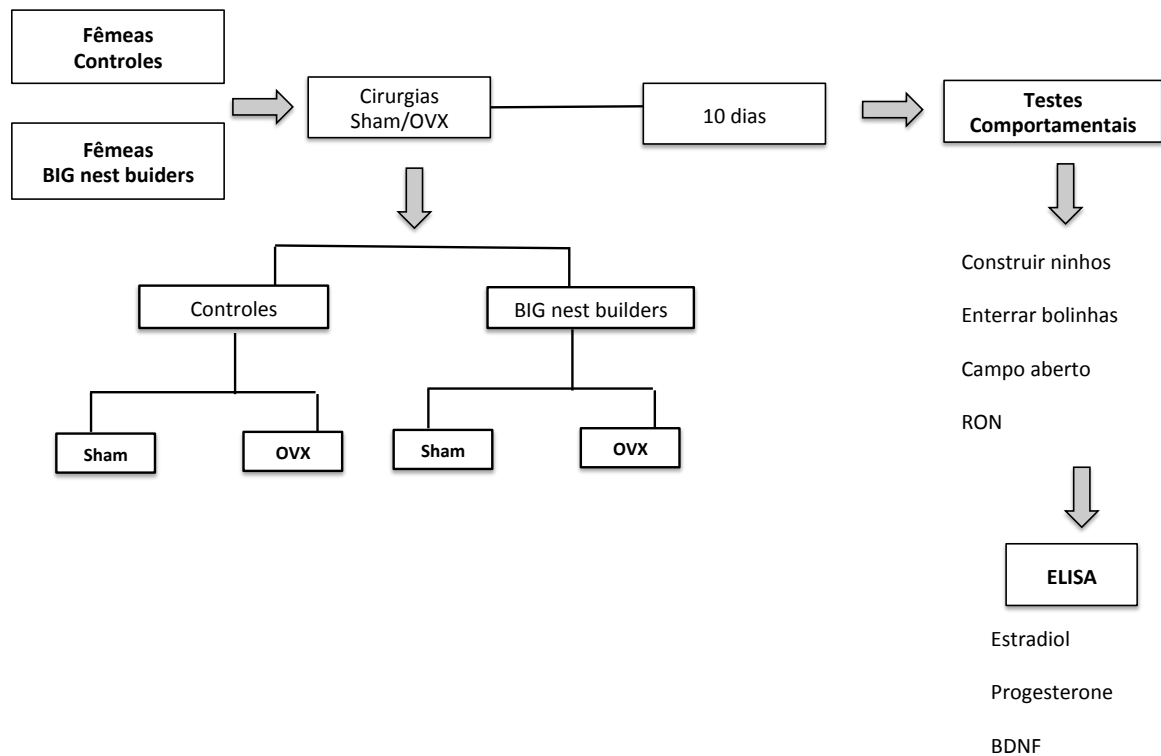


Figura 30. Delineamento dos experimentos 1 e 2.

Experimento 3

O experimento 3 teve foi desenhado para verificar se a administração de E_2 seria capaz de reverter o aumento do comportamento do tipo-compulsivo e o comportamento do tipo-ansiedade e ainda se haveria algum efeito na memória do RON em animais BIG nest builders. Desta forma, somente os animais BIG nest builders foram submetidos à cirurgia de OVX e após completarem 10 dias da cirurgia foram subdivididos em grupos para receberem a administração subcutânea de veículo e E_2 (Figura 31).

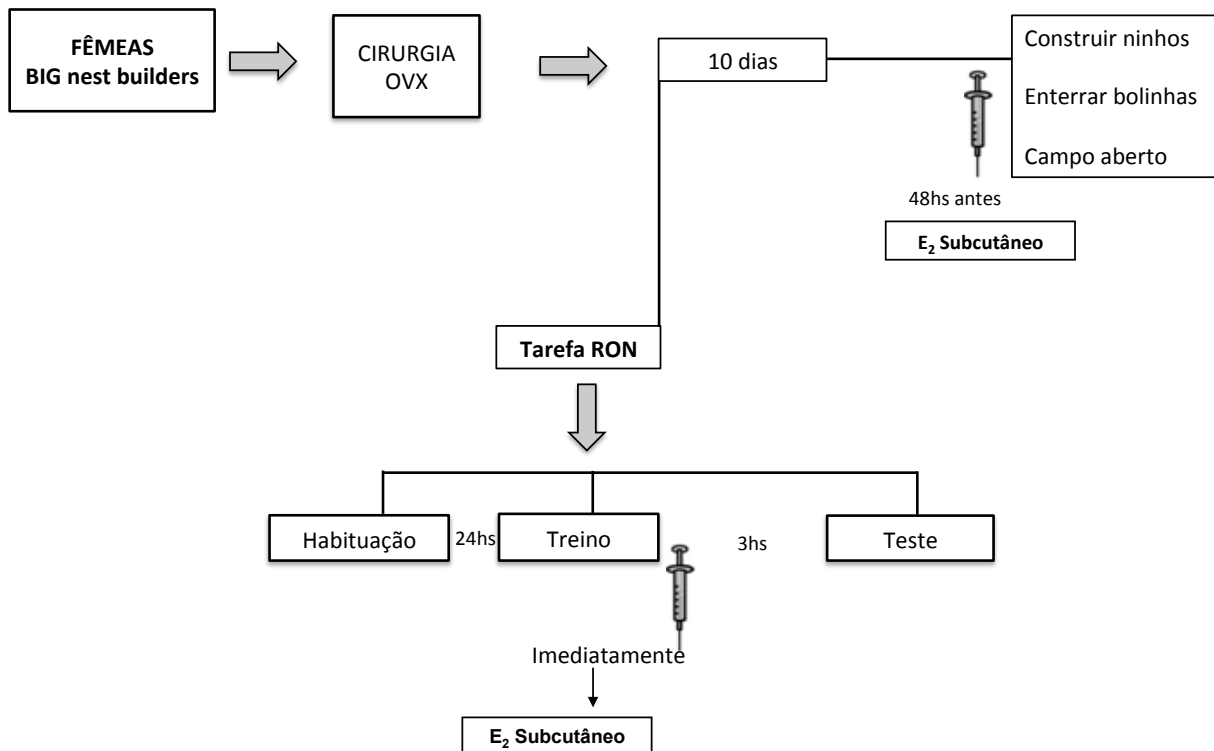


Figura 31. Delineamento do experimento 3.

8.7 Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram mensuradas pela análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para identificação das diferenças observadas entre os grupos nos testes comportamentais de construir ninhos, enterrar bolinhas, campo aberto e RON e para as dosagens da concentração de 17β -estradiol, progesterona e BDNF. O teste t não pareado permitiu a comparação entre os grupos no experimento de administração de E_2 . Para a análise estatística na tarefa de reconhecimento do objeto novo foi utilizado o teste t de uma amostra com valor hipotético igual a 0.5. Se o IR foi maior que 0.5 significa que o animal permaneceu mais tempo que a chance na exploração do novo objeto. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$ e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

9. Resultados

A ovariectomia aguda piora o comportamento do tipo-compulsivo

Inicialmente investigamos a influência da privação hormonal no comportamento do tipo-compulsivo. Com relação ao teste de construir ninhos, as análises da ANOVA de duas vias detectaram uma interação entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{2,66}=86.81$; $p<0.0001$) e o efeito da linhagem ($F_{2,66}=573.6$; $p<0.0001$) e da cirurgia ($F_{1,66}=107.7$; $p<0.0001$). As análises *post-hoc* identificaram diferenças entre e intra grupos. Animais BIG nest builders consomem mais algodão para construir seus ninhos em comparação aos animais controles (Figura 32A). Quando ovariectomizados, os animais BIG nest builders passam a utilizar mais algodão na construção dos ninhos do que seus controles sham, demonstrando o comportamento do tipo-compulsivo mais acentuado na ausência da sinalização estrogênica.

Utilizamos também o teste de enterrar bolinhas para melhor caracterização do comportamento do tipo-compulsivo e, pelas análises da ANOVA de duas vias, foram identificadas interações entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{2,66}=3.25$; $p=0.04$) e o efeito principal da linhagem ($F_{2,66}=20.99$; $p<0.0001$) e da cirurgia ($F_{1,66}=5.34$; $p=0.02$) (Figura 32B). O pós teste de Bonferroni revelou que animais BIG nest builders ovariectomizados enterram mais bolinhas na maravalha em comparação aos controles ovariectomizados e ao grupo sham, indicando que a falta de modulação estrogênica intensificou o comportamento do tipo-compulsivo também neste paradigma.

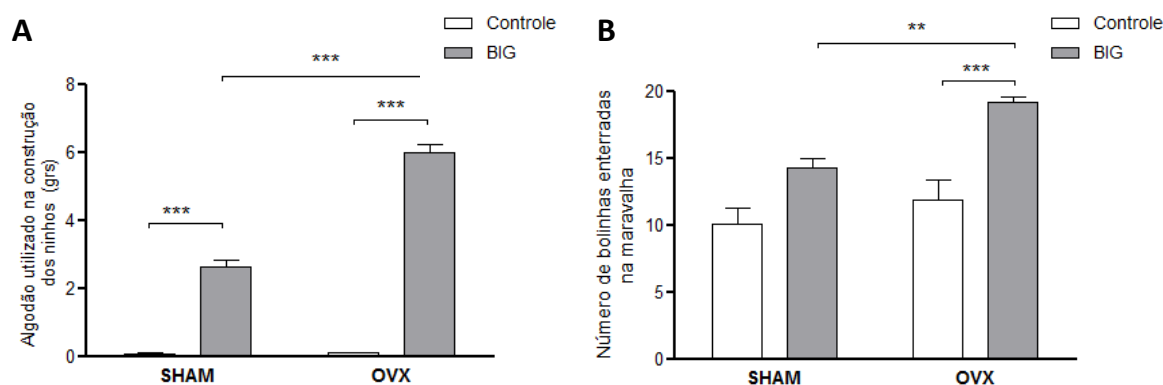


Figura 32. Efeito de 10 dias de ovariectomia no comportamento do tipo-compulsivo. Os grupos foram submetidos **(A)** à tarefa de “construir ninhos” (Sham: controles n=12; BIG n=12/ OVX: controles n=12; BIG n=12) ou **(B)** de “enterrar bolinhas na maravalha” (Sham: controles n=11; BIG n=12/ OVX: controles n=12; BIG n=12).). ** (P<0.01) e *** (P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

A ovariectomia aguda aumenta o comportamento do tipo-ansiedade mas não influencia a memória de reconhecimento do objeto novo

Uma vez que o TOC é classificado como uma desordem de ansiedade, o próximo passo foi investigar se o comportamento do tipo-ansiedade estaria presente e se seria influenciado pela OVX. Por meio das análises da ANOVA de duas vias foi possível identificar interação entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{2,66}=4.43$; $p=0.01$) e o efeito da linhagem ($F_{2,66}=125.1$; $p<0.0001$) e da cirurgia ($F_{1,66}=44.8$; $p<0.0001$) (Figura 33A). O teste *post-hoc* demonstrou diferenças entre e intra-grupos. Animais BIG nest builders dos grupos sham e OVX permaneceram por menos tempo no centro da arena quando comparados aos seus controles. Além disso, animais BIG nest-builders ovariectomizados reduziram ainda mais o número de entradas no centro, indicando que o comportamento do tipo-ansiedade foi mais pronunciado neste último grupo após a ovariectomia.

Para investigar a influência da ovariectomia na função cognitiva em animais modelo de TOC, foi utilizado o teste de reconhecimento do objeto novo e, de acordo com as análises estatísticas da ANOVA de duas, não houve interação entre os fatores linhagem e cirurgia

($F_{2,30}=1.88$; $p=0.16$) e nem o efeito da cirurgia ($F_{1,30}=1.72$; $p=0.19$), mas o efeito principal da linhagem ($F_{2,30}=10.51$; $p=0.0003$) (Figura 34A). O pós teste de Bonferroni demonstrou diferenças apenas entre os grupos controles. Animais controles ovariectomizados reduziram a exploração no novo objeto quando comparados aos controles sham, embora os índices de reconhecimento em ambos foi superior a 0.5, indicando que este tipo de memória ainda manteve-se preservada. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de animais BIG nest builders antes e após a OVX nos índices de reconhecimento que não diferiram de 0.5, indicando ausência desse tipo de memória.

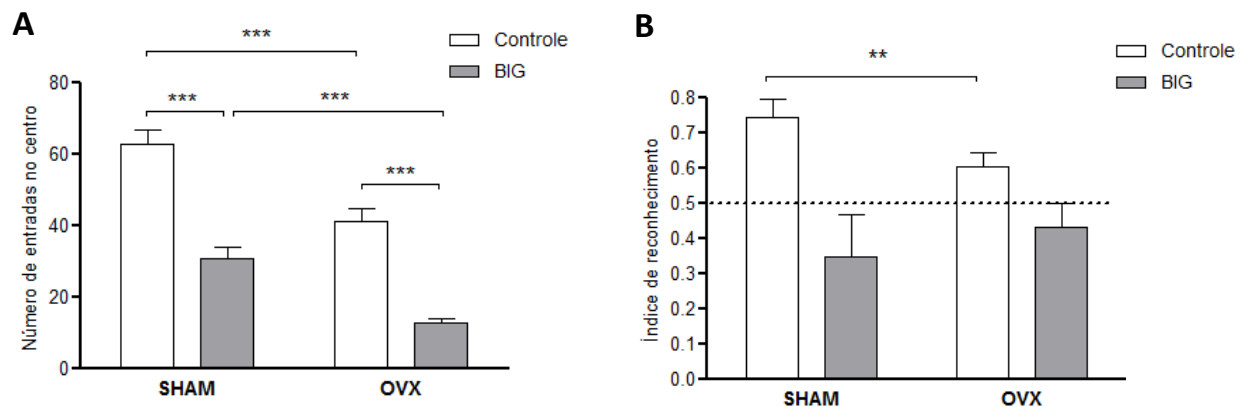


Figura 33. Efeito de 10 dias de ovariectomia no comportamento do tipo-ansiedade e a memória de RON. Os grupos foram submetidos **(A)** à tarefa de “campo aberto (Sham: controles n=12; BIG n=12/ OVX: controles n=12; BIG n=12) ou **(B)** ao reconhecimento do objeto novo (Sham: controles n=6; BIG n=6/ OVX: controles n=6; BIG n=6).). ** ($P<0.01$) e *** ($P<0.001$) indicam diferenças entre os grupos.

A ovariectomia aguda reduz as concentrações séricas de hormônios ovarianos

(17 β -Estradiol e progesterona)

As concentrações séricas de 17 β -Estradiol e progesterona foram analisadas e, pela ANOVA de duas vias foi possível identificar na dosagem de 17 β -Estradiol: interação entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{3,45}=17.92$; $p<0.0001$) e o efeito da linhagem ($F_{3,45}=17.06$; $p<0.0001$) e da cirurgia ($F_{1,45}=131.4$; $p<0.0001$) (Figura 34A).; na dosagem de progesterona, interação entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{1,23}=4.74$; $p=0.03$) e o efeito da linhagem ($F_{1,23}=4.39$; $p=0.04$) e da cirurgia ($F_{1,45}=69.39$; $p<0.0001$) (Figura 34B). As análises *post-hoc* demonstraram que as diferenças nas concentrações tanto de 17 β -Estradiol quanto de progesterona reduziram em ambos os grupos após a ovariectomia.. Entretanto, um resultado surpreendente foi encontrado onde os animais BIG net builders apresentaram menores concentrações basais de ambos os hormônios em comparação aos sham.

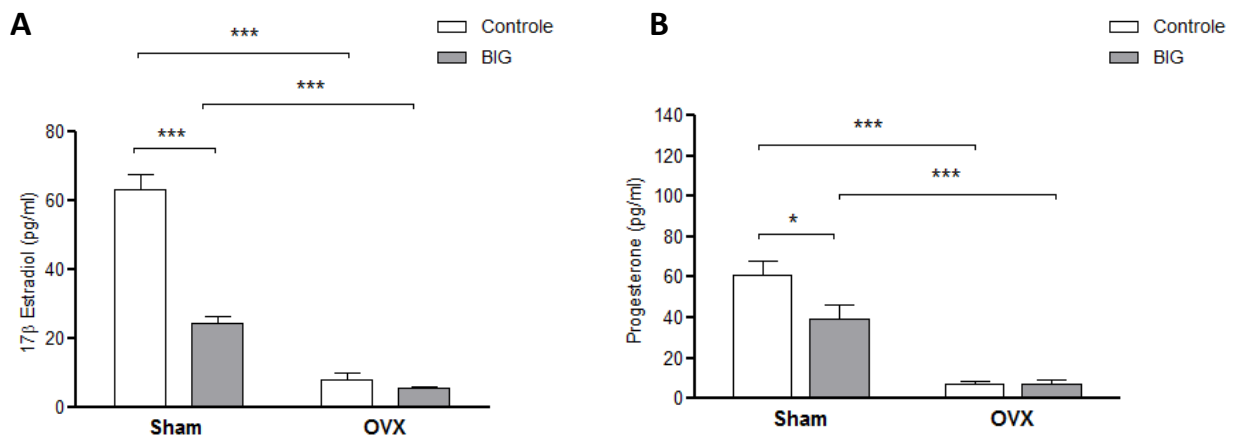


Figura 34. Concentrações séricas dos hormônios ovarianos após 10 dias de ovariectomia. Ao final dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados e tiveram o plasma retirado para as análises bioquímicas, que demonstraram uma redução significativa tanto nos (A) Concentrações de 17 β -Estradiol (Sham: controles n=5; BIG n=8/ OVX: controles n=5; BIG n=8) (B) quanto de progesterona (Sham: controles n=5; BIG n=8/ OVX: controles n=7 BIG n=7). * ($P<0.05$) e *** ($P<0.001$) indicam diferenças entre os grupos.

A ovariectomia aguda não altera as concentrações de BDNF no hipocampo

Uma vez que verificamos que os grupos de animais BIG nest builders não apresentaram a memória de RON após 10 dias de OVX, foi verificada as concentrações de BDNF no hipocampo, que é uma neurotrofina importante para consolidar esta memória.

As análises da ANOVA de duas referentes às concentrações BDNF no hipocampo não identificaram interação entre os fatores linhagem e cirurgia ($F_{1,22}=2.42$; $p=0.13$), mas o efeito principal linhagem ($F_{1,22}=5.35$; $p=0.03$), mas não da cirurgia ($F_{1,22}=2.49$; $p=0.12$) (Figura 35). O pós teste de Bonferroni demonstrou diferença apenas entre o grupo sham, indicando a diminuição nas concentrações basais de BDNF no hipocampo de animais BIG nest builders quando comparados aos controles.

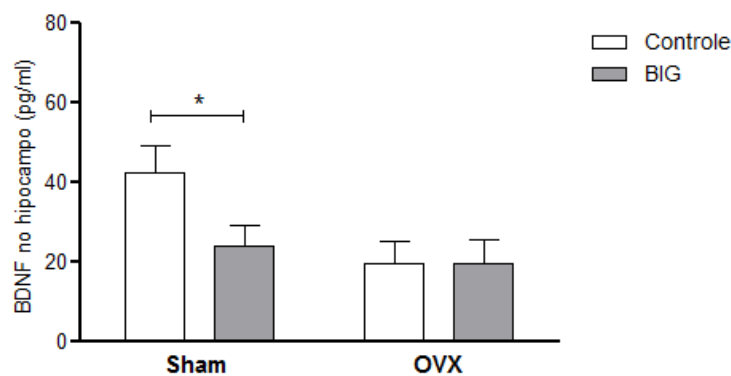


Figura 35. Concentrações hipocampais de BDNF após 10 dias de ovariectomia. A ovariectomia não alterou as concentrações de BDNF no hipocampo, embora houvesse uma redução nas concentrações basais em animais BIG comparados aos controles (Sham: controles n=7; BIG n=7/ OVX: controles n=7; BIG n=7). * ($P<0.05$) indica diferenças entre os grupos.

*A administração sistêmica de 17β-Estradiol tem efeito anti-compulsivo,
ansiolítico e promnésico.*

Com o intuito de verificar se o E₂ seria capaz de reverter o comportamento do tipo-compulsivo em animais BIG nest builders, foi administrado o 17β-Estradiol s.c. nos grupos. Os resultados demonstraram que, a administração de 17β-Estradiol foi capaz de diminuir a quantidade de algodão utilizada para a construção dos ninhos em comparação ao grupo veículo ($t(22)=5.29$, $p<0.0001$) (Figura 36A), bem como reduzir a quantidade de bolinhas enterradas na maravalha ($t(22)=6.26$, $p<0.001$) (Figura 3B), indicando diminuição do comportamento do tipo compulsivo (Figura 326A). Da mesma forma, a administração de 17β-Estradiol aumentou o número de entradas do animal no centro da arena ($t(20)=3.04$, $p=0.006$), indicando seu efeito ansiolítico (Figura 36C).

O grupo que recebeu E₂ imediatamente após a sessão de treino aumentou significativamente o IR no objeto novo ($t(22)=5.96$, $p<0.0001$) (Figura 36D), demonstrando que a sinalização estrogênica possibilitou ao animal discriminar os objetos e a consolidar um aprendizado que antes ele não exibia. Similarmente, as análises do test *t* de uma amostra demonstraram que animais que receberam E₂ após 10 dias de ovariectomia exploraram mais que a chance de 0.5, o novo objeto ($t(11)=5.97$; $p<0.0001$), média do IR 0.71 em comparação ao grupo veículo ($t(7)=1.808$; $p=0.113$), média do IR 0.47 .

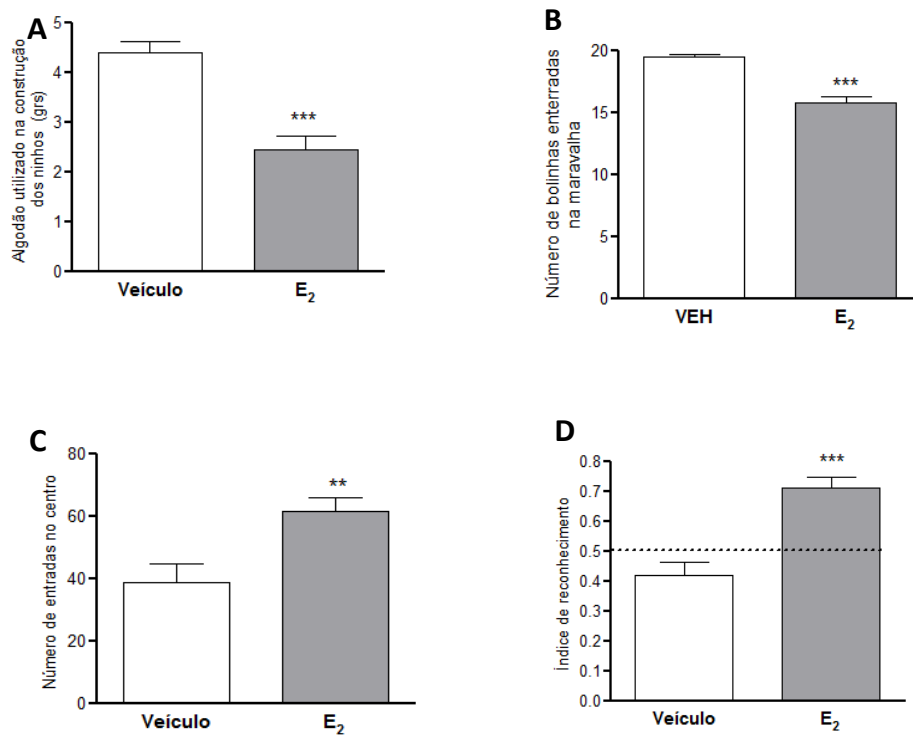


Figura 36. Efeito da administração de 17 β -Estradiol no comportamento do tipo-compulsivo, do tipo-ansiedade e na memória de reconhecimento do objeto novo após 10 dias de ovariectomia. Os animais foram submetidos a uma única administração de 17 β -Estradiol (s.c) e realizaram as tarefas de **(A)** “construir ninhos (veículo n=12, E₂ n=12), **(B)** “enterrar bolinhas” (veículo n=12, E₂ n=12), **(C)** campo aberto (veículo n=11, E₂ n=11) e **(D)** RON (veículo n=12, E₂ n=12). ** (P<0.01) e ***(P<0.001) indicam diferenças entre os grupos.

10. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que uma única dose de E₂, ou dos agonistas ER α e ER β , agindo no hipocampo nos estágios iniciais da consolidação, previne o prejuízo na memória de reconhecimento do objeto novo em fêmeas ovariectomizadas por 12 semanas. Estes dados complementam dados prévios do nosso grupo (Fonseca et al., 2013) que demonstraram que 12 semanas de OVX, embora seja um considerado um longo período de privação hormonal, ainda se encontra dentro da janela de oportunidade para a recuperação de déficits cognitivos.

No entanto, a administração do E₂ só foi eficaz imediatamente após o treino. Nossos resultados estão em concordância com o estudo de FERNANDEZ et al. (2008) e sugerem que o E₂ administrado em períodos tardios é ineficaz em beneficiar a recuperação da memória,

A função cognitiva pode ter sido favorecida pela ação do E₂ agindo na plasticidade hipocampal, por mecanismos como o aumento de BDNF (GIBBS, 1999; KRAMÁR et al., 2012; LUINE; FRANKFURT, 2013; SCHARFMAN et al., 2007), de espinhas dendríticas (VELÁZQUEZ-ZAMORA; GARCIA-SEGURA; GONZÁLEZ-BURGOS, 2012), de LTP (BREDEMANN; MCMAHON, 2014; SMITH et al., 2010; VEDDER et al., 2013), da transmissão glutamatérgica (SMITH; VEDDER; MCMAHON, 2009; VEDDER et al., 2013) e neurogênese (MCCLURE; BARHA; GALEA, 2013). No entanto, esses mecanismos não foram foco de investigação no presente trabalho.

Como a administração aguda de E₂ no hipocampo foi capaz de reverter o dano cognitivo na memória de reconhecimento do objeto novo, questionou-se qual seria a participação do ER α e ER β , uma vez que o hipocampo expressa estes receptores (MITRA et al., 2003). Nossos dados demonstraram que ambos os agonistas destes receptores, PPT e DPN, tiveram efeito positivo na memória do objeto novo após 12 semanas de OVX. De fato,

a literatura já demonstra este efeito de ambos os agonistas dos receptores de estrogênio alfa e beta na memória de reconhecimento do objeto novo. BOULWARE e colaboradores (2013) mostraram que o PPT e DPN, quando injetados no hipocampo, favoreceram a memória de reconhecimento do objeto novo em fêmeas ovariectomizadas por 7-10 dias. Também, estes agonistas tiveram efeitos semelhantes na fosforilação de ERK, sugerindo que algumas vias intracelulares ativadas por ambos receptores sejam as mesmas. No entanto, somos os primeiros a demonstrar que a ativação de ambos ER α e ER β no hipocampo, é eficaz após 12 semanas de OVX.

O nosso estudo também identificou um efeito do tempo de ovariectomia na expressão ER α no hipocampo. Já é descrito na literatura que a OVX pode influenciar a expressão dos receptores de estradiol no sistema nervoso. No entanto, estes resultados são relativamente controversos. Em ratas após 2 semanas de OVX, houve aumento na expressão de mRNA ER α (MOHAMED; ABDEL-RAHMAN, 2000). Contraditoriamente, as concentrações protéicas de ER α diminuíram com 1 semana de OVX (QU et al., 2012). De acordo com nosso estudo, foi encontrada redução na expressão de ER α no hipocampo de camundongos após 1 semana de OVX. Já, após 12 semanas de OVX, identificamos um aumento na expressão de ER α no hipocampo, enquanto (MEYER et al., 2003) não encontraram nenhuma alteração na análise desta proteína no cérebro total de ratas.

A análise da expressão de ER α e ER β durante o ciclo estral também é contraditória. Foi observado um aumento na expressão de mRNA e também da expressão protéica de ER β durante a fase de estro, mas nenhuma alteração na expressão mRNA ER α (SZYMCZAK et al., 2006). Em outro estudo, os autores encontraram um aumento na expressão de ER α durante a fase de estro, enquanto a expressão de ER β se manteve inalterada durante todas as fases do ciclo analisadas (MENDOZA-GARCÉS et al., 2011). Em síntese, nossos resultados sugerem que as concentrações de ER α no hipocampo podem ser modulados pela

ovariectomia.

Similarmente, o trabalho demonstrou que houve redução na expressão de ER α na porção lateral do núcleo do hipotálamo ventromedial após 12 semanas de OVX. Este núcleo modula especialmente a receptividade sexual nas fêmeas por favorecer a postura de lordose para a cópula (revisado por COHEN; PFAFF, 1992) e os estrogênios influenciam diretamente a função reprodutiva. Por exemplo, o tratamento de estradiol em fêmeas ovariectomizadas recupera o comportamento de lordose (RUBIN; BARFIELD, 1980). Além disso, SÁ e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento com E₂ aumenta a sinaptogênese e este efeito foi mediado pela ativação dos ER α e ER β . Os estrogênios também tem um importante papel na regulação da função reprodutiva através de sua modulação nos neurônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH). Tais neurônios expressam ER α e ER β (ARTEAGA-LÓPEZ et al., 2003) e controlam, por sua vez, a secreção de gonadotrofinas (GOODMAN, 2009). Estudo com animais knockouts para os receptores ER α e ER β mostraram que, somente o ER α está envolvido nas alças de feedback positivos e negativos que modulam os disparos de neurônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) responsivos aos E₂ (CHRISTIAN et al., 2008). Juntos, estes dados sugerem que a ovariectomia por 12 semanas foi capaz de alterar a função reprodutiva e que o aumento da expressão dos ER α nesta estrutura pode ter sido um mecanismo compensatório à diminuição de estradiol circulante, em decorrência da privação crônica de hormônios ovarianos.

Interessantemente, o presente estudo demonstrou o efeito da ovariectomia em induzir o comportamento do tipo-depressivo e que uma única administração de E₂ no hipocampo e sistemicamente teve efeito antidepressivo após 12 semanas de OVX. A depleção estrogênica aumenta a vulnerabilidade a desordens emocionais como depressão (CLAYTON; GUICOPABIA, 2008; SOARES, 2014; VIVIAN-TAYLOR; HICKEY, 2014) e o comportamento do tipo-depressivo (BEKKU; YOSHIMURA; ARAKI, 2006; LAGUNAS et al., 2010; LI et al.,

2014). Os nossos resultados, corroboram os dados da literatura que mostram o efeito antidepressivo do E₂ em roedores após a ovariectomia aguda (RÉCAMIER-CARBALLO et al., 2012; WALF; FRYE, 2009) e subcrônica (KISS et al., 2012b; LI et al., 2014; SELL et al., 2008). Apenas um estudo mostrou que o tratamento com E₂ foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais na tarefa de nado forçado, após 12 semanas de OVX (ESTRADA-CAMARENA et al., 2011). Assim, os resultados sugerem que, 12 semanas após a ovariectomia, ainda não é tempo suficiente para anular o efeito dos estrogênios no comportamento do tipo-depressivo.

Nossos resultados demonstraram que o efeito antidepressivo do E₂ foi restrito à ativação do ERβ. Esses resultados estão em concordância com estudos que apontam um importante efeito anti-depressivo do receptor ERβ (ROCHA et al., 2005; WALF; FRYE, 2007; WALF; RHODES; FRYE, 2004; YANG et al., 2014). Um dos mecanismos pelo qual o ERβ poderia ter efeito antidepressivo estaria relacionado ao fato de que ele restabelece a sinalização serotoninérgica, pelo aumento de receptores 5-HIAA no hipocampo (JACOME et al., 2010).

O estudo revelou que a ovariectomia por 12 semanas comprometeu a memória de condicionamento ao medo pelo som e favoreceu o surgimento do comportamento do tipo-ansiedade e a administração sistêmica e intra-BLA de E₂ não foi eficiente em recuperar esses danos. A influência da ovariectomia na memória de medo ainda é pouca explorada quando comparada à memória de reconhecimento do objeto novo. Além disso, os poucos trabalhos que investigaram esse efeito apresentam resultados controversos. Nossos dados são pioneiros em mostrar que há o prejuízo na memória de condicionamento ao medo pelo som em função do tempo de ovariectomia.

Enquanto alguns estudos sugerem que o tratamento com E₂ facilita a consolidação da memória de condicionamento ao medo pelo som (MORGAN; PFAFF, 2001) e pelo som e

contexto (JASNOW; SCHULKIN; PFAFF, 2006); em recente trabalho de MCDERMOTT et e colaboradores (2015), o benefício do E₂ favoreceu somente o condicionamento pelo contexto e não pelo som. Todavia esses trabalhos não demonstraram o efeito temporal do E₂ agindo na recuperação de uma memória de condicionamento ao medo uma vez “perdida” a longo prazo. Além disso, especula-se que o tratamento estrogênico possa exercer seus benefícios na cognição particularmente em memórias onde o hipocampo tem um papel fundamental, pois nestas tarefas, o animal tem opção de escolha e o E₂ poderia beneficiar a estratégia em que os animais utilizariam para a discriminar a sua preferência (DANIEL et al., 1997; O’NEAL et al., 1996), o que pode não acontecer com a memória de condicionamento ao medo, que trata-se de aprendizado associativo, que não depende de alternativas.

A distribuição dos ERs no complexo amigdalóide também é variável. A literatura aponta que o núcleo medial possui três vezes mais quantidade de ER α e ER β quando comparado às outras regiões (MITRA et al., 2003) o que torna este núcleo mais sensível à ação dos estrogênios. Assim, sugerimos que, o E₂, agindo no núcleo BLA, pode não ter ativado a quantidade necessária de ERs para promover a recuperação de comportamentos amígdala-dependentes após longos períodos de ovariectomia, como o comportamento do tipo-ansiedade (TYE et al., 2011). Dados da literatura apontam que, embora a ovariectomia possa predispor ao comportamento do tipo-ansiedade (DE CHAVES et al., 2009; WALF; FRYE, 2006) existem controvérsias. Enquanto alguns estudos apontaram para o efeito ansiolítico do tratamento com E₂ (DAENDEE; THONGSONG; KALANDAKANOND-THONGSONG, 2013; FRYE; WALF, 2004) outros resultados não corroboram essa hipótese (MORGAN; PFAFF, 2001).

Resultados interessantes e pioneiros do nosso trabalho mostraram que, após 12 semanas de OVX houve aumento na ativação dos núcleos LA, BLA, CEL e CEM do complexo amigdalóide. Estudos apontam que após o condicionamento ao medo pelo som, há

um aumento na excitabilidade sináptica dos neurônios de LA (JOHANSEN et al., 2010; MCKERNAN; SHINNICK-GALLAGHER, 1997; ROGAN; STÄUBLI; LEDOUX, 1997) e que lesões no núcleo central bloqueiam a resposta de (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; HITCHCOCK; DAVIS, 1986; KAPP et al., 1979), sugerindo que esta rota de projeções de LA para o núcleo central poderia favorecer o comportamento de medo condicionado. Uma vez ativado o núcleo central, a informação é transmitida de CEL para CEM, e deste para a substância periaquedutal cinzenta (PAG) para que as resposta de *freezing* ao condicionamento aconteçam (revisado por JANAK; TYE, 2015). De acordo com a literatura, a resposta de *freezing* acontece especificamente pela desinibição do CEM (CIOCCHI et al., 2010; PARE; DUVARCI, 2012). Embora nossos resultados não tenham mostrado um aumento significativo na ativação de LA em animais sham condicionados, podemos verificar que animais OVX apresentaram um aumento na ativação tanto do CEL quanto do CEM pós condicionamento, ou seja um aumento na ativação do núcleo central.

Assim hipotetizamos que, no presente estudo, o aumento verificado na ativação do CEM, que se trata de núcleo gabaérgico (PARE; DUVARCI, 2012) por sua vez mais ativo, aumentou sua ação inibitória na substância cinzenta periaquedutal (PAG), que, menos ativa, diminuiu as informações de saída para que as repostas ao medo condicionado, no caso o *freezing*, fossem expressas. Juntos estes dados sugerem que, o aumento na inibição do núcleo CEM sobre a PAG em animais ovariectomizados, não permite que a memória de *freezing* seja consolidada. No entanto, novas informações sobre o papel dos circuitos intrínsecos do complexo amigdalóide surgem constantemente. Assim, futuras investigações são necessárias para se concluir de fato como o complexo amigdalóide é modulado pelos estrogênios durante o condicionamento ao medo pelo som.

A expressão de c-Fos no complexo amigdalóide aumenta em roedores machos, pós condicionamento ao medo pelo som (LELOS; GOOD, 2012; RADULOVIC;

KAMMERMEIER; SPIESS, 1998). Este achado não foi reproduzido no presente estudo, porém vale a pena ressaltar que utilizamos fêmeas. De fato, estudos tem demonstrado que as alterações nas concentrações de hormônios femininos, que caracterizam o ciclo estral, podem modular a expressão de genes de expressão imediata, como c-Fos, em neurônios responsivos ao LH (revisado por HOFFMAN; SMITH; VERBALIS, 1993; LLOYD; HOFFMAN; WISE, 1994). Com base nestes achados e considerando que, no presente estudo, não foi avaliado o ciclo estral do grupo controle, postulamos que o padrão de ativação do complexo amigdalóide pós condicionamento pode ter sido influenciado pelas concentrações de estrogênios circulantes, que por sua vez, modulam a liberação de LH. No entanto, futuras investigações são necessárias para esclarecer um possível dimorfismo sexual na ativação do complexo amigdalóide pós condicionamento.

No presente estudo, a ovariectomia aguda por 10 dias, em um modelo experimental de TOC não induzido, foi capaz de aumentar o comportamento do tipo-compulsivo e do tipo-ansiedade pré-existente, sem alterar a memória de reconhecimento do objeto novo. Além disso, uma única dose sistêmica de 17β -Estradiol promoveu efeito anti-compulsivo, ansiolítico e promnésico.

Nossos resultados estão em concordância com outros, que apontam que o estradiol é capaz de modular o comportamento do tipo compulsivo. Por exemplo, (FLAISHER-GRINBERG et al., 2009) verificaram que o comportamento do tipo-compulsivo de “pressionar” em ratas intactas foi influenciado pelas flutuações do ciclo estral, pois as respostas comportamentais foram atenuadas na fase de estro (maiores concentrações de E_2) e gradualmente aumentadas até a fase de diestro (menores concentrações de E_2). Além disso, a administração aguda de E_2 em fêmeas na pré-puberdade diminuiu o comportamento do tipo-compulsivo de “pressionar”.

Concomitantemente, outro estudo demonstrou que em camundongos machos

deficientes para a enzima aromatase (AeKO) apresentam comportamentos compulsivos de “se limpar”, “correr em círculos” e “retirar os pelos” (HILL et al., 2007). Também, a administração concomitante de E₂ e progesterona em ratas ovariectomizadas foi capaz de reduzir o comportamento do tipo-compulsivo (LLANEZA et al., 2012). No entanto, estudos com humanos ainda são controversos. Enquanto (UGUZ et al., 2010) demonstraram que o TOC não é comorbidade rara no período pós-menopausa, um estudo recente que investigou os sintomas da TOC nos diferentes eventos reprodutivos da vida da mulher, demonstrou que a exacerbação dos sintomas está relacionada ao momento da menarca e diminuem durante a menopausa (GUGLIELMI et al., 2014). Assim, novos estudos são necessários para esclarecer melhor o efeito do E₂ na compulsividade e no comportamento do tipo-compulsivo.

Uma vez que o TOC é caracterizado como uma desordem de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), foi questionado se o comportamento do tipo-ansiedade estaria presente em um modelo experimental de fêmeas com TOC não induzido e ainda qual seria o papel do E₂ nesse contexto. O nosso estudo demonstrou que, diferentemente dos machos BIG nest-builders, que não apresentam o comportamento do tipo-ansiedade (GREENE-SCHLOESSER et al., 2011), no grupo de fêmeas este comportamento está presente. UGUZ e colaboradores (2010) sugerem que o TOC seja uma comorbidade comum como a depressão e a ansiedade no período pós-menopausa. Em modelos experimentais de TOC, também é comum a presença do comportamento do tipo-ansiedade (MURPHY et al., 2013; SHMELKOV et al., 2010), além disso, o tratamento mais utilizado para a TOC são ansiolíticos. Já o efeito ansiolítico do E₂ após a ovariectomia aguda é bem descrito (FEDOTOVA, 2014; KALANDAKANOND-THONGSONG; DAENDEE; SRIKIATKHACHORN, 2012; MENG et al., 2011; WALF; FRYE, 2010), embora nosso trabalho seja o primeiro em demonstrar este efeito neste modelo experimental de TOC não induzido.

Nosso estudo também mostrou a eficácia da ovariectomia em reduzir as concentrações plasmáticas de E₂ e progesterona, em concordância com vários outros trabalhos (KATO et al., 2013; LU et al., 2007). Entretanto, um achado importante do presente estudo foi de que fêmeas BIG nest-builders sham apresentaram redução basal, tanto nas concentrações séricas de hormônios ovarianos (E₂ e progesterona), quanto de BDNF no hipocampo quando comparadas aos controles. Além disso, outro dado que merece atenção foi o fato de que o IR na tarefa de memória mostrou-se não diferente de 0.5 neste grupo, ou seja, os animais não foram capazes de discriminar o novo objeto, independentemente da ovariectomia. No entanto, uma única dose de E₂ teve efeito promnésico, proporcionando ao animal adquirir uma memória que antes não apresentava.

Sabe-se que um dos mecanismos pelos quais os estrogênios promovem neuroplasticidade hipocampal (necessária para a formação de memórias declarativas) é através da modulação das concentrações de BDNF (revisado por LUINE; FRANKFURT, 2013). Concomitantemente, as concentrações plasmáticas de BDNF parecem ser reduzidos em pacientes com TOC (SULIMAN; HEMMING; SEEDAT, 2013). Juntos, estes dados sugerem que a redução nas concentrações de E₂ e consequentemente de BDNF hipocampal poderiam aumentar a susceptibilidade à déficits cognitivos na presença do fenótipo compulsivo.

Uma importante consideração ao presente trabalho é o fato de que, apesar de não termos verificado diferenças significativas entre os grupos sham nas tarefas comportamentais, e, embora a literatura corrobore os nossos achados, a análise do ciclo estral nas fêmeas sham poderia esclarecer melhor a influência das flutuações hormonais neste grupo.

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que os estrogênios agem em substratos como hipocampo e amígdala para modular as funções cognitivas e afetivas após a ovariectomia aguda (10 dias) e crônica (12 semanas).

11. Conclusão

O presente estudo revelou que 12 semanas de ovariectomia prejudica a memória de RON e favorece o surgimento do comportamento do tipo-depressivo. No modelo de TOC não induzido, a ovariectomia por 10 dias piora o comportamento do tipo-compulsivo e do tipo-ansiedade. Constatamos também que a administração de estradiol após 12 semanas de OVX preveniu o déficit cognitivo e teve efeito antidepressivo. Após 10 dias de OVX, a administração de estradiol teve efeito anti-compulsivo, ansiolítico e promnésico. Concomitantemente, observamos que a expressão de ER α no hipocampo é sensível às concentrações sistêmicas de estradiol e que 12 semanas de OVX foi capaz de modificar o perfil de ativação do complexo amigdalóide.

12. Referências bibliográficas

AGUILAR-ZAVALA, H. et al. Symptoms at postmenopause. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 19, n. 10, p. 1024–1029, 2012.

AHMARI, S. E. et al. Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6137, p. 1234–9, 2013.

AHN, J.-R.; LEE, I. Neural Correlates of Object-Associated Choice Behavior in the Perirhinal Cortex of Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 4, p. 1692–1705, 2015.

ALBASSER, M. M. et al. The neural basis of nonvisual object recognition memory in the rat. **Behavioral neuroscience**, v. 127, n. 1, p. 70–85, 2013.

ALBASSER, M. M.; POIRIER, G. L.; AGGLETON, J. P. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 134–147, 2010.

ALHOLA, P. et al. Estrogen + progestin therapy and cognition: A randomized placebo-controlled double-blind study. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 36, n. 4, p. 796–802, 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l: s.n.].

ARTEAGA-LÓPEZ, P. R. et al. Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat. **Endocrine**, v. 21, n. 3, p. 251–260, 2003.

BARHA, C. K.; DALTON, G. L.; GALEA, L. A. Low doses of 17alpha-estradiol and 17beta-estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17alpha- and 17beta-estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 547–559, 2010.

BARKER, G. R. I. et al. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2948–2957, 2007.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721–10731, 2011.

BAYLEY, P. J.; SQUIRE, L. R. The medial temporal lobe and declarative memory. **International Congress Series**, 2003.

- BEKKU, N.; YOSHIMURA, H.; ARAKI, H. Factors producing a menopausal depressive-like state in mice following ovariectomy. **Psychopharmacology**, v. 187, n. 2, p. 170–180, 2006.
- BERENT-SPILLSON, A. et al. NIH Public Access. v. 17, n. 4, p. 692–699, 2011.
- BERTAINA-ANGLADE, V. et al. The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 54, n. 2, p. 99–105, 2006.
- BIALA, M. A. G. The novel object recognition memory : neurobiology , test procedure , and its modifications. **Cognitive Process**, v. 13, p. 93–110, 2012.
- BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 81, n. 2, p. 281–290, 1972.
- BOULWARE, M. I.; HEISLER, J. D.; FRICK, K. M. The Memory-Enhancing Effects of Hippocampal Estrogen Receptor Activation Involve Metabotropic Glutamate Receptor Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 38, p. 15184–15194, 2013.
- BRANCHI, I.; ALLEVA, E.; COSTA, L. G. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 3, p. 375–384, 2002.
- BREDEMANN, T. M.; MCMAHON, L. L. 17 β Estradiol increases resilience and improves hippocampal synaptic function in helpless ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 77–88, 2014.
- BROADBENT, N. J. et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 5–11, 2010.
- BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory , recognition memory , and the hippocampus. **PNAS**, v. 110, n. 40, p. 1–6, 2004.
- CAPETTINI, S. B. et al. Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice show sexual dimorphism on memory. **Brain Research Bulletin**, v. 85, n. 1-2, p. 54–57, 2011.
- CHRISTIAN, C. A. et al. Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5328–5334, 2008.
- CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. **Endocrine Reviews**, v.31, n. 4, 554-577, 2010.
- CIOCCHI, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits.

Nature, v. 468, p. 277-282, 2010.

CLARK, J. A. et al. Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1051–1063, 2012.

CLAYTON, A.; GUICO-PABIA, C. Recognition of depression among women presenting with menopausal symptoms. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 758–767, 2008.

CLAYTON, N. S.; DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 272–274, 1998.

COHEN, R. S.; PFAFF, D. W. Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. **Progress in Neurobiology**, v. 38, n. 5, p. 423–453, 1992.

CORNIL, C. A.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: Where do the estrogens come from? **Brain Research**, v. 1126, n. 1, p. 2–26, 2006.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DAENDEE, S.; THONGSONG, B.; KALANDAKANOND-THONGSONG, S. Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats. **Behavioural Brain Research**, v. 246, p. 86–93, 2013.

DANIEL, J. M. et al. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. **Hormones and behavior**, v. 32, n. 3, p. 217–225, 1997.

DAY, M. et al. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 1, p. 128–131, 2005.

DE CHAVES, G. et al. Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 3-4, p. 420–425, 2009.

DE JESÚS-BURGOS, M.; TORRES-LLENZA, V.; PÉREZ-ACEVEDO, N. L. Activation of amygdalar metabotropic glutamate receptors modulates anxiety, and risk assessment behaviors in ovariectomized estradiol-treated female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 369–378, 2012.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols**, v. 16, n. 1-3, p. 10–19, 2005.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 673-704, 2007.

DOKOVIĆ, D. D. et al. Effects of hormone replacement therapy on depressive and anxiety symptoms after oophorectomy. **Medicinski Glasnik (Zenica)**, v. 12, n. April 2014, p. 79–85, 2015.

DORON, G.; MOULDING, R. Cognitive behavioral treatment of obsessive compulsive disorder: a broader framework. **The Israel journal of psychiatry and related sciences**, v. 46, n. 4, p. 257–263, 2009.

DOTY, R. L. et al. Influences of hormone replacement therapy on olfactory and cognitive function in postmenopausal women. **Neurobiology of Aging**, p. 1–7, 2015.

EGASHIRA, N. et al. Acetyl-L-Cysteine Inhibits Marble-Burying Behavior in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 97-101, 2012.

EGASHIRA, N. et al. Effects of mood stabilizers on marble-burying behavior in mice: Involvement of GABAergic system. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 2, p. 295–305, 2013.

ESPELAND, M. A et al. Long-term effects on cognitive function of postmenopausal hormone therapy prescribed to women aged 50 to 55 years. **JAMA internal medicine**, v. 173, n. 15, p. 1429–36, 2013.

ESTRADA-CAMARENA, E. et al. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1365–1377, 2011.

FEDOTOVA, J. Effects of SCH-23390 in Combination with a Low Dose of 17 β -Estradiol on Anxiety-Like Behavior in Ovariectomized Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-8, 2014.

FERNANDEZ, S. M. et al. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 35, p. 8660–8667, 2008.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 1, p. 79–88, 2014.

FESTER, L. et al. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 4, p. 1136–1144, 2006.

FISCHER, B.; GLEASON, C.; ASTHANA, S. Effects of hormone therapy on cognition and mood. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 898–904, 2014.

FLAISHER-GRINBERG, S. et al. Ovarian hormones modulate “compulsive” lever-pressing in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 2, p. 356–365, 2009.

FONSECA, C. S. et al. Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 101, p. 19–25, 2013.

- FORTRESS, A. M. et al. 17 β -Estradiol regulates histone alterations associated with memory consolidation and increases Bdnf promoter acetylation in middle-aged female mice. **Learning and Memory**, v. 21, p. 457–467, 2014.
- FRANÇA, A. S. C. et al. Beta2 oscillations (23-30 Hz) in the mouse hippocampus during novel object recognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 11, p. 3693–3703, 2014.
- FRYE, C. A.; WALF, A. A. Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 306–313, 2004.
- GEE, D. M.; FLURKEY, K.; FINCH, C. E. Aging and the Regulation of Luteinizing Hormone in C57BL 6J Impaired Elevations after Ovariectomy and Spontaneous Elevations at Advanced Ages. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 598–607, 1983.
- GIBBS, R. B. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. **Brain Research**, v. 844, n. 1-2, p. 20–27, 1999.
- GOLDMAN-RAKIC, P. S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13473–13480, 1996.
- GORENSTEIN, C. et al. Estrogen replacement therapy and cognitive functions in healthy postmenopausal women: A randomized trial. **Archives of Women's Mental Health**, v. 14, n. 5, p. 367–373, 2011.
- GREENE-SCHLOESSER, D. M. et al. Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 55–62, 2011.
- GRESACK, J. E.; FRICK, K. M. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 1, p. 112–119, 2006.
- GUGLIELMI, V. et al. Obsessive-Compulsive Disorder And Female Reproductive Cycle Events: Results From The OCD And Reproduction Collaborative Study. **Depression and Anxiety**, v. 31, n. 12, p. 979–987, 2014.
- HENDERSON, V. W. Aging, Estrogens, and Episodic Memory in Women. **Cognitive Behavioral Neurology**, v. 22, n. 4, p. 205–214, 2009.
- HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature**, v. 17, n. 12, p. 1644-1654, 2014.
- HEYDARPOUR, P. et al. Estradiol reduces depressive-like behavior through inhibiting nitric oxide/cyclic GMP pathway in ovariectomized mice. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 2, p. 361–369, 2013.

HILL, R. A. et al. Estrogen Deficient Male Mice Develop Compulsive Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 3, p. 359–366, 2007.

HITCHCOCK, J.; DAVIS, M. Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm.

Behavioral neuroscience, v. 100, n. 1, p. 11–22, 1986.

HOJO, Y. et al. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 865–870, 2004.

HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 14, n. 3, p. 173–213, 1993.

IMAI, S. et al. Behavioral Characteristics of Ubiquitin-Specific Peptidase 46-Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

IZQUIERDO, I. et al. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiology of learning and memory**, v. 69, n. 3, p. 219–224, 1998a.

IZQUIERDO, I. et al. **Mechanisms for memory types differ. Nature**, 1998b.

IZQUIERDO, I. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioural pharmacology**, v. 9, n. 5-6, p. 421–427, 1998c.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 7-8, p. 517–534, 2000.

JACOME, L. F. et al. Estradiol and ER α agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER α agonist, alters brain monoamines. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 488–498, 2010.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, p. 284-292, 2015.

JASNOW, A. M.; SCHULKIN, J.; PFAFF, D. W. Estrogen facilitates fear conditioning and increases corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala in female mice. **Hormones and behavior**, v. 49, n. 2, p. 197–205, 2006.

JITHENDRA, C.; MURTHY, T. E. G. K. Effect of curcumin on quinpirole induced compulsive checking : An approach to determine the predictive and construct validity of the model. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 81–86, fev. 2010.

JOFFE, H. et al. Increased estradiol and improved sleep, but not hot flashes, predict enhanced mood during the menopausal transition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, 2011.

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

KALANDAKANOND-THONGSONG, S.; DAENDEE, S.; SRIKIATKHACHORN, A. Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. **Physiology and Behavior**, v. 105, n. 2, p. 357–363, 2012.

KAPP, B. S. et al. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. **Physiology & behavior**, v. 23, n. 6, p. 1109–1117, 1979.

KASHYAP, H. et al. Neuropsychological correlates of insight in obsessive-compulsive disorder. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 126, n. 2, p. 106–114, 2012.

KATO, A. et al. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. **Frontiers in neural circuits**, v. 7, n. October, p. 149, 2013.

KISS, Á. et al. 17 β -Estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 1, p. 100–108, 2012a.

KRAMÁR, E. A. et al. BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 4, p. 708–719, 2012.

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 5925–5930, 1996.

LAGUNAS, N. et al. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 5, p. 786–791, 2010.

LAZARONI, T. L. N. et al. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 1, p. 113–123, 2012.

LEDOUX, J. E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **PNAS**, v. 118, n. 8, p. 27, 871-2878, 2014.

LELOS, M. J.; GOOD, M. A. C-Fos expression reveals aberrant neural network activity during cued fear conditioning in APPswe transgenic mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 1, p. 1–11, 2012.

- LI, L.-H. et al. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94312, 2014.
- LIU, P. et al. Menopausal depression: Comparison of hormone replacement therapy and hormone replacement therapy plus fluoxetine. **Chinese Medical Journal**, v. 117, n. 2, p. 189–194, 2004.
- LLANEZA, P. et al. **Depressive disorders and the menopause transition** *Maturitas*, 2012.
- LU, C.-L. et al. Estrogen rapidly modulates mustard oil-induced visceral hypersensitivity in conscious female rats: A role of CREB phosphorylation in spinal dorsal horn neurons. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 292, n. 1, p. G438–G446, 2007.
- LUINE, V.; FRANKFURT, M. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. **Neuroscience**, v.239, p. 34-45, 2013.
- LLOYD, J. M.; HOFFMAN, G. E.; WISE, P. M. Decline in immediate early gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during proestrus in regularly cycling, middle-aged rats. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1800–1805, 1994.
- LYNCH, J. F. et al. Activation of ER β modulates fear generalization through an effect on memory retrieval. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 421–429, 2014.
- MAKI, P. M. Critical window hypothesis of hormone therapy and cognition: a scientific update on clinical studies. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 20, n. 6, p. 695–709, 2013.
- MAKI, P. M.; HENDERSON, V. W. Hormone therapy, dementia, and cognition: the Women's Health Initiative 10 years on. **Climacteric**, v.15, n. 3, p. 256-262, 2012.
- MCCLURE, R. E. S.; BARHA, C. K.; GALEA, L. A M. 17 β -Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 1, p. 144–157, 2013.
- MCDERMOTT, C. M. et al. Estradiol replacement enhances fear memory formation, impairs extinction and reduces COMT expression levels in the hippocampus of ovariectomized female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 118, p. 167–177, 2015.
- MCEWEN, B. S. et al. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. **Neurology**, v. 48, n. 5 Suppl 7, p. S8–S15, 1997.
- MCKERNAN, M. G.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 607–611, 1997.
- MEDINA, J. F. et al. Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 122–131, 2002.
- MENDOZA-GARCÉS, L. et al. Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, v. 294, n. 11, p. 1913–9, 2011.

- MENG, F. T. et al. Inhibition of oestrogen biosynthesis induces mild anxiety in C57BL/6J ovariectomized female mice. **Neuroscience Bulletin**, v. 27, n. 4, p. 241–250, 2011.
- MEYER, R. B. R. et al. The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. **Brain Research Protocols**, v. 11, p. 9–18, 2003.
- MITRA, S. W. et al. Immunolocalization of estrogen receptor alpha in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2055–2067, 2003.
- MOHAMED, M. K.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 142, n. 3, p. 307–314, 2000.
- MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 958–965, 2007.
- MORGAN, M. A; PFAFF, D. W. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. **Hormones and behavior**, v. 40, n. 4, p. 472–482, 2001.
- MURPHY, D. L. et al. Anxiety and affective disorder comorbidity related to serotonin and other neurotransmitter systems: obsessive-compulsive disorder as an example of overlapping clinical and genetic heterogeneity. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1615, p. 20120435, 2013.
- MYSKIW, J. C. et al. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 338–351, 2008.
- NADEL, L.; HARDT, O. Update on memory systems and processes. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 251–273, 2011.
- NAFTOLIN, F. et al. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. **Neuroendocrinology**, v. 63, n. 2, p. 149–155, 1996.
- NAGATA, H.; NOZAKI, M.; NAKANO, H. Short-term combinational therapy of low-dose estrogen with selective serotonin re-uptake inhibitor (fluvoxamine) for oophorectomized women with hot flashes and depressive tendencies. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 31, n. 2, p. 107–114, 2005.
- NAKAO, T. et al. Working memory dysfunction in obsessive-compulsive disorder: A neuropsychological and functional MRI study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 8, p. 784–791, 2009.
- NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 3 SUPPL., p. 116–124, 2001.

O'NEAL, M. F. et al. Estrogen affects performance of ovariectomized rats in a two-choice water-escape working memory task. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 1, p. 51–65, 1996.

OSTLUND, H.; KELLER, E.; HURD, Y. L. Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1007, p. 54–63, 2003.

PARE, D.; DUVARCI, S. Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v.22, n. 4, p. 717-723, 2012.

PARKENING, T. A; COLLINS, T. J.; SMITH, E. R. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. **Neurobiology of aging**, v. 3, n. 1, p. 31–35, 1982.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. [s.l: s.n.]. v. 2nd, **Academic Press**, 2004.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor α . **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 1–9, 2014.

PERIS, T. S. et al. Clinical and cognitive correlates of depressive symptoms among youth with obsessive compulsive disorder. **Journal of clinical child and adolescent psychology : the official journal for the Society of Clinical Child and Adolescent Psychology, American Psychological Association, Division 53**, v. 39, n. 5, p. 616–626, 2010.

PHAN, A. et al. Low Doses of 17β -Estradiol Rapidly Improve Learning and Increase Hippocampal Dendritic Spines. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 10, p. 2299–2309, 2012.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977.

PORTON, B. et al. Isoforms of the neuronal glutamate transporter gene, SLC1A1/EAAC1, negatively modulate glutamate uptake: relevance to obsessive-compulsive disorder. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 5, p. e259, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugson anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, n. 463 p. 3– 33, 2003.

QU, N. et al. Oestrogen receptor α agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 1071-1082, 2012.

QUIRK, G. J. et al. Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Decreases the Responsiveness of Central Amygdala Output Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8800–8807, 2003.

RADULOVIC, J.; KAMMERMEIER, J.; SPIESS, J. Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 18, p. 7452–7461, 1998.

RASGON, N. L. et al. Estrogen and response to sertraline in postmenopausal women with major depressive disorder: A pilot study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 3-4, p. 338–343, 2007.

RÉCAMIER-CARBALLO, S. et al. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 351–358, 2012.

REMIJNSE, P. L. et al. Cognitive Inflexibility in Obsessive-Compulsive Disorder and Major Depression Is Associated with Distinct Neural Correlates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

ROCHA, B. A. et al. 17 β -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- α knockout (BERKO) mice. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 3, p. 637–643, 2005.

ROGAN, M. T.; STÄUBLI, U. V; LEDOUX, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 604–607, 1997.

ROTGE, J. Y. et al. The glutamate-based genetic immune hypothesis in obsessive-compulsive disorder. An integrative approach from genes to symptoms. **Neuroscience**, v. 165, n. 2, p. 408-417, 2010.

RUBIN, B. S.; BARFIELD, R. J. Priming of estrous responsiveness by implants of 17 beta-estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. **Endocrinology**, v. 106, n. 2, p. 504–509, 1980.

RUIZ, A. D. et al. Effectiveness of compounded bioidentical hormone replacement therapy: an observational cohort study. **BMC women's health**, v. 11, p. 27, 2011.

SÁ, S. I.; LUKOYANOVA, E.; MADEIRA, M. D. Effects of estrogens and progesterone on the synaptic organization of the hypothalamic ventromedial nucleus. **Neuroscience**, v. 162, n. 2, p. 307–316, 2009.

SCALI, J. et al. A prospective study of hormone therapy and depression in community-dwelling elderly women: The Three City Study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1663–1679, 2010.

SCHARFMAN, H. E. et al. Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2595–2612, 2007.

- SCHILMAN, E. A. et al. The role of the striatum in compulsive behavior in intact and orbitofrontal-cortex-lesioned rats: possible involvement of the serotonergic system. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 4, p. 1026–1039, 2010.
- SELL, S. L. et al. Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1051–1060, 2008.
- SEOANE, A.; TINSLEY, C. J.; BROWN, M. W. Interfering with Fos expression in rat perirhinal cortex impairs recognition memory. **Hippocampus**, v. 22, n. 11, p. 2101–2113, 2012.
- SHERWIN, B. B.; GRIGOROVA, M. Differential effects of estrogen and micronized progesterone or medroxyprogesterone acetate on cognition in postmenopausal women. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 2, p. 399–403, 2011.
- SHELINE, Y.I. Depression and the hippocampus: Cause or effect? **Biology Psychiatric**, v. 70, p. 308-309, 2011.
- SHMELKOV, S. V et al. Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. **Nature medicine**, v. 16, n. 5, p. 598–602, 1p following 602, 2010.
- SIMONS, J. S.; SPIERS, H. J. Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 637–648, 2003.
- SMITH, C. C. et al. Duration of estrogen deprivation, not chronological age, prevents estrogen's ability to enhance hippocampal synaptic physiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 45, p. 19543–19548, 2010.
- SMITH, C. C.; VEDDER, L. C.; MCMAHON, L. L. Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 130–142, 2009.
- SOARES, C. Mood disorders in midlife women: understanding the critical window and its clinical implications. **Menopause (New York, NY)**, v. 21, n. 2, p. 198–206, 2014.
- SQUIRE, L. R.; STARK, C. E. L.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 279–306, 2004.
- SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1380–6, 1991.
- STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.
- SULIMAN, S.; HEMMINGS, S. M. J.; SEEDAT, S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, n. July, p. 55, 2013.

- SUNDERMANN, E. E.; MAKI, P. M.; BISHOP, J. R. A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 4, p. 874–886, 2010.
- SZYMCZAK, S. et al. Increased estrogen receptor beta expression correlates with decreased spine formation in the rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, n. 5, p. 453–463, 2006.
- TERAUCHI, M. et al. Associations between anxiety, depression and insomnia in peri- and post-menopausal women. **Maturitas**, v. 72, n. 1, p. 61–65, 2012.
- TOFFOL, E.; HEIKINHEIMO, O.; PARTONEN, T. Hormone therapy and mood in perimenopausal and postmenopausal women. **Menopause**, v. 22, n. 5, p. 564–578, 2015.
- TULVING, E. Episodic and semantic memory. In: **Organization of memory**. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 381–403.
- TUSCHER, J. J. et al. Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones. **Behavioural brain research**, 2014.
- TYE, K. M. et al. Control of Anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358–362, 2011.
- UGUZ, F. et al. Obsessive – compulsive disorder in postmenopausal women : prevalence , clinical features, and comorbidity. **Australia and New Zeland College of Psychiatrics**, p. 23–25, 2010.
- VAN DER WEE, N. J. A. et al. Spatial working memory in obsessive-compulsive disorder improves with clinical response: A functional MRI study. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**. v. 17, n.1, p. 16-23.
- VANELZAKKER, M. et al. Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 12, p. 899–908, 2008.
- VEDDER, L. C. et al. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. **Hippocampus**, v. 23, n. 1, p. 108–115, 2013.
- VEGA-RIVERA, N. M. et al. Effect of sub-optimal doses of fluoxetine plus estradiol on antidepressant-like behavior and hippocampal neurogenesis in ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 57, p. 113-124, 2015.
- VELÁZQUEZ-ZAMORA, D. A.; GARCIA-SEGURA, L. M.; GONZÁLEZ-BURGOS, I. Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. **Hormones and Behavior**, v. 61, n. 4, p. 512–517, 2012.
- VIVIAN-TAYLOR, J.; HICKEY, M. Menopause and depression : Is there a link ? **Maturitas**, p. 1-5, 2014.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 31, n. 6, p. 1097–1111, 2006.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 407–414, 2007.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. **Gender Medicine**, v. 6, n. 1, p. 300–311, 2009.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 169–174, 2010.

WALF, A. A.; RHODES, M. E.; FRYE, C. A. Antidepressant effects of ER β -selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 3, p. 523–529, 2004.

WALF, A.A.; FRYE, KAOONCE, C. FRYE, C.A. Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 5, v. 122, p. 974–981, 2008.

WROOLIE, T. E. et al. Differences in verbal memory performance in postmenopausal women receiving hormone therapy: 17 β -estradiol versus conjugated equine estrogens. **The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, v. 19, n. 9, p. 792–802, 2011.

YANG, F. et al. Estradiol decreases rat depressive behavior by estrogen receptor beta but not alpha: no correlation with plasma corticosterone. **Neuroreport**, v. 25, n. 2, p. 100–4, 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 120/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Complexo amigdalóide como alvo dos efeitos do estradiol em funções cognitivas**", que tem como responsável(is) **Grace Schenatto Pereira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/06/2011**.

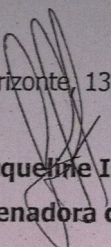
Este certificado expira-se em **8/06/2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 120/2011**, related to the project entitled "**The amygdaloid complex as a target for the estradiol, effects in cognitive**", under the supervisors of **Grace Schenatto Pereira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 8, 2011**.

This certificate expires in **June 8, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Junho de 2011.


Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)



(907) 474-7800
(907) 474-5993 fax
uaf-iacuc@alaska.edu
www.uaf.edu/iacuc

Institutional Animal Care and Use Committee

909 N Koyukuk Dr. Suite 212, P.O. Box 757270, Fairbanks, Alaska 99775-7270

March 14, 2014

To: Abel Bult-Ito, PhD
Principal Investigator
From: University of Alaska Fairbanks IACUC
Re: [568518-2] OCD Estrogen Research Protocol-Abel Lab

The IACUC reviewed and approved the Response/Follow-Up referenced above by Full Committee Review.

Received:	March 9, 2014
Approval Date:	March 13, 2014
Initial Approval Date:	March 13, 2014
Expiration Date:	March 13, 2015

This action is included on the March 13, 2014 IACUC Agenda.

PI responsibilities:

- *Acquire and maintain all necessary permits and permissions prior to beginning work on this protocol. Failure to obtain or maintain valid permits is considered a violation of an IACUC protocol and could result in revocation of IACUC approval.*
- *Ensure the protocol is up-to-date and submit modifications to the IACUC when necessary (see form 006 "Significant changes requiring IACUC review" in the IRBNet Forms and Templates)*
- *Inform research personnel that only activities described in the approved IACUC protocol can be performed. Ensure personnel have been appropriately trained to perform their duties.*
- *Be aware of status of other packages in IRBNet; this approval only applies to this package and the documents it contains; it does not imply approval for other revisions or renewals you may have submitted to the IACUC previously.*
- *Ensure animal research personnel are aware of the reporting procedures on the following page.*



(907) 474-7800
(907) 474-5993 fax
uaf-iacuc@alaska.edu
www.uaf.edu/iacuc

Institutional Animal Care and Use Committee

909 N Koyukuk Dr. Suite 212, P.O. Box 757270, Fairbanks, Alaska 99775-7270

August 15, 2014

To: Abel Bult-Ito, PhD
Principal Investigator

From: University of Alaska Fairbanks IACUC

Re: [631126-6] Acute estrogen administration in hormonal deprived compulsive-like female mice will attenuate compulsive-like behavior and restore cognitive and affective functions.

The IACUC reviewed and approved the Response/Follow-Up for corrected SOPs referenced above by Designated Member Review.

Received:	August 15, 2014
Approval Date:	August 15, 2014
Initial Approval Date:	July 30, 2014
Expiration Date:	July 30, 2015

This action is included on the September 11, 2014 IACUC Agenda.

PI responsibilities:

- *Acquire and maintain all necessary permits and permissions prior to beginning work on this protocol. Failure to obtain or maintain valid permits is considered a violation of an IACUC protocol and could result in revocation of IACUC approval.*
- *Ensure the protocol is up-to-date and submit modifications to the IACUC when necessary (see form 006 "Significant changes requiring IACUC review" in the IRBNet Forms and Templates)*
- *Inform research personnel that only activities described in the approved IACUC protocol can be performed. Ensure personnel have been appropriately trained to perform their duties.*
- *Be aware of status of other packages in IRBNet; this approval only applies to this package and the documents it contains; it does not imply approval for other revisions or renewals you may have submitted to the IACUC previously.*
- *Ensure animal research personnel are aware of the reporting procedures on the following page.*