

Sibele Sehnem

**EFEITOS DA FALHA OVARIANA PRECOCE NO
DESEMPENHO DE RATAS EM PARADIGMAS DE CONFLITO
E TESTE COGNITIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra Fernanda Barbosa Lima Christian

FLORIANÓPOLIS - SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sehnm, Sibe

EFEITOS DA FALHA OVARIANA PRECOCE NO DESEMPENHO DE
RATAS EM PARADIGMAS DE CONFLITO E TESTE COGNITIVO / Sibe
Sehnm ; orientador, Fernanda Barbosa Lima Christian -
Florianópolis, SC, 2015.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia.

Inclui referências

1. Fisiologia. 2. Perimenopausa, VCD, ansiedade,
memória, menopausa.. I. Barbosa Lima Christian, Fernanda.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS:

A realização dessa dissertação contou com a colaboração consciente ou inconsciente dos familiares e de alguns amigos, aos quais agradeço sinceramente.

Agradeço a Deus, que apesar de tantas dificuldades encontradas durante o decorrer do curso, esteve do meu lado, sendo a luz espiritual e a força motivadora não me deixando fraquejar e nem desistir.

A minha mãe Isolde e ao meu pai Francisco, que desde criança me incentivaram a sonhar e acreditar nos meus sonhos, e a estudar e acreditar que através do estudo podemos transformar a realidade em que vivemos. Também por ensinar que honestidade, perseverança e trabalho duro são ferramentas para alcançar nossas metas. E que acima de tudo, quando temos fé, tudo é possível. Obrigada meus pais!

A minha irmã Simone, exemplo de dedicação, superação e perseverança, ensinando diariamente que com trabalho duro se realiza todos os sonhos e se alcança todas as metas propostas. Obrigada pelo apoio moral, pelas palavras de incentivo, pelos puxões de orelha e pela ajuda financeira.

A minha tia Elise, pelos conselhos e pelas palavras de apoio.

A minha professora orientadora Dra. Fernanda, que logo me abriu além da porta do laboratório, o seu coração de mãe. Sou muito grata pela disponibilidade revelada ao longo do tempo que permanecemos juntas, pelos esforços empenhados, pelos conselhos, críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação desse trabalho. E pelo ser humano maravilhoso que és.

Ao Ronei Paulo, pelo amor, pelo carinho, pelas palavras de incentivo e apoio. E por tudo que vivemos juntos. Obrigada!

A professora Cilene, por permitir a realização dos experimentos em seu biotério.

Aos colegas do curso de Fisiologia na UFRGS, obrigada pela oportunidade de conhecer cada um (a) de vocês e pelo privilégio de poder estudar juntos.

A colega Francielle, pela ajuda no biotério.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida, possibilitando a realização parcial dessa pesquisa.

Aos que não foram mencionados e que irão permanecer no anonimato, que colaboraram com a realização desse trabalho, meu pedido de perdão e meus agradecimentos sinceros.

Se nada mudar, invente.
E quando mudar, entenda.
Se ficar difícil, enfrente.
E quando ficar fácil, agradeça.
Se a tristeza rondar, alegre-se.
E quando ficar alegre, contagie.
Se o caminho for longo, persista.
E quando chegar, comemore.
Se achar que acabou, recomece.
E quando recomeçar, acredite.”
(Autor desconhecido)

“... que quando nossas pernas estiverem cansadas,
possamos caminhar com a força que existe em nosso
coração. Quando nosso coração estiver cansado, possamos
mesmo assim, seguir adiante com a força da Fé!”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Os esteróides ovarianos promovem neuroproteção a diversos sistemas como o serotoninérgico e noradrenérgico, que são importantes na modulação dos transtornos de humor e em processos cognitivos. Sabe-se que na menopausa, ocorre um declínio dos níveis circulantes de estrógeno e progesterona, predispondo as mulheres a aumentos de ansiedade e a déficits de memória. A droga ovotóxica 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD) produz falha ovariana precoce em roedores e tem sido utilizada como ferramenta para o estudo das alterações neuroendócrinas e comportamentais decorrentes da menopausa. Os objetivos do presente trabalho foram estudar os efeitos da falha ovariana causada pelo VCD sobre comportamentos relacionados à ansiedade e depressão, e sobre aspectos cognitivos. Ratas Wistar foram tratadas com VCD (160 mg/Kg peso corpóreo) ou veículo por 15 dias consecutivos a partir do 28º dia de vida e estudadas 80 ou 150 dias após o início do tratamento, períodos equivalentes à perimenopausa e menopausa, respectivamente. Foram aplicados os testes comportamentais de ingestão alimentar em ambiente não-familiar, para avaliação do comportamento ansioso; de preferência entre estímulos apetitivo e social, para avaliação de possíveis alterações psicossociais; e o teste de reconhecimento de objetos, para análise da memória, no período de 80 dias após o tratamento com VCD. O teste de memória foi realizado também quando as fêmeas completaram 150 dias após o tratamento com VCD. Foi administrado um ansiolítico (Dormonid injetável, Roche) para verificação da reversão de possíveis efeitos ansiogênicos. Tanto ratas controle quanto tratadas com VCD apresentaram inibição da ingestão no ambiente não-familiar, ou seja, as flutuações hormonais resultantes da falha ovariana não afetaram esta resposta. Ratas tratadas com VCD apresentaram aumento na frequência de imobilização e na latência para investigar a fêmea co-específica, indicando que este possa ter exercido um efeito aversivo, confirmado pela reversão desta resposta pelo ansiolítico. A falha ovariana não levou a déficit de memória, seja no período relativo à perimenopausa ou à menopausa precoce e o comportamento exploratório geral das ratas também não foi afetado significativamente pelo VCD. Assim, pode-se concluir que a falha ovariana não leva a aumento dos níveis de ansiedade, pelo menos no contexto estudado, ou a déficits de memória, mas o desequilíbrio hormonal na perimenopausa parece aumentar a reatividade aversiva das ratas à presença de co-específicos familiares. Assim, o desequilíbrio hormonal das fêmeas tratadas com VCD parece

afetar um conjunto complexo de fatores cognitivos envolvidos com o processo de socialização, mas as respostas são dependentes não só das áreas cerebrais em que atuam, mas também do tipo de teste comportamental que se utiliza para estudá-los.

Palavras- chave: VCD, perimenopausa, ansiedade, memória, menopausa.

ABSTRACT

The ovarian steroids promote neuroprotection to the serotonergic and noradrenergic systems, which are important to modulate mood disorders and cognitive processes. During menopause, there is a decrease in estrogen (E) and progesterone (P) circulating levels, predisposing women to increased levels of anxiety and memory deficits. The drug 4-vinylcyclohexane diepoxide (VCD) is toxic to the ovaries, producing premature ovarian failure in rodents, and has been used as a tool to study neuroendocrine and behavioral changes due to menopause. We aimed to study the effects of ovarian failure caused by VCD on behavioral categories related to anxiety and depression, as well as on cognitive aspects. Female Wistar rats (28 days old) were treated with VCD (160 mg / kg body weight) or vehicle for 15 consecutive days and studied 80 and 150 days after the onset of the treatment. The following behavioral tests were applied: food intake in unfamiliar environment, in order to assess the anxiety behavior; preference test, between appetitive and social stimuli, to assess possible psychosocial changes; and the object recognition test, to analyze memory. An anxiolytic drug (Midazolam, Roche) was administered to the rats in order to verify the reversion of possible anxiogenic effects. Both rats, treated with VCD and controls, showed inhibition of food intake in the unfamiliar environment, suggesting that hormonal fluctuations resulted from ovarian failure do not seem to affect this response. VCD rats showed an increase in the frequency of immobilization and latency to investigate the female co-specific, indicating that they may have had an aversive effect. This data was confirmed by the reversion of this response by the anxiolytic drug. Ovarian failure did not lead to memory deficits, either in the period related to perimenopause or early menopause. General exploratory behavior was not significantly affected by the VCD. Thus, it can be concluded that ovarian failure does not lead to increased levels of anxiety or memory deficits, at least in the context studied. However, perimenopausal hormonal imbalance seems to lead to an aversive reaction to familiar co-specifics. Thus, the hormonal imbalance of VCD females appears to affect a complex set of cognitive factors involved in the process of socialization. The behavioral responses are dependent not only on the brain areas where these hormones operate, but also on the type of test that is used as a tool.

Key words: VCD, perimenopause, anxiety, memory, menopause.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estágios/ nomenclatura da idade reprodutiva normal das mulheres de acordo com o STRAW.....	23
Figura 2 Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo da mulher.....	24
Figura 3 Modelo do teste de latência para a ingestão do alimento no ambiente não familiar.....	36
Figura 4 Modelo do teste de latência para a ingestão do alimento no ambiente não familiar com a presença de um co-específico.....	37
Figura 5 Modelo de caixa para a realização do teste de Open – field.....	39
Figura 6 Posição dos objetos para a realização do teste de memória e reconhecimento de objetos.....	39
Figura 7 Latência para a ingestão do alimento em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	46
Figura 8 Duração do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	48
Figura 9 Duração do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD.....	49
Figura 10 Frequência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	50
Figura 11 Frequência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD.....	51
Figura 12 Latência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	52
Figura 13 Latência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD.....	53
Figura 14 Duração do comportamento de investigar a janela da co-habitante (estímulo social) em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	54
Figura 15 Duração do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD.....	55
Figura 16 Frequência do comportamento de investigar a janela da co-habitante (estímulo social) em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	56
Figura 17 Frequência do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD..	57

Figura 18 Latência do comportamento de investigar a janela da cohabitante (estímulo social) em ambiente não familiar em ratas controle e VCD.....	58
Figura 19 Latência do comportamento de investigar a janela da cohabitante em ambiente não familiar entre ratas controle e VCD.....	59
Figura 20 Duração do comportamento de locomoção nos 4 quadrantes da caixa de ambiente não-familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento.....	60
Figura 21 Teste de memória – Reconhecimento de Objetos, demonstrando o IR (Índice de Reconhecimento) das ratas tratadas com VCD e controles 80 dias após o início do tratamento e 150 dias após o início do tratamento.....	61
Figura 22 Teste de campo aberto, realizado com ratas no período da perimenopausa.....	63
Figura 23 Teste de campo aberto, realizado com ratas no período da menopausa.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Catálogo com a descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos avaliando a latência para a ingestão do alimento palatável em ambiente não familiar, com e sem a presença do estímulo social.....	40
Tabela 2 Catálogo com a descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos avaliando a função motora no teste de Open Field.....	42
Tabela 3 Catálogo com a descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos avaliando o teste de memória e reconhecimento de objetos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

CID – Código Internacional de Doenças
DHT - dihidrotestosterona
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IP – Intraperitoneal
IR – Índice de Reconhecimento
LH – Hormônio Luteinizante
OMS – Organização Mundial de Saúde
RO – Reconhecimento de Objetos
SNC – Sistema Nervoso Central
STRAW – Stages of Reproductive Aging Workshop
VCD – 4-Vinilciclohexano diepóxido
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1. HISTÓRICO DA MENOPAUSA.....	21
1.2 FISIOLOGIA DO CLIMATÉRIO E DA MENOPAUSA.....	23
1.3 ANSIEDADE E MENOPAUSA.....	28
1.4 DEPRESSÃO E MENOPAUSA.....	29
1.5 MEMÓRIA E MENOPAUSA.....	30
1.6 ESTUDO DA MENOPAUSA COM MODELOS ANIMAIS.....	31
1.7 OBJETIVOS	33
1.7.1 OBJETIVO GERAL.....	33
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 ANIMAIS.....	35
2.2 DROGAS UTILIZADAS.....	35
2.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	35
2.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	35
2.3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR, COM A PRESENÇA DO ESTÍMULO APETITIVO E UMA CO-HABITANTE DE CAIXA.....	37
2.3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR, COM A PRESENÇA DO ESTÍMULO APETITIVO E UMA CO-HABITANTE DE CAIXA; COM/SEM APLICAÇÃO DE ANSIOLÍTICO.....	37
2.3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4: TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	38
2.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL.....	39
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
3 RESULTADOS	45
3.1 LATÊNCIA PARA INGERIR O ALIMENTO PALATÁVEL EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	45

3.2	DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	46
3.3	FREQUÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	49
3.4	LATÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	51
3.5	DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	53
3.6	FREQUÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR.....	55
3.7	LATÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO-FAMILIAR.....	57
3.8	DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LOCOMOÇÃO POR TODOS OS QUADRANTES (Q1 À Q4) DO AMBIENTE NÃO-FAMILIAR.....	59
3.9	TESTE DE MEMÓRIA – RECONHECIMENTO DE OBJETOS (80 E 150 DIAS APÓS INICIO DO TRATAMENTO COM VCD).....	60
3.10	TESTE EM CAMPO ABERTO 80 DIAS APÓS O INICIO DO TRATAMENTO.....	62
3.11	TESTE EM CAMPO ABERTO 150 DIAS APÓS O INICIO DO TRATAMENTO.....	63
4	DISCUSSÃO	67
4.1	PERIMENOPAUSA <i>versus</i> INIBIÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTO EM AMBIENTE DESCONHECIDO.....	67
4.2	TESTE DE MEMÓRIA – RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	72
5	CONCLUSÃO	77
6	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA MENOPAUSA

Os primeiros estudos científicos sobre a menopausa datam do séc. XVIII, embora naquela época, não se empregasse o termo menopausa, mas sim “transtornos oriundos do término da menstruação”. No ano de 1710, na França, Simon Daniel Titus escreveu a primeira tese sobre os transtornos oriundos do término da menstruação. A partir dessa publicação, vários estudiosos pesquisaram e escreveram sobre o tema, ficando o séc. XVIII conhecido por muitos pesquisadores como “Século da Menstruação” (ANARTE, 1994; DE LA GÁNDARA *et al.*, 1997).

Durante o séc. XX, especificamente na década de 1930, com a descoberta do hormônio sintético, surgiram várias pesquisas que deram um incremento ao uso dos hormônios sintéticos de estrógenos. Ainda, na década de 1960, os estudos sobre a menopausa foram sendo diversificados e divididos em 3 grupos: o primeiro centrava-se basicamente nos aspectos biológicos da menopausa, geralmente considerando-a uma consequência direta da queda hormonal. O segundo grupo tratava os sintomas psicológicos, procurando relacioná-los com a queda hormonal. O terceiro grupo procurava um sintoma sociológico para a causa, proporcionando uma visão fragmentada sobre o tema, (CAROLAN, 1994; FREIXAS, 1992).

Climatério é definido como um conjunto de alterações somáticas e psíquicas que se observam na parte terminal do período reprodutivo da mulher. É igualmente visto como o período que antecede, acompanha e precede a menopausa (CATÃO, 2008).

Segundo o modelo biomédico, menopausa é o período onde as menstruações cessam, sendo estas, consequência de uma redução gradual do funcionamento dos ovários, verificando-se uma diminuição da maturação e liberação mensal dos folículos ovarianos e da produção de estrógenos (PIMENTA, LEAL e BRANCO, 2007). GIACOMINI E MELLA (2006) destacam que o “climatério tem início com o cessar da função reprodutiva e termina com a adaptação do organismo à ausência de gônadas”. Isso ocorre na mulher por volta dos 45 anos, mas não existe uma regra para o tempo de duração desta fase. Vários autores definem a menopausa como a data da última menstruação, ou seja, quando acontece o último ciclo menstrual da mulher significa que ela entrou na menopausa, período em que ocorre no ovário uma queda na produção dos hormônios femininos: o estrógeno e a progesterona

(WORLD HEALTH ORGANIZATION,1996; DENNERSTEIN,1996; PINOTTI E FONSECA,1998; AVIS, 1999; NIH, 2005).

A demarcação da menopausa, na mulher, é feita de forma retrospectiva, pois não existe um indicador direto e específico de seu início. Após doze meses de amenorréia, sem ser decorrente de uma causa patológica ou fisiológica específica, a última menstruação é caracterizada como período final da menstruação e determina a instalação da menopausa (BURGER *et al.*, 2002).

Em 2001, foi realizado o Estages of Reproductive Aging Workshop (STRAW), um consenso de especialistas que propôs uma divisão em três fases, baseando-se em critérios de alteração dos fatores bioquímicos, endócrinos, fisiológicos, fertilidade e na alteração da anatomia uterina e ovariana (SOULES *et al.*, 2001). São eles:

-período reprodutivo: inicia-se com a menarca até o início da perimenopausa (onde se inicia os períodos das alterações hormonais e variação dos ciclos menstruais).

-transição menopausal: período em que se observa o aumento dos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) e o aumento na variabilidade da duração dos ciclos menstruais. A transição para a menopausa é a última menstruação.

-pós- menopausa: período que se segue a partir da última menstruação.

De acordo com o STRAW, SOULES *et al.*(2001), a tabela a seguir demonstra os estágios reprodutivos na mulher:

↓ Menopausa

	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	
Terminologia	Idade reprodutiva			Transição menopausal			Pós- menopausa		
	Inicial	Pico	Tardia	Inicial	Tardia		Inicial	Tardia	
Duração do estágio	Variável			Variável			1 a n o	4 a n o s	A t é a m o r t e
	Regular ou variável	Regular		Duração dos ciclos variável > 7 dias diferente do normal	> 2 ciclos alternados e intervalo de amenorréia > 60 dias		Amenorréia		
Endócrino	FHS normal		↑ FSH	↑ FSH		↑ FSH			

Figura 1: Estágios/nomenclatura da idade reprodutiva normal da mulher, segundo o STRAW, (SOULES et al. 2001).

Segundo Soules *et al.* (2001); o STRAW propõe que os termos climatério e perimenopausa não sejam utilizados em trabalhos científicos, mas como não há um consenso internacional que determine sua abolição, estes termos são utilizados em várias publicações internacionais.

1.2 FISILOGIA DO CLIMATÉRIO E DA MENOPAUSA

Durante a vida reprodutiva da mulher, todos os óvulos produzidos são originados dos oócitos primários, presentes nos ovários, desde o período gestacional. Os oócitos estão envolvidos em uma camada de células da granulosa para formar os folículos primordiais (BAGNOLI e FONSECA, 1999). No quinto mês de gestação, existem em torno de 6 a 7 milhões de elementos germinativos, que desde o sétimo mês de gestação até a menopausa, diminuem continuamente devido ao processo de atresia folicular. Ao nascimento, restam em torno de 1 à 2 milhões de células, número que chega à 300 mil após a passagem da puberdade (MCKINLAY, 1996). Nessa fase, as células germinativas podem

permanecer latentes, serem recrutadas para a ovulação ou destruídas por apoptose. Durante a vida da mulher, não ocorre regeneração de oócitos (ROSEN e CEDARS, 2006).

Segundo BAGNOLI e FONSECA (1999), o ovário consiste de folículos esféricos embebidos em um estroma, circundado por uma membrana envolvendo um gameta (oócito, ovo, óvulo). Cada ciclo tem, em média, um mês de duração, envolvendo a ovulogênese e a preparação do útero para receber um óvulo fertilizado. Isto é controlado pela secreção rítmica dos hormônios estrógeno e progesterona, produzidos pelos ovários e que causam alterações nos órgãos efetores do sistema reprodutor (vagina, muco cervical, centro térmico hipotalâmico e endométrio).

O sistema hormonal feminino, assim como o masculino, é constituído por uma hierarquia hormonal. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), é liberado pelo hipotálamo, estimulando a adenohipófise à liberar os hormônios FSH e LH, ambos secretados em resposta ao GnRH. O FSH e LH, atuam sobre os ovários, liberando os hormônios estrógeno e progesterona, respectivamente, (RANCE, 2009; BAKER, 2007).

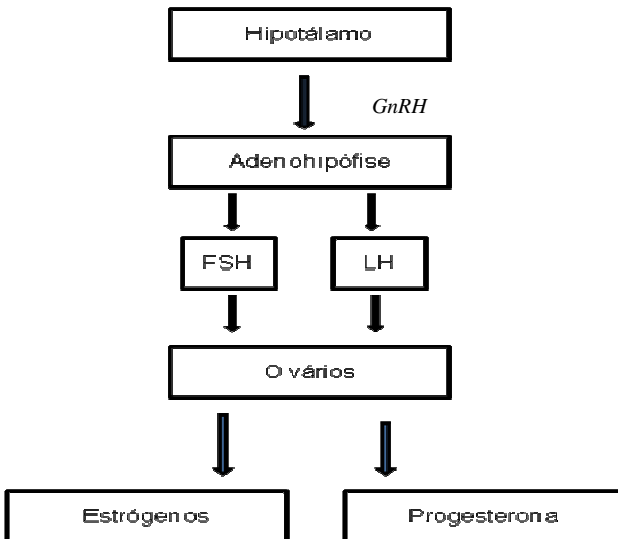


Figura 2: Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo da mulher. Adaptado de (GUYTON, 2002).

Conforme ocorrem as flutuações hormonais, o ciclo menstrual é dividido em fases. FRANKOVICH e LEBRUN (2000), consideram duas fases: folicular e lútea. A fase folicular compreende o período de menstruação até a ovulação, inclusive. A fase lútea inicia logo após a ovulação e vai até nova menstruação. Os hormônios mais atuantes na fase folicular são o FSH e o estrógeno, que possibilitam o crescimento do folículo ovariano. O LH atua mais tardiamente possibilitando a liberação do óvulo maduro e conseqüentemente, a ovulação. Na fase lútea, ocorre maior concentração de progesterona e pouca do estrógeno. Estes diminuem devido à regressão do corpo lúteo (na ausência de fecundação), gerando a degeneração do endométrio, fisiologicamente representado pela menstruação, (SAMPAIO, 2002).

Aproximadamente após 400 ovulações, a capacidade dos ovários é drasticamente diminuída, reduzindo-se a população folicular e a responsividade à ação das gonadotrofinas. Essas alterações conduzem à redução da inibina B circulante, que é um hormônio produzido pelas células da teca e da granulosa dos folículos ovarianos, cuja função principal é a inibição da produção de hormônio folículo-estimulante (FSH) pela hipófise; (OVERLIE *et al.* 2005; PORTER e REES 2002), determinando o aumento dos níveis do FSH e o processo de atresia folicular.

É sabido que ocorre uma progressiva redução da fertilidade ao longo da vida da mulher (SANTORO, 2003). A primeira alteração mensurável do envelhecimento reprodutivo da mulher é observada quando ocorre o aumento nos níveis séricos do hormônio FSH, cerca de 2 anos antes do término da menstruação. BURGER *et al.* (2002), define essas alterações como um mecanismo compensatório em resposta ao aumento dos níveis circulantes de inibina. Os níveis de estrógeno não estão diminuídos ainda nessa fase, segundo SANTORO (2005); podendo-se por vezes apresentar-se elevados. Ainda segundo este autor, a elevação do FSH resulta de uma hiper-estimulação folicular, produzindo alterações no ciclo menstrual, evidenciadas por ovulações precoces e concomitante encurtamento da fase folicular. Nesse período, em torno de 1 a 5 anos antes da menopausa, ocorre um aumento no número dos ciclos anovulatórios, que conduzem a uma maior quantidade de ciclos menstruais e padrões irregulares de fluxo menstrual (BACHMANN e LEIBLUM, 2004). Nos estágios finais da transição menopausal, pode-se constatar a clássica diminuição dos níveis estrogênicos. Este estágio de hipo-estrogenemia é o que mais consistentemente se relaciona com a sintomatologia associada ao climatério (SANTORO, 2005). Quando a falência do desenvolvimento

folicular ocorre e a produção do estrógeno não é suficiente para estimular o endométrio, instala-se a amenorréia definitiva PORTER e REES (2002), embora a mulher continue produzindo estrógeno a partir da aromatização dos androgênios, (BRANCROFT e CAWOOD, 1996). O hormônio anti-mülleriano é outro marcador de reservas ovarianas e seus níveis séricos começam a diminuir cerca de cinco anos antes da última menstruação. Este é produzido nas células da granulosa dos folículos ovarianos unicamente durante seu crescimento e reflete a transição do repouso para o crescimento dos folículos primordiais (SOWERS *et al.* 2008; RANCE, 2009). A falência ovariana promove uma mudança na composição das gonadotrofinas para isoformas ácidas, retardando a depuração do LH da circulação. Mesmo os ovários entrando em falência, o eixo hipotálamo- hipófise ainda responde aos hormônios estrógeno e progesterona exógenos (RANCE, 2009). Alguns autores afirmam que ocorre diminuição da frequência e amplitude de pulso dos pulsos de GnRH com o envelhecimento (HALL *et al.*, 2009; GILL *et al.* 2009 a; GILL *et al.* 2009b; DOWS e WISE, 2009).

GIACOMINI e MELLA (2006) destacam que o período que antecede a menopausa é marcado por sintomas que refletem diretamente na funcionalidade dos ovários. Os sintomas observados não são os mesmos em todas as mulheres, visto que a irregularidade menstrual é o sintoma mais comum nestas mulheres, atingindo 90% delas. Os sintomas que acompanham a menopausa são diversos e podem variar da falta de estrógeno ao contexto sociocultural e familiar onde a mulher está inserida.

KOSS (2004), evidencia que as oscilações hormonais dificultam o controle hipotalâmico da temperatura corporal (sintomas como as ondas de calor ou fogachos), o ritmo de sono e a composição do sangue, também afetam o comportamento apresentando alterações de humor, como ansiedade e depressão. Além disso, sem estrógeno, os ossos podem ficar porosos, os problemas cardiovasculares aumentam, a vagina desenvolve menos umidade, a pele fica mais seca e delgada. A severidade dos sintomas (fogachos e ressecamento vaginal) pode estar relacionada com os níveis hormonais de FSH e estrógeno nos anos que precedem e que sucedem a menopausa. Porém, antes do início dos ciclos irregulares, a fertilidade começa a diminuir e as concentrações destes hormônios se apresentam aumentadas (SABIA *et al.* 2007).

De acordo com GIACOMINI e MELLA (2006) os sintomas relacionados às alterações comportamentais na menopausa são sintomas subjetivos – como alterações de humor ou depressão. Além disso, afirmam que os fogachos e outros sintomas agudos associados ao

período da perimenopausa frequentemente se tornam mais intensos próximos da menopausa, quando os níveis de estrógeno circulante caem subitamente. Os hormônios estrógeno e progesterona estão presentes no sistema nervoso central (SNC), interagindo com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico de receptores e neurotransmissores. Sabendo que ambos os hormônios estão envolvidos na modulação do humor e no ajuste da termorregulação, conclui-se que estes mecanismos possam ser modulados tanto pela serotonina quanto pelo estrógeno, porque quando ocorre diminuição de seus níveis, acontecem tanto alterações de humor quanto fogachos (DEECHER *et al.* 2008; COHEN *et al.* 2006).

O estrógeno promove um efeito neuroprotetor, DUBAL e WISE (2001), e a sua falta permite que mulheres na menopausa sejam mais vulneráveis a distúrbios neurodegenerativos, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson, e acidente vascular cerebral (ZHANG *et al.* 1998a; WISE *et al.* 2001b). Já foi demonstrado que a progesterona tem ação protetora em neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe (LIMA e BETHEA 2010).

Dados clínicos comprovam a relação entre os hormônios ovarianos e a modulação do estado afetivo, já que alterações nos níveis de estrógeno e progesterona circulantes têm impacto direto sobre o sistema serotoninérgico (HALBREICH *et al.* 1990; HALBREICH *et al.* 1995). Esta relação tem impacto importante sobre a incidência de transtornos de humor como a ansiedade. Dados de experimentação animal suportam esta idéia, tanto em ratos (BIRZNIECE *et al.* 2001; KLINK *et al.* 2002b; KLINK *et al.* 2002; RAMIREZ e CARRER 1982; ROBICHAUD e DEBONNEL 2005, quanto em primatas não humanos (BETHEA *et al.* 1998; BETHEA *et al.* 2002; BETHEA e REDDY 2008 e LIMA e BETHEA 2010).

Os sintomas psicológicos na menopausa podem ser moderados ou intensos, pois as oscilações dos níveis hormonais causam desde a insônia (talvez associada às ondas de calor) até a depressão, (CATALDO NETO *et al.* 2003). Os sintomas mais comuns na menopausa são a ansiedade, depressão, irritabilidade e insônia, (CATALDO NETO *et al.* 2003). Destaca-se ainda que estes sejam sintomas comuns, pois a mulher passa por inúmeras alterações, desde a perda da capacidade reprodutiva, a saída dos filhos de casa, o aumento de peso, dentre as inúmeras alterações que o organismo e a idade lhe atribuem. A osteoporose é outra doença que se acentua com a chegada da menopausa, pois é uma doença comum da meia idade, porém estudos

mostram que ela pode se apresentar mais acentuada com a baixa produção hormonal (DAHLKE, 2000).

Apenas 10% das mulheres saudáveis desenvolvem sintomas depressivos na menopausa, pois os sintomas descritos anteriormente afetam a mulher levemente, sendo que a maioria não corre riscos de ficar deprimida (MATTHEWS, 2000). Em contrapartida, vários autores afirmam que uma porcentagem significativa de mulheres pode apresentar sintomas depressivos durante os primeiros anos da perimenopausa e da pós-menopausa, e cerca de 26% das mulheres apresenta-os mais de duas vezes durante o climatério (PIMENTA, LEAL e BRANCO, 2007). Outros autores acrescentam que as alterações de humor não se devem somente ao estado da menopausa, mas estão relacionadas com a forma como a mulher percebe a menopausa, bem como o contexto em que a pessoa está incluída e os acontecimentos significativos que sucederam em sua vida (DEEKS, 2003; GOLUB, 1992).

1.3 ANSIEDADE E MENOPAUSA

Ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos que fazem parte do desenvolvimento do indivíduo e que podem se tornar patológicos quando ocorrem de forma exagerada (ANDRADE e GORENSTEIN 1998). Pode ainda ser considerada um problema psicológico que se traduz por um sentimento de medo ou insegurança, sem motivo real (FREEMAN *et al.*, 2005). A ansiedade tem intensidade e duração variáveis, de acordo com MOORE e FINE (1992), que relatam que pode manifestar-se psicológica e fisiologicamente, como por exemplo, com sudorese nas extremidades. A ansiedade normal faz parte da vida, e na medida adequada, aumenta a capacidade de realização do indivíduo, motivando-o para o trabalho e para alcançar suas metas e objetivos (JUANG *et al.*, 2005). A ansiedade envolve tanto aspectos biológicos quanto psicossociais. Nos aspectos biológicos, vários são os neurotransmissores que a controlam, sendo os mais atuantes a serotonina e o ácido gamaaminobutírico (GABA), (GRAEFF e BRANDÃO 1997). Ambos controlam a resposta ao estresse e qualquer redução ou supressão contínua ou temporária de um deles pode resultar em ansiedade, manifestando-se clinicamente nos sintomas cardiovasculares, musculares e gastrointestinais (JUANG *et al.*, 2005).

Estudos apontam que 2 a 4% da população mundial apresentam ansiedade e que 20 a 38% das mulheres adultas se queixam dela. A

prevalência é variável na transição menopausal, alcançando de 11,8 a 53,7% das mulheres (TANGEN e MYKLETUN 2008). Em mulheres na perimenopausa os transtornos de ansiedade são mais recorrentes, devido aos vários desequilíbrios emocionais gerados pela aposentadoria, saída dos filhos de casa e perdas familiares (JUANG *et al.*, 2005). As alterações hormonais, como a queda do estrógeno podem agravar o surgimento e persistência do sintoma, não sendo a causa principal, (VERAS *et al.*, 2006). HALBREICH *et al.* (2000), consideram que a queda do estrógeno exerce impacto direto sobre o surgimento da ansiedade, em função de seu efeito ansiolítico.

Embora existam diversos testes experimentais para avaliar a ansiedade, o teste de ingestão alimentar em ambiente não-familiar é bastante simples, sensível e confiável (BODNOFF *et al.*, 1988; BODNOFF *et al.*, 1989). No entanto, o uso de privação de água ou de alimento antes do teste, a fim de estimular a ingestão, caracteriza um elemento estressor indesejável. Assim, MERALI *et al.* (2003) desenvolveram uma modificação na qual a ingestão é estimulada pela presença de um alimento altamente palatável. Estes autores observaram que, quando oferecido na caixa habitual, o “home-cage”, o alimento é rapidamente consumido. No entanto, quando oferecido em um ambiente não familiar, há um aumento de 5-10 vezes na latência para consumir o alimento, sugerindo um aumento dos níveis de ansiedade e conseqüente inibição do comportamento de ingestão. Este resultado foi comprovado quando o tratamento crônico com ansiolíticos atenuou o aumento da ansiedade no ambiente não-familiar (MERALI *et al.*, 2003).

1.4 DEPRESSÃO E MENOPAUSA

O Código Internacional de Doenças - CID 10 (1997), define a depressão como um rebaixamento do humor, redução da energia e diminuição da atividade. Nos últimos anos, a depressão vem merecendo mais atenção por ser um agravamento sério que incapacita e gera alto custo social e econômico (KAPLAN *et al.*, 1997). Os sintomas relacionados à depressão podem surgir nas diferentes fases da vida reprodutiva da mulher, sendo os principais: transição menopausal, pós parto e na segunda fase do ciclo menstrual, devido às flutuações hormonais que ocorrem nesses períodos (CAMARGOS *et al.*, 2008).

De acordo com JUANG *et al.* (2005), os indivíduos depressivos apresentam problemas relacionados à capacidade de memória, concentração, raciocínio elaborado e capacidade de decidir. Em 90% dos casos, a ansiedade é comum. Durante a fase menopausal, devido ao

declínio da produção dos hormônios ovarianos, a depressão se apresenta com maior frequência, também em função das ondas de calor, irritabilidade e insônia (FREEMAN *et al.*, 2005).

1.5 MEMÓRIA E MENOPAUSA

O estrógeno atua na estrutura e funcionamento do cérebro podendo influenciar o mecanismo de ação do sistema cognitivo das mulheres elevando a concentração de acetilcolinotransferase, enzima presente na síntese da acetilcolina, neurotransmissor envolvido nas funções mnésicas, (funções de memória episódica - que é a dificuldade de realizar novos aprendizados sobre acontecimentos recentes, como gravar as atividades realizadas no último final de semana, e a aprendizagem de novas informações), estando estes níveis bastante reduzidos na doença de Alzheimer, (WILLIAMS, 2001). Sabe-se que a função colinérgica é fundamental para o processo de aprendizagem e formação de memórias (SHERWIN 1996).

O estrógeno afeta a morfologia e a neurotransmissão de áreas conhecidas por mediar o funcionamento da memória e da atenção, (WILLIAMS, 2001). O autor supracitado salienta que a presença de receptores de estrógeno em várias regiões do cérebro, pode afetar vários sistemas de neurotransmissores, como o serotonérgico, catecolaminérgico e o gabaérgico, influenciando o sistema cognitivo nas mulheres. Uma das alterações provocadas pelo estrógeno é aumentar o número de espinhas dendríticas nos neurônios CA1 do hipocampo após 24-72 horas de sua aplicação. Os efeitos neurotróficos do estrógeno podem explicar o efeito protetor contra o declínio da cognição secundário à idade. Desta forma, os receptores de estrógeno e o fator de crescimento neuronal são encontrados principalmente em neurônios do hipotálamo e córtex cerebral, indicando que este hormônio pode facilitar as respostas neurotróficas (WILLIAMS, 2001).

Considera-se memória o sistema de estocagem e recuperação de informações adquiridas através dos sentidos, proporcionando mudanças no comportamento de seres humanos, bem como de outros animais, (BADDELEY, 2008). Este mesmo autor afirma que a memória é composta de vários sistemas interligados, cuja amplitude de duração varia de segundos à vida toda, e o sistema de estocagem pode ser desde uma pequena lista a um sistema de memória de longa duração, podendo exceder a capacidade e flexibilidade de um computador. Além disso, memória é um processo de aquisição ou aprendizagem, ou seja, só se grava aquilo que foi aprendido, além de formação, conservação e

evocação (lembança, recuperação, recordação) da informação (IZQUIERDO, 2002).

O teste de reconhecimento de objetos, utilizado para avaliar a retenção de memória, faz uso do índice de reconhecimento (I.R.), como uma medida direta da avaliação do tempo que o animal leva explorando o novo objeto, após o período de habituação, relacionado ao tempo total que o animal leva explorando ambos os objetos. Essa medida é capaz de avaliar diretamente o processo de retenção de memória (BOTTON *et al.*, 2010; GASKIN *et al.*, 2010; MUMBY *et al.*, 2002; PITERKIN *et al.*, 2008; SCHINDLER *et al.*, 2010). Neste teste, quando um estímulo familiar e um novo estímulo são apresentados conjuntamente, o novo estímulo será mais explorado até a perda de sua novidade (ANTUNES e BIALA, 2012).

O princípio do teste de memória e reconhecimento de objetos é uma resposta dos comportamentos exploratórios de ratos. Os animais têm uma tendência natural de gastar mais tempo explorando o objeto recente do que explorando o objeto antigo (familiarizado), quando existem duas escolhas (FERRO, M.M. *et al.*, 1995). Quando os objetos são familiares, os ratos podem lembrar a ordem temporal da exposição anterior e exibem uma preferência para o mais velho (MITCHELL, J.B.; LAIACONA, J, 1998). Este teste é um modelo muito utilizado na investigação sobre alterações de memória, podendo medir a memória de trabalho, ansiedade, atenção e a preferência por novidade em roedores SILVERS *et al.* (2007) e GOULART (2010), além da implicância da aplicação e tratamento realizado por fármacos e os danos causados a nível cerebral (GOULART, 2010).

1.6 ESTUDO DA MENOPAUSA COM MODELOS ANIMAIS

Modelos experimentais de menopausa são amplamente utilizados na pesquisa. São duas as formas mais comuns de indução dos sintomas semelhantes à menopausa em animais experimentais: o procedimento cirúrgico representado pela ovariectomia, que promove uma interrupção drástica da secreção hormonal e a indução química, ocorrendo perda progressiva da função ovariana (ACOSTA *et al.*, 2009; WRIGHT *et al.*, 2008).

Os modelos experimentais para o estudo da menopausa são em grande parte baseados na indução cirúrgica, não representando a falha progressiva da função ovariana que ocorre na menopausa natural. Ratas ovariectomizadas não representam fielmente os efeitos da transição da

menopausa natural, uma vez que a ovariectomia produz uma cessação rápida e dramática da função ovariana, não ocorrendo o declínio hormonal gradual que ocorre na perimenopausa. Recentemente foi demonstrado que o composto químico 4- vinilciclohexano diepóxido (VCD) induz a perda gradativa da função ovariana (ACOSTA *et al.*, 2009; HOYER e SIPES, 2007; MAYER *et al.*, 2001; MAYER, L. *et al.*, 2002). A exposição de roedores a este composto tem sido utilizada como um modelo experimental de menopausa química, pois ela diminui significativamente o número de folículos imaturos nos ovários de ratas e camundongas, diminuindo, portanto, a reserva de folículos para a ovulação (SPRINGER *et al.*, 1996). Mamíferos nascem com um número finito de folículos primordiais e o esgotamento destes folículos resulta em uma falência ovariana e conseqüentemente na menopausa. Assim, qualquer substância tóxica que atinja estes folículos extensivamente pode causar falência ovariana prematura THOMPSON *et al.* (2002), acelerando assim o processo natural de atresia folicular (SPRINGER *et al.*, 1996). No entanto, os mecanismos de ação do VCD para induzir a toxicidade no folículo são desconhecidos. O principal local de indução de apoptose parece ser o interior das células da granulosa (BILLING *et al.*, 1993). Embora não seja um desregulador endócrino direto, o VCD pode também reduzir o peso do útero e pode interromper ciclos estrais normais em ratas adultas (MAYER *et al.*, 2001).

A destruição folicular induzida pela ação do VCD pode resultar da ruptura do ciclo de retroalimentação no eixo hipotálamo-hipofisário, alterando seu funcionamento (HOYER e SIPES, 2007). Portanto, as alterações causadas pela ação do VCD no ovário aumentariam os níveis circulantes de FSH na menopausa. Os autores supramencionados mostraram que as fêmeas tratadas com VCD apresentam uma insuficiência ovariana, aumento dos níveis de FSH circulante, falta de ciclicidade (determinada por esfregaços vaginais) e completa ausência de estruturas lúteas e foliculares no ovário (observados morfológicamente). Esses resultados demonstram que a extensa perda dos folículos pré-antrais precede interrupções no eixo de retroalimentação hipotálamo/hipófise. O uso do VCD como indutor de menopausa “química” produz a perda gradual dos folículos ovarianos primários e primordiais, e é um modelo interessante para se fazer inferências sobre os efeitos da perda folicular na neuroquímica das mulheres em menopausa, incluindo aquelas relacionadas aos transtornos de humor. Resultados recentes mostraram que ratas tratadas com VCD apresentam níveis significativamente maiores de ansiedade 80 dias após o tratamento, quando submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado

(REIS *et al.* 2011), sugerindo que a falha ovariana possa influenciar o estado afetivo.

Nossas hipóteses principais são que 1) as ratas tratadas com VCD apresentam uma inibição da ingestão mais pronunciada do que as controles no ambiente não-familiar, pois a literatura mostra que o tratamento com VCD leva ao aumento dos níveis de ansiedade (REIS *et al.*, 2014); e 2) as ratas tratadas com VCD apresentam déficit de memória, já que as flutuações hormonais causadas pela falha ovariana levam a esta resposta em humanos e em roedores.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da falha ovariana precoce sobre o desempenho de ratas em um teste de preferência apetitiva e social, utilizando o modelo de menopausa química. Avaliar ainda os efeitos da falha ovariana sobre a capacidade de memória em fêmeas nas fases referentes à perimenopausa e menopausa.

1.7.2 Objetivos Específicos

I) Avaliar se a falha ovariana precoce em ratas Wistar tratadas com VCD, 80 dias após o tratamento, aumenta a latência para ingestão alimentar em ambiente não familiar, em comparação às fêmeas controle, sugerindo aumento dos níveis de ansiedade.

II) Avaliar se a presença de um estímulo social (co-habitante de caixa) pode alterar o desempenho de ratas Wistar tratadas ou não com VCD, 80 dias após o tratamento, no teste de ingestão alimentar em ambiente não-familiar.

III) Verificar se o tratamento com o ansiolítico Midazolam é capaz de reverter as respostas dadas pelos animais no teste comportamental em ambiente não familiar.

IV) Determinar, por meio de um teste de memória (reconhecimento de objetos), se a falha ovariana precoce causa déficit cognitivo nas fases referentes à perimenopausa (80 dias pós tratamento) e menopausa precoce (150 dias pós-tratamento).

V) Avaliar se a falha ovariana precoce em ratas tratadas com VCD (80 e 150 dias após o tratamento) altera o comportamento exploratório geral de ratas em campo aberto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Cento e vinte ratas Wistar, oriundas do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com idade de 21 dias (pós desmame), foram alojadas no biotério setorial (BIO066) do Departamento de Ciências Fisiológicas, em temperatura ambiente controlada de 21± 2°C, com acesso a água e ração para roedores (Nuvital®) *ad libitum*. O fotoperíodo foi ajustado de modo que os animais permaneceram em ciclo claro/escuro invertido de 12-12 horas (luzes apagadas às 6:00 horas e acesas às 18:00 horas), para que fossem avaliados em seu período de atividade (noturno). Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o número PP00842.

2.2 DROGAS UTILIZADAS E ADMINISTRAÇÃO

O VCD (160mg/kg), Sigma - Aldrich Brasil Ltda, foi dissolvido em óleo de milho e administrado via intraperitoneal (i.p.). O Midazolam (0,5mg/kg), Dormonid[®], Roche, Brasil foi dissolvido em salina 0,9% e administrado via i.p.

Após a chegada dos animais ao biotério setorial (BIO066), as fêmeas foram mantidas em caixas de polipropileno para ratos (50 x 30 x 10 cm, cobertas com piso de serragem), sendo 3 animais por caixa. Receberam água e comida *ad libitum*, e a limpeza ocorreu 2 vezes por semana, sempre no mesmo horário.

Quando completaram 28 dias de idade, os animais foram divididos em 2 grupos: grupo VCD e grupo controle, iniciando-se o tratamento com a aplicação da droga VCD na dose de 160mg/Kg de acordo com (MAYER, L. et al, 2002; HAAS, J. R. et al, 2007; KECK, M. et al, 2007; LOHFF, J. et al, 2005;) ou do controle (óleo de milho). Este tratamento ocorreu durante 15 dias consecutivos. Após este período, as fêmeas foram mantidas em suas caixas, recebendo água e comida *ad libitum*.

2.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

2.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

Quando completaram 70 dias após o início do tratamento com o VCD, foram realizados diariamente testes para a habituação dos animais ao alimento altamente palatável (chocolate Bis, Lacta, Kraft Foods Ltda). O chocolate foi escolhido aleatoriamente por possuir um aroma marcante e por ser fácil e rapidamente ingerido pelos animais, de acordo com experimentos - piloto realizados em nosso laboratório. O teste se deu com a introdução de um pedaço de alimento palatável para cada animal sobre a maravalha, no canto da caixa “home-cage”. A latência para ingestão medida pelo experimentador para cada um dos 3 animais por 5 minutos. Uma vez que a latência se estabilizou, ou seja, houve menos de 20% de variabilidade, os experimentos no ambiente não-familiar foram iniciados.

Os experimentos iniciaram-se quando as ratas Wistar completaram 76 dias após o início do tratamento com VCD e se estenderam até os 83 dias após o início do tratamento com o VCD.

O teste 1(que corresponde ao dia 1), foi a avaliação da latência para a ingestão do alimento no ambiente familiar, ou seja, na caixa de acondicionamento dos animais no biotério.

O teste 2 (que corresponde ao dia 2), foi o **teste de Inibição da ingestão alimentar em ambiente não familiar** onde os animais foram expostos ao ambiente não familiar e a latência para a ingestão do estímulo apetitivo foi avaliada, conforme a figura 3. Os comportamentos exploratórios também foram avaliados neste período. Estes testes foram repetidos por mais 2 dias (dias 3 e 4), com a apresentação do alimento palatável e a mensuração da latência para ingestão do alimento, bem como avaliação dos comportamentos exploratórios.

Todos os testes foram filmados durante 10 minutos, no período entre 7 e 14 horas.



Figura 3: Latência para a ingestão do estímulo apetitivo no ambiente não familiar.

2.3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR, COM A PRESENÇA DO ESTÍMULO APETITIVO E UMA CO-HABITANTE DE CAIXA.

Um novo grupo de animais foi testado neste protocolo. Foi utilizado o mesmo protocolo descrito em 2.3.1. No entanto, no dia 3, quando os animais foram re-expostos ao ambiente não familiar com o estímulo apetitivo, foi inserida também uma fêmea co habitante de caixa (escolhida aleatoriamente e sendo a mesma para cada animal em teste durante a realização dos experimentos), ou seja, uma co-específica familiar (Fig. 4). Avaliou-se novamente a latência para a ingestão do estímulo apetitivo e demais comportamentos exploratórios da caixa. Todos os testes foram filmados durante 10 minutos, no período entre 7 e 14 horas.

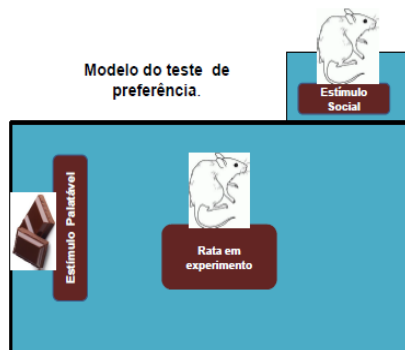


Figura 4: Latência para a ingestão do estímulo apetitivo. Re-exposição das ratas ao ambiente não familiar com a presença do estímulo apetitivo e do estímulo social.

2.3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3: TESTE DE INIBIÇÃO DA INGESTÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR, COM A PRESENÇA DO ESTÍMULO APETITIVO E UMA CO-HABITANTE DE CAIXA; COM/SEM APLICAÇÃO DE ANSIOLÍTICO.

Um novo grupo de animais foi testado neste protocolo. Foi utilizado o mesmo protocolo descrito em 2.3.2. No entanto, no dia 3, 30 minutos antes dos animais serem expostos ao ambiente não familiar com o estímulo apetitivo + a presença da co-específica, eles receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do ansiolítico Midazolam ou de salina, para

a avaliação da latência para a ingestão do estímulo apetitivo e demais comportamentos exploratórios da caixa. Este teste foi repetido por mais 1 dia (dia 4), com a apresentação do alimento palatável sem a presença da co-específica e nem a injeção de ansiolítico. Foi realizada a mensuração da latência para ingestão do alimento, bem como avaliação dos comportamentos exploratórios.

2.3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4: TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Um novo lote de animais (n=40) permaneceu alojado em caixas de polipropileno para ratos, (“home-cage”; 5 animais/caixa), sendo dividido em 2 grupos para a realização do experimento. Os grupos 1 e 2 foram formados por 20 animais cada, sendo 10 animais tratados com VCD e 10 animais controle.

Um dos grupos experimentais foi submetido ao teste de reconhecimento de objetos aproximadamente 80 dias após o início do tratamento, período compreendido como perimenopausa. O outro grupo foi avaliado aproximadamente 150 dias após o início do tratamento, período compreendido como menopausa precoce.

No período entre às 7:00 e 18:00 horas os animais foram testados em uma caixa retangular (Cx L x A: 1 m x 50 cm x 50 cm), na cor preta, previamente limpa com ácido acético 0,1%. Primeiramente, as fêmeas foram submetidas a habituação de 10 minutos ao ambiente (Figura 5) e uma semana após foram submetidas ao teste de reconhecimento de objetos, de acordo com protocolo de AN-LI WANG, *et al.* 2010. O teste de reconhecimento de objetos ocorreu em 3 etapas, com intervalo de 1 hora entre cada etapa. Na primeira etapa, foram colocados quatro objetos de plástico, dispostos de forma igual em todas as sessões (Figura 6A). Após o intervalo de uma hora, ocorreu o primeiro re-teste, com a presença de quatro objetos de porcelana, também colocados de forma igual para todas as sessões (Figura 6B). Novamente, após uma hora ocorreu o segundo re- teste, permanecendo um objeto de plástico na sua posição original (antiga), e outro sendo colocado em outra região na caixa (alterado), o mesmo para os objetos de porcelana: um na posição original (antiga) e outro sendo colocado em outra região da caixa (alterado), (Figura 6C). Todos os testes foram filmados durante 5 minutos.



Figura 5: Caixa utilizada para realizar o teste open field.

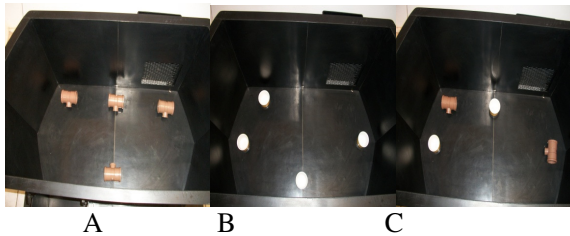


Figura 6: Posição dos objetos para a realização do teste de memória e reconhecimento de objetos. Em A, posição dos objetos de plástico. Em B, posição dos objetos de porcelana. Em C, posição dos objetos contendo um objeto de porcelana e plástico nas suas posições originais e outro de plástico e porcelana em posições alteradas.

A análise dos resultados do teste de reconhecimento de objetos foi realizada por meio do Índice de Reconhecimento (IR), o qual é encontrado utilizando-se a seguinte equação, de acordo com (YA-PING TANG, 1999). O $IR = \frac{\text{tempo gasto explorando objeto em posição alterada}}{\text{tempo gasto explorando objeto em posição alterada} + \text{tempo gasto explorando objeto em posição original}}$. Desta forma, encontrou-se um IR para os objetos de plástico, os quais foram apresentados aos animais primeiro e por esta razão foram denominados “objeto familiar”; e um IR para os objetos de porcelana, apresentados aos animais posteriormente, no re-teste, e por esta razão denominados “objeto novo”.

2.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL

Os registros das imagens foram feitos com uma webcam (Microsoft), acoplada a um notebook, utilizando o programa AMCAP. Os vídeos foram armazenados no notebook para análise posterior, realizada pelo software de análise comportamental Ethowatcher[®],

desenvolvido pelo Laboratório de Neurofisiologia Comparada (IEB-UFSC, CRISPIM JUNIOR et al, 2012), que esta disponível gratuitamente no site www.ethowatcher.ufsc.br. O software permite a criação manual de um catálogo comportamental com as categorias que serão avaliadas e permite salvá-los para posteriores análises. Terminada a análise, o programa gera um arquivo contendo a latência, duração e frequência para cada uma das categorias comportamentais executadas. Os dados foram gerados pela análise minuto a minuto, oferecida pelo programa. Os catálogos comportamentais utilizados neste estudo estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Catálogo com descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos realizados avaliando a latência para a ingestão de alimento palatável em ambiente desconhecido e na presença de estímulo social.

Comportamento	Sigla	Descrição
Cheirar o exploratório da caixa.	C1	O animal explora todo espaço da caixa com ou sem locomoção, movimentando constantemente a cabeça em várias direções.
Cheirar o chocolate Bis e o local depois de comer o Bis.	C2	O animal cheira o local onde se encontra o chocolate Bis e, após comê-lo, volta para cheirar o local.
Comer o chocolate Bis.	C3	Momento em que o animal começa a comer o chocolate Bis.
Correr	C4	O animal explora o espaço da caixa através de corridas.
Imobilização	I1	O animal se mantém parado, sem realizar movimentos.

Esquadrinhar Janela 1	J1	O animal se mantém em pé apoiado na grade que separa a câmara anexa (local do estímulo social), no quadrante 1.
Esquadrinhar Janela 3	J3	O animal se mantém em pé apoiado na grade que separa a câmara anexa (diagonal oposta na caixa), no quadrante 3.
Locomoção Quadrante 1	Q1	Locomoção realizada no quadrante próximo à grade que separa a câmara anexa onde foi exposto estímulo social.
Locomoção Quadrante 2	Q2	Locomoção realizada no quadrante paralelo ao quadrante 1.
Locomoção Quadrante 3	Q3	Locomoção realizada no quadrante onde se localiza a outra câmara anexa da caixa.
Locomoção Quadrante 4	Q4	Locomoção realizada no quadrante paralelo ao quadrante 3.
Esquadrinhar exploratório	R1	O animal se mantém em pé, escorado à parede da caixa, em diversas regiões da mesma, explorando-a com movimentos realizados com a cabeça, (animal levanta as patas dianteiras e movimenta

		a cabeça em uma postura exploratória.
--	--	---------------------------------------

Tabela 2: Catálogo com descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos realizados para avaliar a função motora no teste de Open Field.

Comportamento	Sigla	Descrição
Movimentação na caixa	C1	O animal realiza movimentos de andar ou correr pela caixa.
Passagem pelo centro da caixa	C2	Quantidade de vezes que o animal passa pelo centro da caixa, seja andando ou correndo.
Permanência no centro da caixa	C3	Quantidade de vezes que o animal permanece no centro da caixa.
Esquadrinhar	R1	O animal se mantém em pé, escorado à parede da caixa, explorando-a com movimentos realizados com a cabeça, (o animal levanta as patas dianteiras e movimenta a cabeça em uma postura exploratória.
Auto limpeza	A1	Ato de limpeza corporal.

Tabela 3: Catálogo com descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos, para os experimentos realizados para avaliar o teste de memória e reconhecimento de objetos.

Comportamento	Sigla	Descrição
Cheirar os objetos de plástico.	C2	O animal cheira os objetos e explora-os, na sua posição original.
Cheirar o objeto de plástico em posição alterada	C3	O animal cheira os objetos na nova posição e explora-os.
Cheirar os objetos de porcelana.	C4	O animal cheira os objetos e explora-os, na sua posição original.
Cheirar o objeto de porcelana em posição alterada	C5	O animal cheira os objetos na nova posição e explora-os.
Imobilização	I1	O animal se mantém parado, sem realizar movimentos.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram analisados estatisticamente por meio do programa Prisma Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). Os resultados dos testes comportamentais de ingestão em ambiente não familiar foram realizados por meio de Análise de Variância de Medidas Repetidas (Teste de Friedman), seguida do pós-teste de Dunn e estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

Os resultados do teste de reconhecimento de objetos foram analisados por meio do teste Anova de duas vias (Two Way Anova), tendo como fatores o tratamento com VCD/óleo e o objeto analisado (familiar/novo). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e o nível de significância adotado para todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 LATÊNCIA PARA INGERIR O ALIMENTO PALATÁVEL EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

Tanto as ratas controle quanto as tratadas com VCD apresentaram inibição do comportamento ingestivo quando expostas pela primeira vez ao ambiente não-familiar (Dia 2- Fig. 7A), comparadas ao ambiente familiar (Dia 1). A latência voltou aos níveis basais na primeira re-exposição dos dois grupos estudados (Dia 3) e se manteve na segunda re-exposição (Dia 4- Fig. 7A). Não houve diferenças significantes entre os grupos controle e VCD em nenhum dos dias estudados.

A figura 7B mostra os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD ao ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa. Na presença da co-habitante (Dia 3) tanto ratas controle quanto as tratadas com VCD mantiveram a inibição da ingestão na primeira re-exposição comparando-se o Dia 1 vs Dia 3 (Fig. 7B). No dia 4, quando houve a segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante, fêmeas controles e tratadas com VCD deixaram de apresentar a inibição da ingestão de alimento (Fig. 7B).

A injeção do ansiolítico Midazolam antes da primeira re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 3- em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa), não reverteu totalmente a resposta de inibição da ingestão do alimento palatável em fêmeas controle ou tratadas com VCD (Fig. 7C), já que ambos os grupos apresentaram latência significativamente menor do que no Dia 2, mas ainda maior do que no Dia 1 (Fig. 7C). Interessantemente, na re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 4), sem a injeção de Midazolam e sem a presença da co-habitante, ambos os grupos estudados mantiveram a inibição da ingestão do alimento, comparados aos dias 1 e 2 (Fig. 7C). Os animais VCD não foram diferentes dos controles em nenhum dos 4 dias de experimento.

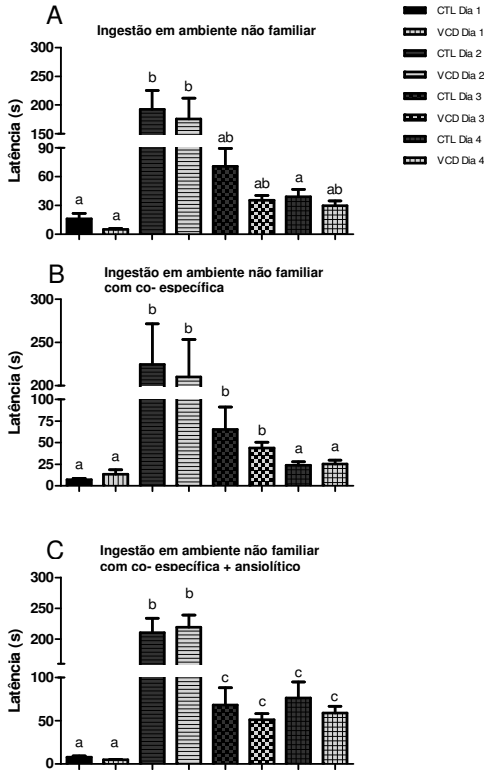


Figura 7: Latência para a ingestão do alimento palatável em ambiente não familiar sem a presença da co-específica (A), com a presença da co-específica (B) e com a presença da co-específica + administração de ansiolítico (C) em ratas tratadas com óleo de milho - controles ou VCD. Dia 1: latência exibida pelos animais no ambiente familiar; Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A) ou com a presença da co-habitante (B e C), com injeção de Midazolam (C); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante (A, B e C). Dados expressos em média \pm erro padrão, Teste de Friedman, pós-teste de Dunn, para $p < 0,05$.

3.2 DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

A análise comportamental mostrou que as ratas tratadas com VCD, assim como as ratas controles não apresentaram alteração

significativa no comportamento de imobilização quando expostas pela primeira vez ao ambiente não familiar (Dia 2- Fig. 8A e 8B) ou re-expostas (Dias 3 e 4- Fig. 8A e 8B).

As figuras 8C e 8D mostram os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD, respectivamente, ao ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa. A presença da co-habitante (Dia 3) não afetou significativamente a duração do comportamento de imobilização em ratas controles (Fig. 8C) ou em ratas tratadas com VCD (Fig. 8D). No dia 4, a re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante, também não alterou significativamente a duração do comportamento de imobilização em nenhum dos grupos experimentais estudados (Dia 4-Fig. 8C e 8D).

A injeção do ansiolítico Midazolan (Dormonid injetável, Roche) antes da primeira re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 3), em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa, não alterou significativamente a duração do comportamento de imobilização em ratas controles (Fig. 8E) ou em ratas tratadas com VCD (Fig. 8F). A re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 4), sem a injeção de Midazolan e sem a presença da co-habitante, também não alterou a duração do comportamento de imobilização em nenhum dos grupos estudados (Fig. 8E e 8F). Quando as ratas controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental, observou-se que as ratas tratadas com VCD apresentaram menor tempo de imobilização na presença da co-habitante, após a injeção de Midazolan, comparadas às controles (Fig. 9).

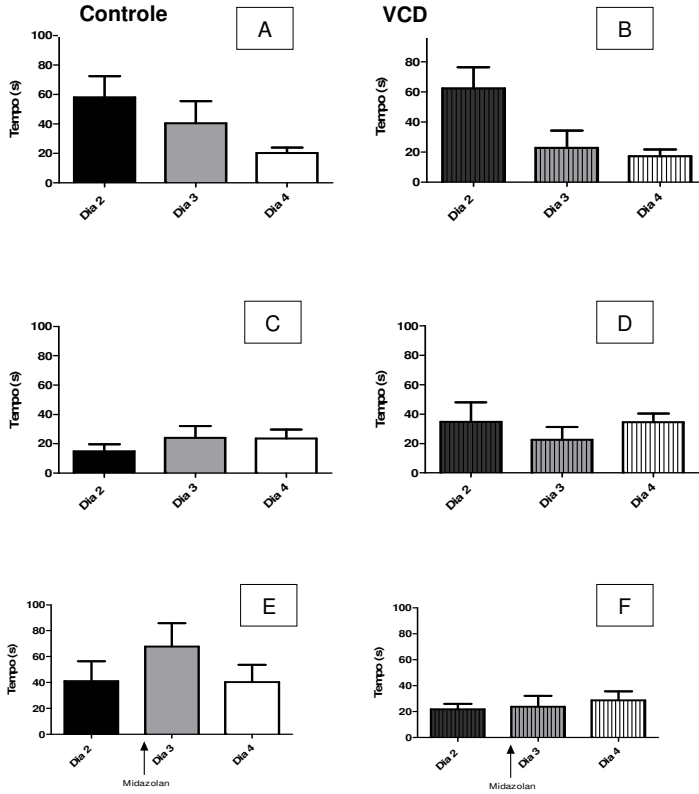


Figura 8: Duração do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratos tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolol (E e F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

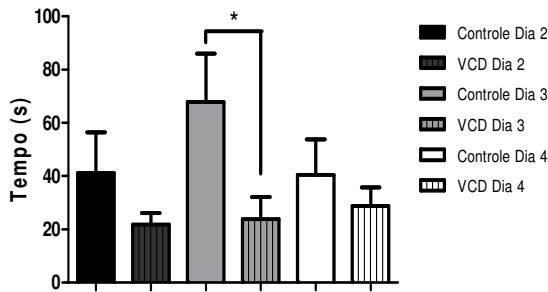


Figura 9: Duração do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; Teste Mann-Whitney.

3.3 FREQUÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

A análise comportamental mostrou que as ratas controles apresentaram uma diminuição significativa na frequência do comportamento de imobilização da primeira exposição ao ambiente não familiar (Dia 2) para a re-exposição (Dia 3) (Fig. 10A). Já as fêmeas tratadas com VCD não apresentaram alteração significativa da frequência de imobilização ao longo das exposições e re-exposições ao ambiente não familiar (Fig. 10B).

Quando a co-habitante de caixa foi colocada no ambiente não familiar, as fêmeas controle não apresentaram alteração significativa da frequência de imobilização ao longo das exposições e re-exposições ao ambiente não familiar, com ou sem a presença da co-habitante (Fig. 10C). Entretanto, as fêmeas tratadas com VCD apresentaram aumento da frequência de imobilização na segunda re-exposição (Dia 4), comparado aos dias de exposição sem a co-habitante (Dia 2) e primeira re-exposição com a co-habitante (Dia 3 - Fig 10D).

As figuras 10E e 10F mostram os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD, respectivamente, ao ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa após a injeção do ansiolítico Midazolam. A injeção do ansiolítico em conjunto com a

introdução da co-habitante de caixa, não alterou significativamente a frequência do comportamento de imobilização em ratos controles (Fig. 10E Dia 2 vs Dia 3) ou em ratos tratadas com VCD (Fig. 10F). No entanto, a re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 4), sem a injeção de Midazolam e sem a presença da co-habitante, reduziu a frequência do comportamento de imobilização nas ratos controles mas não nas VCD (Fig. 10E e 10F). Quando as ratos controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental, não foram observadas diferenças significativas, ou seja, a presença da co-habitante e a administração do ansiolítico afetaram igualmente as ratos controle e VCD. Com relação à frequência de imobilização (Fig. 11).

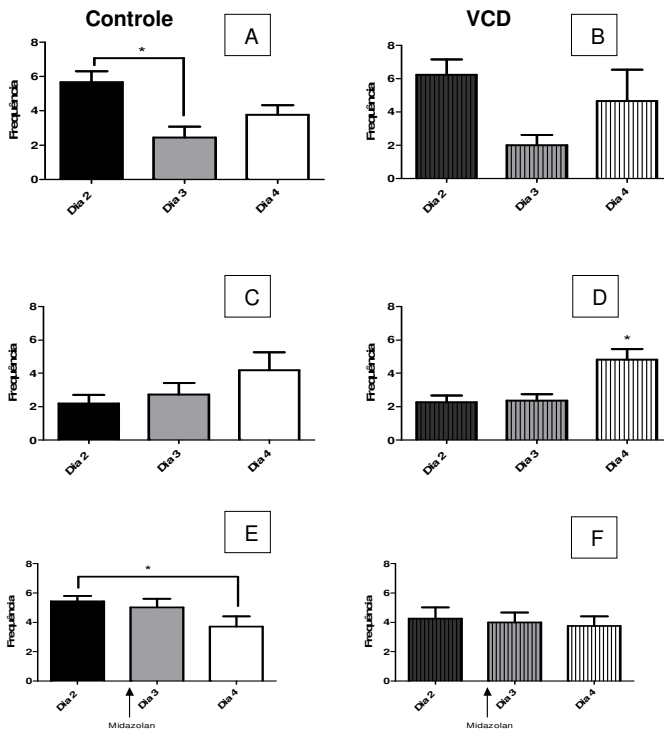


Figura 10: Frequência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratos tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolam (E e

F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

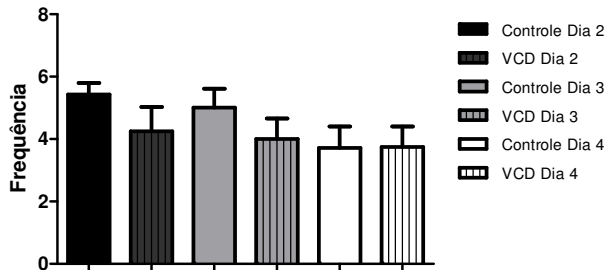


Figura 11: Comparação da frequência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste Mann-Whitney.

3.4 LATÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE IMOBILIZAÇÃO EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

As ratas tratadas com VCD, assim como as ratas controles não apresentaram nenhuma alteração significativa na latência do comportamento de imobilização quando expostas pela primeira vez ao ambiente não familiar (Dia 2- Fig. 12A e 12B) ou re-expostas (Dias 3 e 4- Fig. 12A e 12B).

As figuras 13C e 13D mostram os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD, respectivamente, ao ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa. A presença da co-habitante (Dia 3) não afetou significativamente a latência do comportamento de imobilização em ratas controles (Fig. 12C) ou em ratas tratadas com VCD (Fig. 12D). No dia 4, a re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante, também não alterou significativamente a duração do comportamento de imobilização

em nenhum dos grupos experimentais estudados (Dia 4-Fig. 12C e 12D).

A injeção do ansiolítico Midazolol (Dormonid injetável, Roche) antes da primeira re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 3), em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa, não alterou significativamente a latência do comportamento de imobilização em ratos controles (Fig. 12E) ou em ratos tratados com VCD (Fig. 12F). A segunda re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 4), sem a injeção de Midazolol e sem a presença da co-habitante, também não alterou a latência do comportamento de imobilização em nenhum dos grupos estudados (Fig. 12E e 12F). Quando as ratos controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental, não foram observadas diferenças significativas, ou seja, a presença da co-habitante e/ou a administração do ansiolítico afetaram igualmente as ratos controle e VCD com relação à latência de imobilização (Fig. 13).

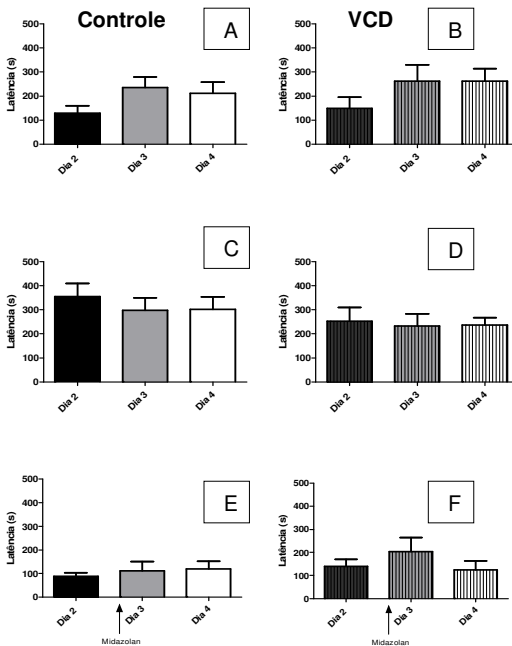


Figura 12: Latência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar em ratos tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não-familiar, sem a presença da

co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolam (E e F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

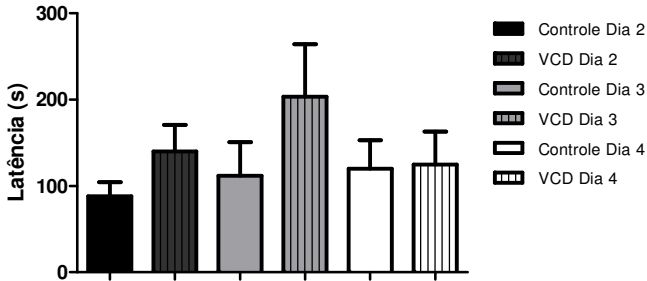


Figura 13: Comparação da latência do comportamento de imobilização em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste Mann-Whitney.

3.5 DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

Os resultados mostraram que as ratas controles apresentaram um aumento significativo no tempo gasto investigando a janela da co-habitante no dia 3, mesmo sem a presença da mesma na janela (Fig. 14A). Já as ratas tratadas com VCD não apresentaram variação significativa na duração do comportamento investigativo na janela da co-habitante quando a mesma não estava presente (Fig. 14B).

Quando a co-habitante de caixa foi colocada no ambiente não familiar, as fêmeas controle e as tratadas com VCD não apresentaram alteração significativa da duração da investigação da janela da co-habitante ao longo das exposições, nem mesmo quando a co-habitante estava presente no experimento (Dia 3) (Fig. 14C e 14D).

As figuras 14E e 14F mostram os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD, respectivamente, ao ambiente não-familiar na presença de uma co-habitante de caixa após a injeção do

ansiolítico Midazolam. A injeção do ansiolítico em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa, aumentou significativamente o tempo gasto pelas ratas controle, investigando a janela da co-habitante quando a mesma estava presente (Dia 2 x Dia 3- Fig. 14E). No entanto, a re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 4), sem a injeção de Midazolam e sem a presença da co-habitante, não alterou este comportamento nas ratas controles (Fig. 14E). Por outro lado, nas ratas tratadas com VCD, o comportamento de investigar a janela da co-habitante não foi afetado significativamente pela administração do ansiolítico e nem pela presença da co-habitante (Fig. 14F). Quando as ratas controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental, não foram observadas diferenças significativas entre elas com relação à duração da investigação da janela da co-habitante (Fig. 15).

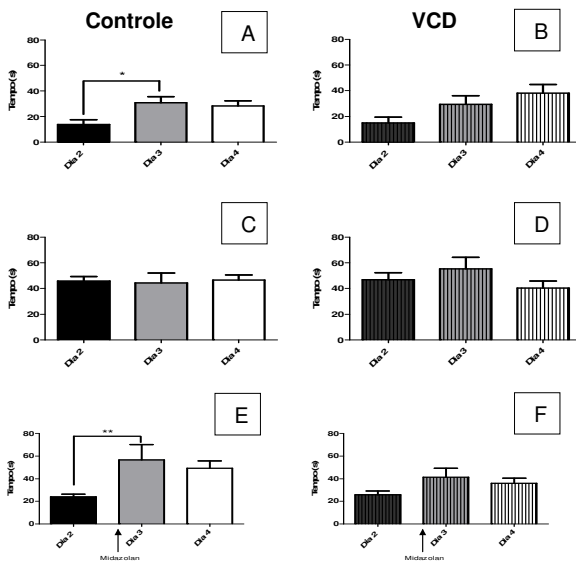


Figura 14: Duração do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar em ratas tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolam (E e F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

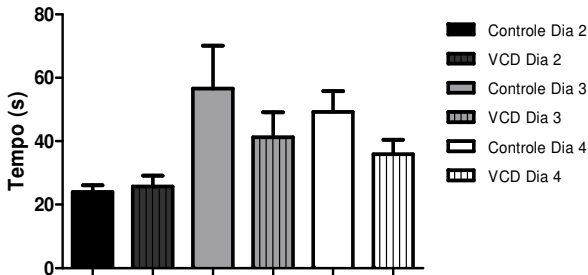


Figura 15: Comparação da duração do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste Mann-Whitney.

3.6 FREQUÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

As ratas tratadas com VCD, assim como as ratas controles, não apresentaram nenhuma alteração significativa na frequência do comportamento de investigar a janela da co-habitante, tanto na ausência (Fig. 16A e 16B) quanto na presença da mesma na caixa de experimentação (Fig. 16C e 16D).

A administração do ansiolítico antes da primeira re-exposição ao ambiente não familiar (Dia 3), em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa, não alterou significativamente a frequência de investigação em ratas controles na presença da co-habitante (Dia 3), mas estas apresentaram um aumento significativo da frequência de visitas à co-habitante na segunda re-exposição (Dia 4), quando a co-habitante não estava mais presente (Fig. 16E). As ratas tratadas com VCD, por outro lado, não apresentaram alteração da frequência de visitas à co-habitante após a administração do ansiolítico, na presença ou na ausência da mesma na caixa (Fig. 16F). Quando as ratas controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental, não foram observadas

diferenças significativas entre elas com relação à frequência de investigação na janela da co-habitante (Fig. 17).

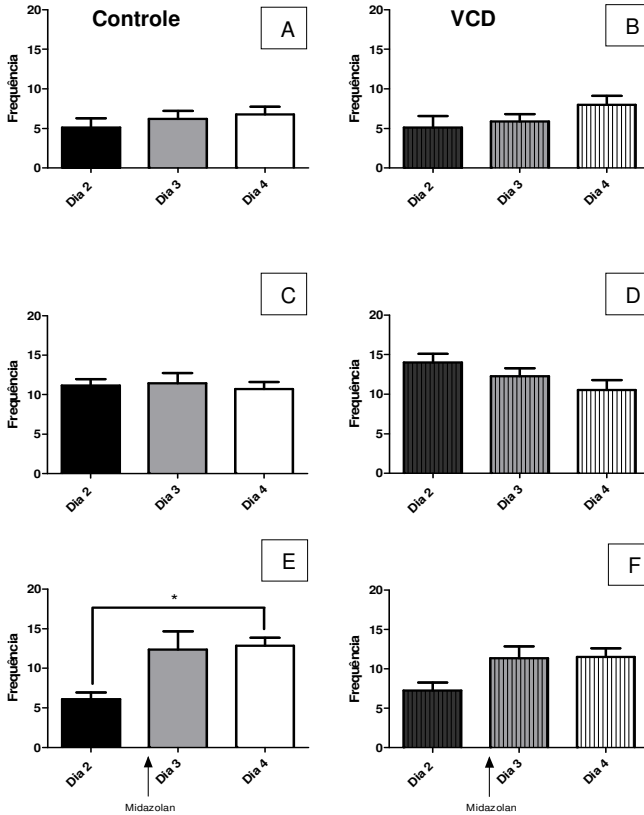


Figura 16: Frequência do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar em ratas tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolol (E e F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

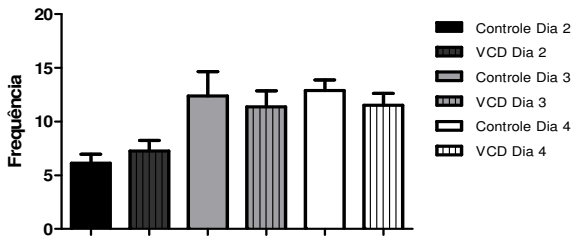


Figura 17: Comparação da frequência do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste Mann-Whitney.

3.7 LATÊNCIA DO COMPORTAMENTO DE INVESTIGAR A JANELA DA CO-HABITANTE EM AMBIENTE NÃO FAMILIAR

Os resultados mostraram que, na ausência da co-habitante de caixa, nenhum dos grupos estudados, controle ou tratadas com VCD, apresentaram variação significativa na latência para investigar a janela da co-habitante (Fig. 18A e 18B).

Quando a co-habitante de caixa foi colocada no ambiente não familiar, as fêmeas controle mantiveram o mesmo perfil comportamental, ou seja, não apresentaram alteração significativa da latência para investigação da co-habitante ao longo das exposições, nem mesmo no dia em que a co-habitante foi inserida (Dia 3) (Fig. 18C). Entretanto, as fêmeas tratadas com VCD apresentaram um aumento significativo da latência para visitar a co-habitante no dia 4, após a exposição a mesma no dia 3 (Fig. 18D).

As figuras 18E e F mostram os resultados da exposição de fêmeas controle e tratadas com VCD, respectivamente, ao ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa após a injeção do ansiolítico Midazolam. Nas fêmeas controles, a injeção do ansiolítico em conjunto com a introdução da co-habitante de caixa, não alterou a latência para investigar a co-habitante. Já nas fêmeas VCD o ansiolítico foi capaz de reverter a resposta de aumento da latência encontrada após a exposição à co-habitante, pois estes animais deixaram de apresentar o

aumento da latência no dia 4, após a exposição e injeção de ansiolítico (Fig. 18F). Quando as ratas controle foram comparadas às tratadas com VCD em cada dia experimental com exposição à co-habitante mas sem a administração do ansiolítico, observa-se que no dia 4, após a exposição à co-habitante, as ratas tratadas com VCD apresentaram latência significativamente maior comparadas às controles (Fig. 19A). A fig. 19 B mostra que após a administração do ansiolítico as fêmeas VCD passam a apresentar latência similar às controles.

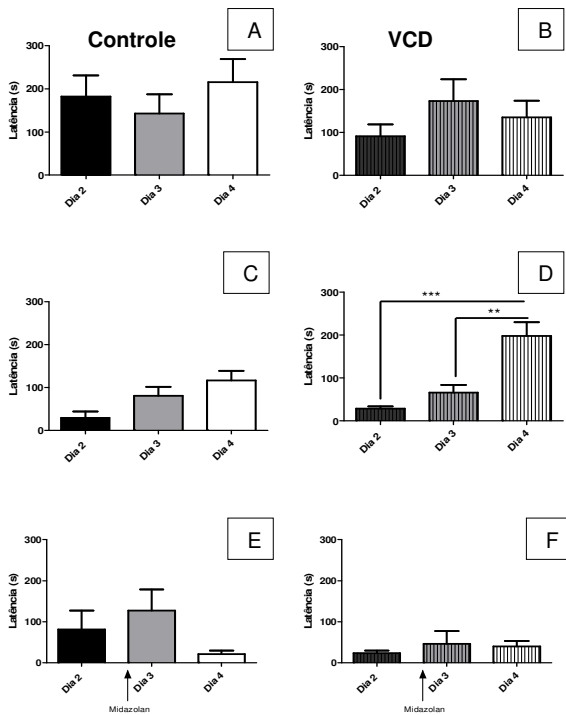


Figura 18: Latência do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar em ratas tratadas com óleo de milho - controles (A, C e E) ou VCD (B, D e F). Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar, sem (A e B) com a presença da co-habitante (C e D), com injeção de Midazolam (E e F); Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste de Friedman, pós-teste de Dunn.

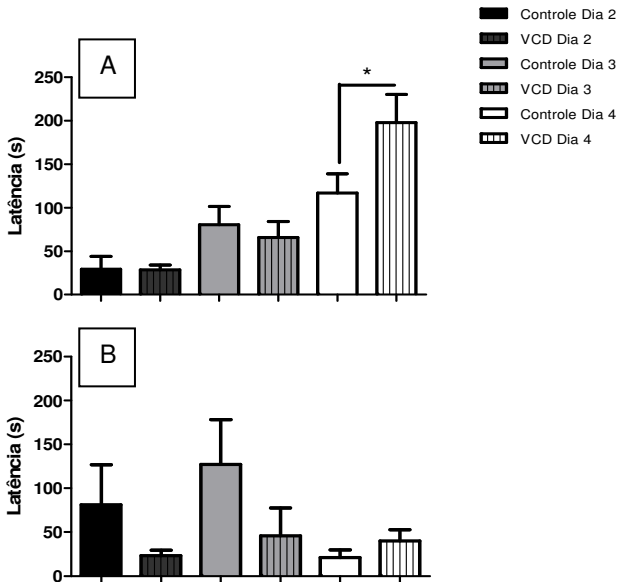


Figura 19: Comparação da latência do comportamento de investigar a janela da co-habitante em ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. (A) Sem administração do ansiolítico no Dia 3 e (B) Com administração do ansiolítico no Dia 3. Dados expressos em média \pm erro padrão; * $p < 0,05$; Teste Mann-Whitney.

3.8 DURAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LOCOMOÇÃO POR TODOS OS QUADRANTES (Q1 À Q4) DO AMBIENTE NÃO FAMILIAR

A caixa de ambiente não familiar foi dividida em 4 quadrantes, de Q1 à Q4. Os resultados dos experimentos em que foi injetado ansiolítico no Dia 3 mostraram que não houve diferença significativa na duração da atividade locomotora entre os quadrantes nas ratas controle e nem nas tratadas com VCD, demonstrando que não houve preferência de nenhum dos grupos experimentais por um determinado quadrante (Fig. 20 A, B, C e D). Os resultados dos experimentos sem o ansiolítico também não

mostraram diferenças na duração da locomoção entre os quadrantes nas ratas controles ou nas tratadas com VCD (resultados não-mostrados).

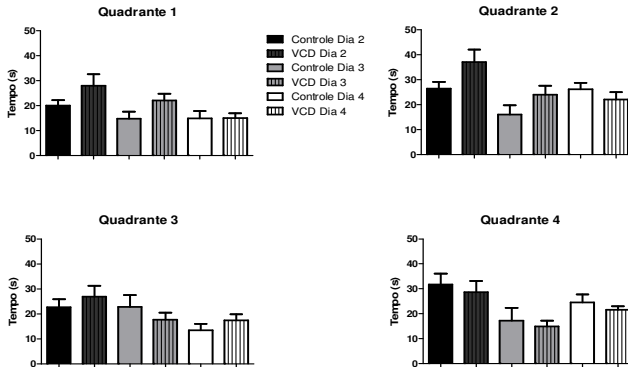


Figura 20: Comparação da duração do comportamento de locomoção nos 4 quadrantes da caixa de ambiente não familiar entre ratas tratadas com óleo de milho - controles e ratas tratadas com VCD nos diferentes dias de experimento. Dia 2: primeira exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante; ; Dia 3: primeira re-exposição ao ambiente não familiar com a presença da co-habitante e injeção de Midazolam; Dia 4: segunda re-exposição ao ambiente não familiar, sem a presença da co-habitante. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste Mann-Whitney.

3.9 TESTE DE MEMÓRIA – RECONHECIMENTO DE OBJETOS (80 E 150 DIAS APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO COM VCD).

A figura 21 mostra os resultados do Índice de Reconhecimento (IR) durante a exposição de ratas controle e tratadas com VCD ao Teste de Memória – Reconhecimento de Objetos, quando as mesmas encontravam-se com 80 ou 150 dias após o início do tratamento com VCD ou com óleo de milho (controles). Os resultados demonstraram que as ratas tratadas com VCD apresentaram maior IR do objeto familiar (plástico) aos 80 dias se comparadas às controles (Fig. 21A). Por outro lado, as ratas controles apresentaram IR semelhante às VCD no que se refere ao objeto novo (porcelana) (Fig. 21A). Pode-se observar assim que as ratas controle apresentaram um IR significativamente mais baixo do objeto familiar em comparação com o objeto novo, o que não ocorre com as fêmeas tratadas com VCD, que apresentaram IRs semelhantes para ambos os objetos (Fig. 21A).

Após 150 dias do início do tratamento com VCD ou com veículo (controles), as ratas controle apresentaram IRs semelhantes para os objetos familiar e novo (Fig. 21B). Além disso, aos 150 dias não encontraram-se diferenças significativas entre os IRs de ratas controle comparadas às tratadas com VCD, não só em relação ao objeto familiar, mas também em relação ao objeto novo (Fig. 21B).

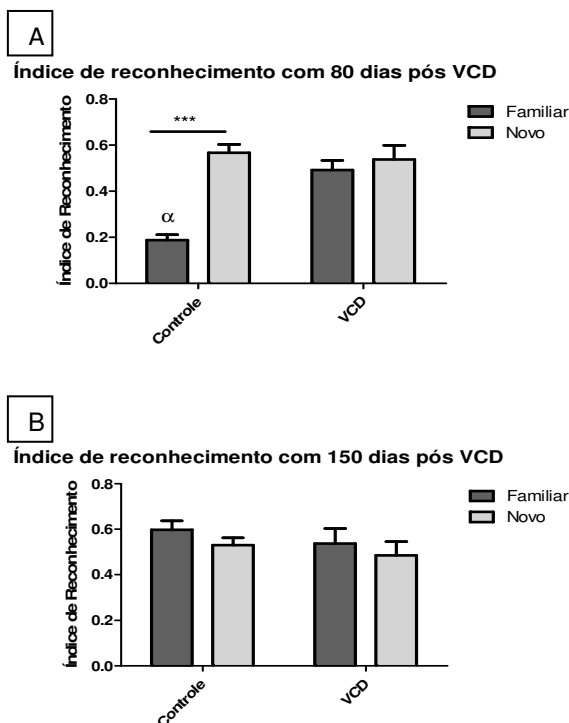


Figura 21: Teste de memória – Reconhecimento de Objetos. A figura demonstra o IR (Índice de Reconhecimento) das ratas tratadas com VCD e controles 80 dias após o início do tratamento (Fig. 23 A), onde as ratas controle apresentam um IR menor para o objeto antigo, se comparado às VCD; e 150 dias após o início do tratamento (Fig. 2 B), quando as ratas controle parecem recuperar o IR do objeto antigo, e as VCD não apresentam alterações. Dados expressos em média \pm erro padrão; Two Way Anova, *** $p < 0,001$, $^{\alpha}$ controle 80 dias x VCD 80 dias, $p < 0,005$.

3.10 TESTE EM CAMPO ABERTO 80 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO

A figura 22 mostra os resultados da exposição de ratas controle e tratadas com VCD ao teste de campo aberto, quando as mesmas encontravam-se com 80 dias após o tratamento com VCD ou com veículo (controles). Os resultados mostraram que as ratas tratadas com VCD e as tratadas com óleo apresentam comportamentos semelhantes durante o teste, no que se refere ao tempo gasto no centro da caixa (Fig. 22A), tempo em passagem pelo centro da caixa (Fig. 22B) e frequência de passagens pelo centro da caixa (Fig. 22C). A duração (Fig. 22D) e frequência (Fig. 22E) de comportamentos de manutenção como a auto-limpeza durante o teste de campo aberto não foram significativamente diferentes entre ratas controle e tratadas com VCD. Com relação aos comportamentos de exploração do campo aberto, as fêmeas tratadas com VCD não foram significativamente diferentes das controles no que se refere à latência para movimentação, duração da movimentação ou duração e frequência de “esquadrinhar” (Fig. 22F, G, H e I, respectivamente).

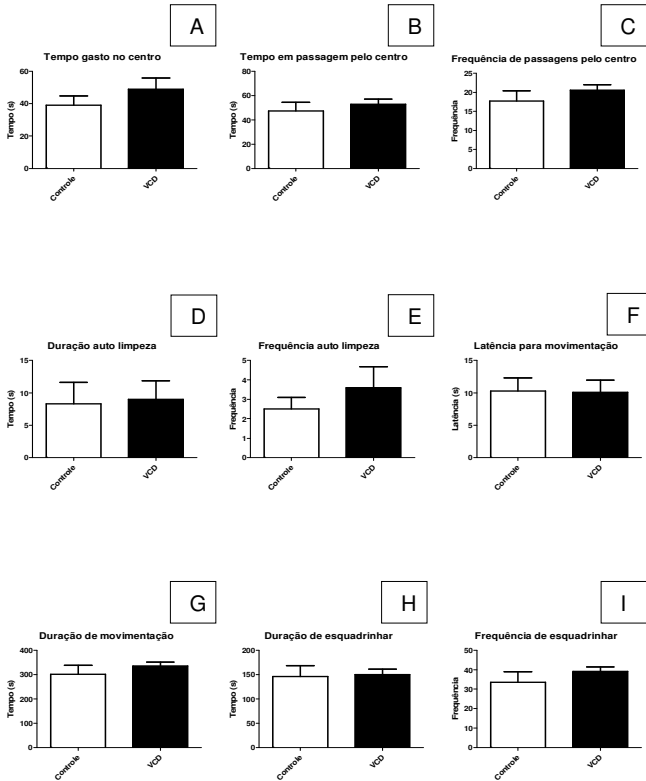


Figura 22: Perfil comportamental em teste de campo aberto, realizado com ratas no período da perimenopausa (80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo). No gráfico A comparação entre o tempo (s) gasto no centro da caixa de open Field entre ratas controle e VCD. Em B, tempo de passagem pelo centro da caixa de open field e em C a frequência (número de eventos) de passagens pelo centro da caixa. No gráfico D representação da duração em (s) da auto limpeza e em E frequência da auto limpeza. Já em F a latência em (s) para a movimentação e em G a duração da movimentação; em H duração do movimento de esquadrinhar e em I a frequência de esquadrinhar. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa nos parâmetros avaliados. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste estatístico Mann-Whitney.

3.11 TESTE EM CAMPO ABERTO 150 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO

A figura 23 mostra os resultados da exposição de ratas controles e tratadas com VCD ao teste de campo aberto, quando as mesmas encontravam-se com 150 dias após o tratamento com VCD ou com veículo (controles). Os resultados demonstraram que as ratas tratadas com VCD e as tratadas com óleo apresentaram comportamentos semelhantes durante o teste no que se refere ao tempo gasto no centro da caixa (Fig. 23A), tempo em passagem pelo centro da caixa (Fig. 23B) e frequência de passagens pelo centro da caixa Field (Fig. 23C). A duração (Fig. 23D) e frequência (Fig. 23E) de comportamentos de manutenção como a auto-limpeza durante o teste de campo aberto não foram significativamente diferentes entre ratas controle e tratadas com VCD. Com relação aos comportamentos de exploração do campo aberto, as fêmeas tratadas com VCD apresentaram maior latência para o início da movimentação se comparadas às controles (Fig. 23F), porém, não foram significativamente diferentes nos itens duração da movimentação ou duração e frequência de “esquadrinhar” (Fig. 23 G, H e I, respectivamente).

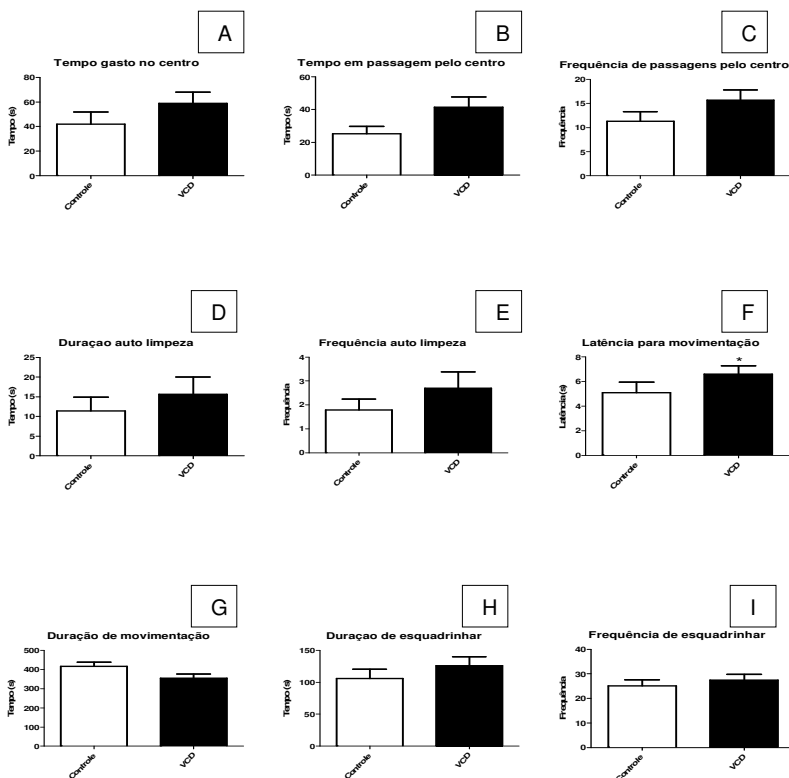


Figura 23: Perfil comportamental em teste de campo aberto, realizado com ratas no período da menopausa (150 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo). No gráfico A comparação entre o tempo (s) gasto no centro da caixa de open field entre ratas controle e VCD. Em B, tempo de passagem pelo centro da caixa de open field e em C a frequência (número de eventos) de passagens pelo centro da caixa. No gráfico D representação da duração em (s) da auto limpeza e em E frequência da auto limpeza. Já em F a latência em (s) para a movimentação, que demonstra diferença significativa. Em G a duração da movimentação; em H duração do movimento de esquadrinhar e em I a frequência de esquadrinhar. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa nos parâmetros avaliados. Dados expressos em média \pm erro padrão; Teste estatístico Mann-Whitney.

4 DISCUSSÃO

4.1 PERIMENOPAUSA *versus* INIBIÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTO EM AMBIENTE DESCONHECIDO

Nossos resultados mostraram que as fêmeas tratadas com VCD comportaram-se de modo similar às ratas controle no que diz respeito à inibição da ingestão de alimento palatável em ambiente não familiar. É importante ressaltar que todos os animais utilizados no presente estudo foram também utilizados em um estudo subsequente. Desta forma, não foi possível coletar dados fisiológicos para dosagens hormonais ou para analisar a morfologia ovariana, comprovando os efeitos ovotóxicos do VCD. Entretanto, no estudo subsequente estes animais foram eutanasiados com aproximadamente 215 dias de vida. Nesta fase, apresentaram uma perda significativa de tecido ovariano em comparação com os animais controle (CTL 79 mg \pm 7,5; VCD 61 mg \pm 2,5; - *dados não-publicados de Francielle Battiston*). Assim, embora não tenhamos ainda os dados morfométricos dos ovários, a perda de tecido ovariano confirma o efeito ováriotóxico do VCD, mesmo que a longo prazo em comparação com nosso período de análise (80 dias após o tratamento), nos permitindo sugerir que o VCD foi eficaz na perda de função ovariana e portanto, na instalação de menopausa precoce em nosso estudo. Além disso, estudos prévios já têm demonstrado o efeito do VCD causando perda significativa de folículos em ratas (FLAWS *et al.*, 1994; SPRINGER *et al.*, 1996; MAYER *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2014).

O presente estudo mostrou que tanto as ratas tratadas com VCD quanto as ratas controles apresentaram inibição do comportamento ingestivo em ambiente não familiar. A exposição ao ambiente não familiar foi repetida por mais 2 dias subsequentes, no entanto, tanto fêmeas controles quanto tratadas com VCD deixaram de apresentar a inibição da ingestão do alimento palatável, indicando que o ambiente pode ter passado a ser familiar aos animais. Este dado não corrobora os dados de MERALI *et al.* (2003) que demonstraram que camundongos mantêm a inibição da ingestão alimentar ao longo das re-exposições. Esta diferença pode estar relacionada às diferenças sexuais na reatividade dos animais aos testes comportamentais. Os mecanismos biológicos que contribuem para estas diferenças sexuais permanecem pouco conhecidos, mas acredita-se que estejam relacionados às ações dos esteroides sexuais nos sistemas neurais de regulação do eixo hipotálamo-hipofisário (ALTEMUS, 2006).

Os estudos de ingestão alimentar que submetem os animais a condições de restrição ao alimento induzem um estado metabólico negativo que pode afetar outros sistemas neuroendócrinos, principalmente relacionados ao estresse. Por outro lado, alimentos altamente palatáveis também são capazes de induzir os comportamentos antecipatórios da ingestão alimentar em ratos não privados de alimento (MISTLBERGER & RUSAK, 1987). Neste contexto de ingestão alimentar, um ambiente desconhecido ou não familiar pode ser considerado uma ameaça potencial e motivar diversos mecanismos adaptativos, entre eles a inibição da ingestão alimentar (MERALI *et al.*, 2003). Este efeito é revertido pela administração de ansiolíticos REX *et al.*, (1996), MERALI *et al.* (2003), ou seja, a inibição da ingestão pode ser considerada um parâmetro para se medir o comportamento ansioso. Neste sentido, os resultados mostraram que as ratas tratadas com VCD não apresentam maior grau de ansiedade comparadas às controles. Este resultado não era esperado, já que dados recentes mostram que 80 dias após tratamento com VCD ratas apresentam maiores índices de ansiedade quando expostas ao labirinto em cruz elevado (REIS *et al.*, 2014). Uma possível explicação para esta divergência de resultados é que no trabalho de REIS e cols, as ratas que apresentaram aumento do comportamento ansioso encontravam-se em diestro, enquanto aquelas em proestro não foram diferentes das controles. No presente estudo, devido ao protocolo experimental de vários dias subsequentes, não foi possível separar os animais por fases do ciclo estral. Assim, a combinação de animais em diferentes fases do ciclo poderia ter mascarado o resultado de aumento dos níveis de ansiedade anteriormente encontrado por (REIS *et al.*, 2014). Outra justificativa para esta diferença de resultados é que foram utilizados 2 testes comportamentais distintos para se medir ansiedade. O labirinto em cruz elevado pode exercer uma força ambiental mais aversiva do que o ambiente não familiar utilizado no presente estudo, pois além de também ser um ambiente desconhecido, é elevado e apresenta os braços abertos, situações que expõem o animal à situação de perigo. Desta forma, o teste do labirinto poderia facilitar o aparecimento de diferenças significativas dos níveis de ansiedade que não foram possíveis de se identificar somente com o teste em ambiente não familiar.

STETTER e COLS demonstraram em 1995 que o estímulo social, como por exemplo a presença de um co-específico familiar, pode influenciar nas preferências alimentares de roedores. Com o objetivo de avaliar se um estímulo social poderia interferir ou modificar a resposta de inibição da ingestão alimentar neste teste comportamental, as ratas

foram testadas em ambiente não familiar na presença de uma co-habitante de caixa, ou seja, de um co-específico familiar. Os resultados demonstraram que a presença de uma fêmea co-específica levou à manutenção da inibição da ingestão do alimento palatável no ambiente não familiar, tanto em ratas controle quanto tratadas com VCD. Dados da literatura descrevem que a presença de co-específicos familiares é eficaz na atenuação de respostas de medo condicionado em ratos machos (INSANA & WILSON, 2008; KIYOKAWA *et al.*, 2014). Como ratos são altamente sociais, nossa hipótese era que a presença da co-habitante pudesse diminuir a inibição da ingestão alimentar em ambiente não familiar. Contrariamente, nossos animais apresentaram uma manutenção da inibição da ingestão nesta situação. Uma das possíveis explicações para este fenômeno seria um aumento na frequência ou duração do comportamento de investigar a fêmea co-específica, ou seja, os animais gastariam mais tempo com a investigação e poderiam demorar mais para iniciar a ingestão do alimento. No entanto, nossos dados não demonstraram aumento da frequência e duração da investigação da co-específica, sugerindo que a presença da mesma foi a principal causa para a inibição da ingestão do alimento.

Era esperado que o uso de um ansiolítico diminuísse o efeito ansiogênico do ambiente não-familiar durante as re-exposições, reduzindo assim a latência para a ingestão do alimento palatável. No entanto, fêmeas estudadas no presente trabalho apresentaram apenas uma reversão parcial da inibição. Este conjunto de resultados sugere que fêmeas apresentem a inibição da ingestão no ambiente não familiar, mas se adaptam logo na primeira re-exposição, somente se não houver outro estímulo presente neste ambiente. A partir do momento em que um novo estímulo é introduzido, neste caso o estímulo social (fêmea co-específica), a inibição da ingestão volta a ocorrer e se mantém mesmo nas re-exposições, sugerindo que o ambiente desconhecido volta a ter um efeito ansiogênico para os animais. Este efeito ansiogênico é parcialmente bloqueado pelo uso de ansiolítico, e a falha ovariana precoce parece não ter efeito significativo nesta resposta.

A eficiência do ambiente não familiar em inibir a resposta ingestiva foi evidente tanto em ratas controle quanto em VCD, assim como já descrito para ratos (MERALI, *et al.*, 2003). Embora seja bem conhecido que a grande maioria das substâncias que controlam a ingestão alimentar, tais como colecistocinina, grelina e insulina, sejam sensíveis aos níveis de esteróides ovarianos e mediem a ação anorexígena do E (ASARIAN & GEARY, 2006), pode-se inferir que as alterações advindas das flutuações hormonais que ocorrem na

perimenopausa, como redução dos níveis de P e de andrógenos (REIS *et al.*, 2014) parecem não afetar a resposta a este tipo de paradigma comportamental de ingestão de alimento palatável em ambiente não-familiar.

O teste do nado forçado é uma ferramenta amplamente utilizada para se medir o comportamento depressivo (para revisão ver YAN *et al.*, 2010). Neste teste, o início e a duração do comportamento de imobilização são utilizados como medidas de comportamentos do “tipo-depressivo” (GOUVEIA Jr *et al.*, 2008), os quais são reduzidos pela administração de drogas antidepressivas (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978). No presente estudo nós utilizamos o comportamento de imobilização como uma inferência para alterações comportamentais que poderiam ser ligadas a comportamentos de ansiedade/depressão. Há evidências de que a duração da imobilização possa ser utilizada como um índice de efeitos afetivos enquanto a latência para o primeiro episódio de imobilização é um parâmetro que mede efeitos do contexto emocional sobre o aprendizado e a memória (West, 1990). Nossos resultados mostraram que a duração do comportamento de imobilização não foi alterada em ratas VCD ou controle quando expostas pela primeira vez ao ambiente não-familiar, ou quando re-expostas uma ou duas vezes. A presença de um co-específico também não teve efeitos significativos sobre a duração da imobilização em fêmeas controles ou tratadas com VCD. Como este parâmetro não foi alterado nos grupos estudados, a administração do ansiolítico não apresentou efeito significativo no parâmetro estudado, como seria esperado. Pode-se inferir assim que o ambiente não familiar não gerou efeitos afetivos negativos nas fêmeas, mesmo naquelas tratadas com VCD, pelo menos no contexto estudado no presente trabalho. Entretanto, existe uma vasta literatura demonstrando que mulheres em perimenopausa e menopausa são mais vulneráveis aos transtornos de depressão e ansiedade, principalmente devido à variações dos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais femininos [para revisão ver: (WARREN, 2007; SOLOMON and HERMAN, 2009).

Quando comparamos ratas tratadas com VCD *versus* controles, observou-se que as VCD foram mais sensíveis ao ansiolítico, já que apresentaram menos tempo de imobilização na presença da co-habitante após administração da droga. Dados da literatura mostram que a progesterona, e principalmente seu metabólito alopregnenolona, aumenta a sensibilidade às drogas antidepressivas CARRIER & KABBAJ, (2013) e ansiolíticas (McAULEY *et al.*, (1995) em mulheres pós-menopausadas. O E também aumenta a sensibilidade aos ansiolíticos em modelos experimentais (CALZA *et al.*, 2010). Sabe-se

que as fêmeas VCD no período equivalente à perimenopausa (80 dias após tratamento) apresentam níveis significativamente mais baixos de P, mas não de E (REIS et al., 2014). Pode-se sugerir então que o desequilíbrio entre os níveis de E e P nas fêmeas tratadas com VCD possa ter levado a esta maior sensibilidade ao ansiolítico.

Já a latência para imobilização não foi alterada em ratas controle ou VCD em nenhuma das situações experimentais: ambiente não familiar com ou sem co-específico ou com/sem administração de ansiolítico. Como de acordo com West (1990) a latência para o primeiro episódio de imobilização é um parâmetro que mede efeitos do contexto emocional sobre o aprendizado e a memória, nosso resultado sugere que nem as diferentes situações experimentais ou o tratamento com VCD alteraram o contexto emocional dos animais, não interferindo portanto na resposta comportamental de imobilização.

Quando analisamos a frequência de imobilização sem a inserção da fêmea co-específica, observamos uma diferença significativa entre fêmeas controle e tratadas com VCD. Entretanto, os dados e gráficos de ambos os grupos são similares. Fica claro que a dispersão dos dados no grupo tratado com VCD impediu que o teste atingisse o nível de significância e, portanto, é importante termos prudência na discussão deste dado, no sentido deste ter ou não uma relevância biológica. Além disso, a comparação entre fêmeas controle e tratadas com VCD não demonstrou nenhuma diferença significativa com relação à frequência de imobilização.

Nossos dados mostraram que durante a re-exposição das ratas ao ambiente não familiar um dia após a exposição à fêmea co-específica, aquelas tratadas com VCD apresentaram aumento significativo na frequência de imobilização. Pode-se inferir que a presença de um co-específico tenha exercido um efeito aversivo sobre as ratas tratadas com VCD, o que não ocorreu com as ratas controle. Este efeito aversivo poderia ter levado as ratas a apresentarem maior frequência de imobilização. Os resultados da administração com ansiolítico corroboram esta inferência, já que após a sua administração, as fêmeas tratadas com VCD deixaram de apresentar este aumento na frequência de imobilidade. O efeito aversivo da fêmea co-específica sobre as fêmeas tratadas com VCD foi encontrado também quando analisamos a latência para investigação do local em que a co-habitante era colocada durante o teste comportamental. Na ausência da co-habitante, tanto ratas controle quanto tratadas com VCD mantiveram níveis similares de latência para investigação do local. No entanto, no dia seguinte à inserção da co-habitante na caixa experimental, as fêmeas controle

mantiveram a mesma resposta enquanto as tratadas com VCD apresentaram aumento significativo da latência para investigar o local onde a co-específica foi inserida. Corroborando o efeito aversivo, a administração do ansiolítico reverteu esta resposta das fêmeas tratadas com VCD. Não há dados na literatura que apontem uma maior sensibilidade a estímulos aversivos em mulheres menopausadas. Entretanto, sabe-se que a transição menopausal tem efeitos importantes sobre a qualidade de vida da mulher, incluindo as questões de adaptabilidade a mudanças no contexto social (ROBAK-CHOŁUBEK *et al.*, 2014). No contexto da resposta aversiva, sabe-se que o estrógeno pode aumentar, de maneira dose-dependente, a resposta comportamental aversiva, mas os dados da literatura são, em sua maioria, relacionados à aversão a sabores (MIELE *et al.*, 1988). A resposta aversiva no contexto do estímulo social (co-específico familiar) é pouco discutida na literatura, mas podemos inferir que as respostas de aumento da frequência de imobilização e latência para investigação nas ratas VCD após exposição ao co-específico possa ser resultado de um complexo conjunto de fatores relacionados à memória e aprendizado associativo, em conjunto com influência das flutuações hormonais da perimenopausa sobre os mecanismos que regulam estes fatores.

A análise da atividade locomotora geral foi realizada por meio da duração da locomoção nos quatro quadrantes da caixa experimental. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre fêmeas controles e VCD, indicando que não houve preferência por nenhuma área da caixa experimental. Este dado é importante, pois o tempo gasto pelos animais em regiões de preferência poderia influenciar no tempo gasto para a ingestão do alimento palatável ou de investigação do estímulo social, interferindo assim na acuidade dos resultados encontrados.

4.2 TESTE DE MEMÓRIA – RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Estudos clínicos têm demonstrado que mulheres exibem um declínio cognitivo após a menopausa e isso tem um impacto negativo no desempenho global de suas funções cognitivas (PHILLIPS & SHERWIN 1992; SHERWIN 1988). No entanto, no presente estudo, as ratas tratadas com VCD apresentaram um IR maior para os objetos familiares, em comparação com as ratas controle.

Trabalhos anteriores mostram que animais intactos, ou seja, sem lesão cerebral, apresentam preferência pelo objeto novo (pela novidade,

que no presente estudo corresponde ao objeto alterado) durante a primeira metade do teste simples de reconhecimento de objeto, mas após a exploração inicial este objeto novo se torna familiar e o IR destes animais declina (DIX & AGGLENTON 1999 e MOSES *et al.*, 2005). Isto poderia explicar o baixo IR encontrado nas fêmeas controle aos 80 dias. Neste sentido, poderíamos inferir que as fêmeas tratadas com VCD não foram capazes de apresentar esta “habituação” ao objeto alterado, o que poderia estar relacionado com um déficit cognitivo em comparação com as fêmeas controle. No entanto, se considerarmos os resultados do presente estudo que mostraram que as fêmeas tratadas com VCD apresentam uma resposta aversiva à co-habitante no dia seguinte à exposição, parece improvável que estas ratas apresentem um déficit de memória de curto-prazo. Devemos considerar ainda que existem diferentes tipos de memória e que no presente estudo estamos avaliando não só a memória de reconhecimento em curtos intervalos de retenção, ou seja, a memória de curto-prazo, mas também a memória episódica, ou seja, aquela que associa o objeto ao local, ou ao contexto. A consolidação da memória é um processo organizado pelo hipocampo e durante este teste, quando a memória é recuperada, este processo é chamado reconsolidação da memória, o que envolve uma reorganização de memórias já formadas e incorporação de novas informações (CLARKE *et al.*, 2010). Parte deste processamento parece ser realizado no cortex perirrinal, tanto em humanos BUFFALO *et al.* (1998) quanto em roedores (BAXTER 2010). Tem sido demonstrado que as lesões do hipocampo em ratos podem prejudicar tanto a aprendizagem espacial (GILBERT, P.E.; KESNER, R.P, 2006) quanto a memória de reconhecimento (LI, J.S.; CHAO, Y.S, 2008). Apesar de testes de reconhecimento serem amplamente utilizados para se estudar memória, nem todos os contextos destes testes recaem sobre os mesmos sistemas neurais (para revisão ver ROBERTSON *et al.*, 2014). Por exemplo, sabe-se que a memória de uma tarefa é dependente de mecanismos hipocampais enquanto o contexto da informação é processado no córtex pós-rinal (EACOTT & GAFFAN, 2005).

Outro fator a ser discutido com relação à diferença no IR das ratas VCD comparadas às controles é a ação dos esteróides ovarianos sobre os mecanismos de processamento de memória, mas os dados na literatura são controversos. Existem diversas evidências dos efeitos facilitatórios dos esteróides gonadais influenciando positivamente na discriminação de objetos em fêmeas (LUINE *et al.*, 2003; FRY *et al.*, 2004; WALLACE *et al.* 2006). As fêmeas tratadas com VCD (80 dias após tratamento) apresentam níveis circulantes de progesterona,

testosterona e DHT menores do que as fêmeas controle (Reis et al, 2014), o que poderia explicar a ausência de habituação ao objeto alterado. A queda dos andrógenos pode ser mais importante do que a dos esteróides femininos, pois em ratos machos castrados e com déficits de reconhecimento de objetos há uma melhora de desempenho nestes testes após reposição hormonal de testosterona, mas não de E (AUBELE *et al.*, 2008). Contudo, fêmeas intactas apresentam desempenho melhor em testes de reconhecimento de objeto comparadas a machos intactos (GHI *et al.*, 1999; SUTCLIFFE e cols, 2007). Um estudo recente com mulheres menopausadas sem reposição hormonal encontrou uma tendência de associação ($p=0,08$) entre a melhora na memória episódica verbal e baixos níveis circulantes de testosterona livre (RYAN *et al.*, 2012). Corroborando esta idéia de efeitos negativos dos esteróides sexuais sobre a memória, ACOSTA *et al.*, 2010 mostraram que a reposição com E prejudica a cognição em ratas VCD. Por outro lado, o trabalho de SUTCLIFFE e cols. (2007) sugere que as fases do ciclo estral não influenciam o desempenho de ratas durante o teste de reconhecimento de objetos. Apesar da controvérsia, este conjunto de dados indicam que os esteróides sexuais fazem parte de uma rede complexa de regulação da aquisição e retenção de memória.

É evidente que devemos ser prudentes nas comparações entre mulheres menopausadas e o modelo de VCD utilizado neste estudo. Mas nossos resultados, em conjunto com os dados da literatura, parecem indicar que os esteróides gonadais masculinos e femininos exercem efeitos diversos sobre as áreas cerebrais interligadas, responsáveis pelos diferentes processamentos da memória. Portanto, durante a perimenopausa e menopausa, quando as flutuações hormonais são pronunciadas, podemos sugerir que o resultado deste desequilíbrio entre estrógeno, progesterona e andrógenos poderá ou não acarretar déficits cognitivos, dependendo das razões entre os hormônios citados e de suas respectivas ações nas diversas áreas envolvidas. Além disso, os efeitos cognitivos destes hormônios, ou a ausência de efeitos, podem ser dependentes da tarefa ou do teste avaliado, e a aplicação de diferentes testes poderia gerar variações significativas de resultados, podendo-se observar eficiência ou déficit cognitivo. Um levantamento clínico recente mostrou que são muitos os parâmetros que governam a ação dos hormônios gonadais e seus derivados sobre a cognição: tipo de hormônio, níveis circulantes, terapia de reposição, tipo de perda ovariana, se transitória ou por ovariectomia, tipo de memória analisada e histórico da menopausa (ACOSTA *et al.*, 2013). Ainda, não podemos descartar a hipótese de que em ratas jovens (aproximadamente 3 meses),

os efeitos da falha ovariana gradual possam não ser os mesmos encontrados em ratas de idade mais avançada, já que o fator envelhecimento é fundamental neste contexto. Já foi demonstrado, por exemplo, que alterações de curto-prazo nos níveis de estrógeno e progesterona não afetam significativamente a cognição de mulheres jovens (SCHIMIDT *et al.*, 2013)

Nos testes com ratas 150 dias após o tratamento, as ratas controle apresentaram IR semelhante ao das ratas tratadas com VCD, não havendo diferenças entre os grupos tratados. Isso demonstra que com o passar do tempo, aquela possível “habituação” ao objeto alterado apresentada pelas ratas controle aos 80 dias deixa de ocorrer, e estas então passam a apresentar IR semelhante ao das ratas tratadas com VCD. Estudos demonstram que a velocidade do processamento da informação diminui durante a fase da perimenopausa natural, o que pode estar ligado não só às alterações hormonais derivadas deste período, mas também ao próprio processo natural de envelhecimento (GREENDALE, G.A *et al.*, 2009; HENDERSON, V.W, 2003). Além disso, é postulado que flutuações nos níveis de E endógeno e sintomas associados com a transição da menopausa, tais como a depressão, perturbação do sono, as ondas de calor, e a ansiedade, podem de forma independente ou não manifestá-los (GREENDALE, G.A, 2010).

Os resultados do presente trabalho poderão contribuir para o entendimento das alterações comportamentais e fisiológicas advindas da menopausa e no fortalecimento do modelo de menopausa química, que vem sendo amplamente utilizado para este fim. Entretanto, muitos estudos são ainda necessários para que se possa compreender os mecanismos neurais pelos quais os esteróides ovarianos, e suas flutuações na menopausa, regulam o estado afetivo e a cognição.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo nos permite concluir que:

I) As alterações hormonais resultantes da falha ovariana precoce causada pelo VCD após 80 dias de tratamento parecem não influenciar o grau de ansiedade de ratas quando este é avaliado pela latência de ingestão em ambiente não familiar;

II) Independentemente da condição hormonal e ovariana, fêmeas são capazes de se habituar a um ambiente não familiar já na primeira re-exposição ao mesmo. No entanto, a presença de uma fêmea co-específica leva à inibição da ingestão novamente e a falha ovariana não influencia esta resposta.

III) A presença de uma fêmea co-específica familiar parece ter efeito aversivo sobre as fêmeas tratadas com VCD, sugerindo que o desequilíbrio hormonal resultante da falha ovariana afete um conjunto complexo de fatores relacionados à memória e aprendizado associativo envolvidos com o processo de socialização.

IV) O efeito das flutuações hormonais na menopausa pode nem sempre ser deletério para a memória, sugerindo que o envelhecimento possa ser mais significativo para o déficit de memória nesta fase do que os fatores hormonais.

V) O comportamento exploratório geral de ratas tratadas com VCD é equivalente ao de ratas controle, indicando que este aspecto do repertório comportamental parece não ser prejudicado pela falha ovariana, pelo menos nos períodos aqui estudados, 80 e 150 dias após o tratamento.

6 REFERÊNCIAS

ACOSTA, J. I.; MAYER, L.; TALBOOM, J. S.; TSANG, C. W.; SMITH, C. J.; ENDERS, C. K.; BIMONTE-NELSON, H. A. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. **Endocrinology**, v.150, 2009, p. 4248-59.

ACOSTA, J. I.; MAYER, L. P.; BRADEN, B. B.; NONNENMACHER, S.; MENNENGA, S. E.; BIMONTE-NELSON, H. A. The cognitive effects of conjugated equine estrogens depend on whether menopause etiology is transitional or surgical. **Endocrinology**. 2010, 151(8):3795-804.

ACOSTA, J. I.; HIROI, R.; CAMP, B. W.; TALBOOM, J. S.; BIMONTE-NELSON, H. A. An update on the cognitive impact of clinically-used hormone therapies in the female rat: models, mazes, and mechanisms. **Brain Res**. 2013, 13;1514:18-39.

ALTEMUS M. Sex differences in depression and anxiety disorders: potential biological determinants. **Horm Behav.**, 2006 Nov;50(4):534-8.

ANARTE, M.T.O. Estudio casi- experimental y prospectivo de las modificaciones producidas por el tratamiento hormonal (T.H.S.) e psicológico (T.Ps.) em mujeres menopáusicas que acuden a la unidad de menopausia Del hospital materno infantil de Málaga, durante el año de 1993. **Tese de doutorado em Psicologia**, facultade de Granada, Granada. 1994.

ANDRADE, L.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria clínica**, 25 (6), p. 285-90, 1998.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**. v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006, 361(1471):1251-63.
Review.

AUBELE, T.; KAUFMAN, R.; MONTALMANT, F.; KRITZER, M. F. Effects of gonadectomy and hormone replacement on a spontaneous novel object recognition task in adult male rats. **Horm Behav.** 2008, 54(2):244-52.

AVIS, N. E. Womens health and midlife. IN: WILLIS SL E REID JD (Ed.). **Life in the middle: psychological and social development in middle age.** San Diego: Academic Press, 1999, p. 105-137.

BACHMANN, G. A., LEIBLUM, S. R. The impact of hormones on menopause sexuality: a literature review. **Menopause.** 2004, 11(1), p.120-130.

BACKER, F. C. Circadian rhythms, sleep and the menstrual cycle. **Sleep** (Rochester), p. 8613-8622, 2007.

BADDELEY, A. D. Human memory: theory and practice. Revised, Needham Heights, **Heights, Allyn and Bacon,** 2008.

BAGNOLI, V. R., FONSECA, A. M. Etiopatogenia do climatério. **In: Síndromes climatéricas.** Editora Atheneu, São Paulo, 1999, p. 9-14.

BAXTER, M. G. "I've seen it all before": explaining age related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al (2010), **Behav. Neuroc.,** v. 124, n. 5, 2010, p. 706-709.

BETHEA, C. L. *et al.* Effects of oral estrogen, raloxifene and arzoxifene on gene expression in serotonin neurons of macaques. **Psychoneuroendocrinology,** 27(4):431-45,2002.

BETHEA, C. L; REDDY, A. P. Effect of ovarian hormones on survival genes in laser captured serotonin neurons from macaques. **J Neurochem,** 105 (4):1129-43, 2008.

BILLIG, H.; FURUTA, I; HSUEH, A. J. W;. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. **Endocrinology** 1993, 133: 2204–2212.

BIRZNIECE, V. *et al.* Serotonin 5-HT (1A) receptor mRNA expression in dorsal hippocampus and raphe nuclei after gonadal hormone manipulation in female rats. **Neuroendocrinology**, 74(2):135-42, 2001.

BODNOFF, S. R.; SURANYI-CADOTTE, B.; AITKEN, D. H.; QUIRION, R.; MEANEY, M. J. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology** 1988, 95:298-302.

BODNOFF S. R.; SURANYI-CADOTTE, B.; QUIRION R.; MEANEY, M. J. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology** 1989, 97:277-279.

BOTTON, P. H.; COSTA, M. S.; ARDAIS, A. P.; MIORANZZA, S.; SOUZA, D. O.; DA ROCHA, J. B.; PORCIÚNCULA, L. O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behav Brain Res.** v. 214, p. 254-259, 2010.

BUFFALO, E. A.; REBER, P. J.; SQUIRE, L. R. The human perirhinal cortex and recognition memory. Hippocampus. 1998; 8(4):330-9.

BURGER, H. G. *et al.* Hormonal changes in the menopause transition. **Recent Prog. Horm. Res.** 2002, 57: 257- 275.

BRANCROFT, J.; CAWOOD, E. E. H. Androgens and the menopause: a study of 40-60- year- old women. **Clinical Endocrinology.** 1996, 45: 577-587.

CALZA, A.; SOGLIANO, C.; SANTORU, F.; MARRA, C.; ANGIONI, M. M.; MOSTALLINO, M. C.; BIGGIO, G.; CONCAS, A. Neonatal exposure to estradiol in rats influences neuroactive steroid concentrations, GABAA receptor expression, and behavioral sensitivity to anxiolytic drugs. **J Neurochem.** 2010, 113(5):1285-95.

CAMARGOS, A. F. *et al.* Ginecologia ambulatorial. Belo Horizonte, **Coopmed**, 2008.

CARRIER, N.; CABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology.** 70:27-34, 2013.

CAROLAN, M. T. Beyond deficiency: broadning the view of menopause. **Journal of Applied Gerontology**, v.13, n.2. p. 193-205, 1994.

CATÃO, L. Sintomatologia climatérica e sexualidade na mulher de meia idade. **Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal**, 2008.

CATALDO NETO, A.; GAUER, G. J. C.; FURTADO, N. R. *Psiquiatria para Estudantes de Medicina*. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2003.

COHEN, L. S. *et al.* Risk of new onset of depression during the menopausal transition. **Arquives of general psychiatry**, 63: (4), p. 385-90, 2006.

DAHLKE, R. *A doença como linguagem da alma: os sintomas como oportunidade de desenvolvimento*. São Paulo: **Cultrix**, 2000.

CLARKE, J.R.; CAMMAROTA, M.; GRUART, A.; IZQUIERDO, I.; DELGADO-GARCÍA, J.M. Plastic modifications induced by object recognition. **PNAS**. 2010, 107:2652–2657

DEECHER, D. *et al.* From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. **Psychoneuroendocrinology**, 33: (1), p. 3-17, 2008.

DEEKS, A. A. Psychological aspects of menopause management. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** 2003, 17(1):17-31.

DENNERSTEIN, L. Well-being, symptoms and menopausal transition. **Maturitas**. 1996, 23: 147-157.

DIX, S. L.; AGGLETON, J. P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of objectlocation and object-context recognition. **Behav Brain Res** 1999, 191–200.

DOWNS, J. L.; WISE, P. M. The role of the brain in female reproductive again. **Molecular and cellular endocrinology**, 299: (1), p. 32-38, 2009.

DUBAL D. B., WISE P. M. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged

female rats. **Endocrinology** 142: 43-48, 2001.

EACOTT, M. J.; GAFFAN, E. A. The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. Q J Exp Psychol B. **2005, 58(3-4):202-17.**

ENNAUCER, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. **Behav. Brain Res.**, v.31, n. 1, 1988, p.47-59.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ANGELLUCCI, M. E.; CANTERAS N. S.; Da CUNHA C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosci Methods.**, 2005; 148:78-87.

FLAWS, J. A.; DOERR, J. K.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. **Reprod Toxicol.** 1994, 8(6):509-14.

FLAWS, J. A.; SALYERS, K. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Reduced ability of rat preantral ovarian follicles to metabolize 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in vitro. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1994, 126(2):286-94.

FRANKOVICH, R. J.; LEBRUN, C. M. Menstrual cycle, contraception, and performance. **Clin. Sports Med.**, Philadelphia, vol.19, n. 2, p. 251-271, apr. 2000.

FREEMAN, E. W. *et al.* The role of anxiety and hormonal changes in menopausal hot flashes. **Menopause**, 2005, p. 258-66.

FREIXAS, A. F. El impacto de la menopausia en la vida de la mujer: reflexiones personales. **Revista Gerontol**, v.4, p. 244-249, 1992.

FRYE, C. A.; WALF, A. A.; RHODES, M. E.; HARNEY, J. P. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 15 α -reductase. **Brain Res.** 2004; 1004:116-124.

GASKIN, S.; TARDIF, M.; COLE, E.; PITERKIN, P.; KAYELLO, L.; MUMBY, D. G. Object familiarization and novel-object preference in rats. **Behav Processes.** v. 83, n.1, p. 61-71, 2010.

GIACOMINI, D. R.; MELLA, E. A. C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens, 2006.

GHI, P.; ORSETTI, M.; GAMALERO, S.R.; FERRETTI, C. Sex differences in memory performance in the object recognition test. Possible role of histamine receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 1999, 64(4):761-6.

GILBERT, P. E.; KESNER, R. P. The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working memory and pattern separation. **Behav Brain Res.,** 2006; 169:142–9.

GILL, S. *et al.* Negative feedback effects of gonadal steroids are preserved with again in postmenopausal women. **Journal of endocrinology & metabolism,** 87: (5), p. 2297-2302.a, 2009.

GILL, S. *et al.* Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. **Journal of endocrinology & metabolism,** 87: (5), p. 2290-2296.b, 2009.

GOLUB, M. S.; HAN, B.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Effects of dietary aluminum excess and manganese deficiency on neurobehavioral endpoints in adult mice. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1992, 112(1):154-60.

GOULART, B. K. *et al.* Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience,** v.167, n. 4, 2010, p. 969-973.

GOUVEIA, J. *et al.* Improving cancer control in the European Union: conclusions from the Lisbon round-table under the Portuguese EU Presidency, 2007. **Eur J Cancer.** 2008 Jul;44(10):1457-62.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. Neurobiologia das doenças mentais, São Paulo: **Lemos Editorial,** 1997.

GREENDALE, G. A.; HUANG, M. H.; WIGHT, R. G., et al. Effects of the menopause transition and hormone use on cognitive performance in midlife women. **Neurology**. 2009; 72:1850-1857.

GREENDALE, G. A.; WIGHT, R. G.; HUANG, M. H. et al. Menopause-associated symptoms and cognitive performance: results from the Study of Women's Health Across the Nation. **Am J Epidemiol**. 2010; 171:1214-1224.

HALL, J. E. *et al.* Decrease in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency with age in the postmenopausal women. **Journal of endocrinology & metabolism**, 85: (5), 1794- 1800, 2009.

HALBREICH, U. *et al.* Gonadal hormones, sex and behavior. **Psychopharmacol Bull**, 26(3):297-301, 1990.

HALBREICH, U. *et al.* Estrogen augments serotonergic activity in postmenopausal women. **Biol Psychiatry**, 37(7):434-41, 1995.

HALBREICH U. Gonadal hormones, reproductive age, and women with depression. Arch Gen Psychiatry. **2000, 57(12):1163-4.**

HENDERSON, V. W.; GUTHRIE, J. R.; DUDLEY, E. C. et al. Estrogen exposures and memory at midlife: a population-based study of women. **Neurology**, 2003;60:1369-1371.

HOYER, P. B.; SIPES, I. G. Development of an Animal Model for Ovotoxicity Using 4-Vinylcyclohexene: A Case Study. **Birth Defects Research** 2007, (Part B) 80: 113–125.

INSANA, S. P.; WILSON, J. H. Social buffering in rats: prolactin attenuation of active interaction. **Psychol Rep**. 2008, 103(1):77-87.

IZQUIERDO, I. Memória. **Ed. Artmed**. Porto Alegre, RS, 2002.

JUANG, K. D. *et al.* Hot flashes are associated with psychological symptoms of anxiety and depression in peri and post but not premenopausal women. **Maturitas**, 25:119-26, 2005.

KAPLAN, H. L. *et al.* Compêndio de psiquiatria. Porto Alegre, **Artes Médicas**, 1997.

KIYOKAWA, Y. *et al.* A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. **Behav. Brain Res.** 1:267, 189-193, 2014.

KLINK, R. *et al.* Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: effects of gender and pregnancy. **Neuropharmacology** 43(7):1119-28, 2002.

KLINK, R.; ROBICHAUD, M.; DEBONNEL, G. Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part II. Regulatory mechanisms. **Neuropharmacology**, 43(7):1129-38, 2002.

KOSS, M. V. Rubra força: fluxos do poder feminino. São Paulo: **Escrituras Editora**, 2001.

KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem.* **2009**, **91(1):32-40.**

LI, J. S.; CHAO, Y. S. Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. **Neurobiol Learn Mem.**, 2008, 89:192–8.

LIMA, F. B.; BETHEA, C. L. Ovarian steroids decrease DNA fragmentation in the serotonin neurons of non-injured rhesus macaques. **Mol Psychiatry**, 15(6):657-68, 2010.

LUINE, V. N.; JACOME, L. F.; MACLUSKY, N. J. Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. **Endocrinology**. 2003; 144:2836–2844.

MATTHEWS, J. D.; FAVA, M. Risk of suicidality in depression with serotonergic antidepressants. **Ann Clin Psychiatry**. 2000; 12(1):43-50. Review.

MAYER, L. P.; KROEGER, N.; CHRISTIAN, P. J.; MARION, S. L.; HOYER, P. B. Long-term effects of ovotoxicity in rats exposed to 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Biol Reprod** 2001, 64(Suppl 1):192.

MAYER, L. P.; PEARSALL, N. A.; CHRISTIAN, P. J.; DEVINE, P. J.; PAYNE, C. M.; MCCUSKEY, M. K.; MARION, S.L.; SIPES, I.G.;

HOYER, P.B. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reprod Toxicol.** 2002; 16(6):775-81.
MAYER, L. P.; DEVINE, P. J.; DYER, C. A.; HOYER, P. B. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen .Biol Reprod. 2004, 71(1):130-8.

McAULEY, J. W. *et al.* Orally administered progesterone enhances sensitivity to triazolam in postmenopausal women. **J Clin Psychopharmacol.** 1995, 15(1):3-11.

McKINLAY, S. M. The normal menopause transition: an overview. Maturitas. 1996, 23(2):137-45.

MERALI, Z.; LEVAC, C.; ANISMAN, H. Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. **Biological Psychiatry** 2003, 54: 552-565.

MIELE, J.; ROSELLINI, R.; SVARE, B. Estradiol benzoate can function as an unconditioned stimulus in a conditioned taste aversion paradigm. **Horm Behav.** 1988, 22(1):116-30

MISTLBERGER R.; RUSAK B. Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: dependence on meal size and nutrient content. **Physiol Behav.** 1987, 41(3):219-26.

MITCHELL, J. B.; LAIACONA, J. The medial frontal cortex and temporal memory: tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. **Behav Brain Res,** 1998; 97:107–13.

MOORE, B. E.; FINE, B. D. Dicionário de termos e conceitos psicanalíticos. **Artes Médicas,** Porto Alegre, 1992.

MOSES, S. N. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. **Brain Res Bull** 2005, 67:62–76.

MUMBY, D. G.; GLENN, M. J.; NESBITT, C.; KYRIAZIS, D. A. Dissociation in retrograde memory for object discriminations and object recognition in rats with perirhinal cortex damage. **Behav Brain Res.** v. 132, p. 215–226, 2002.

NAMS. Menopause practice: a clinicians guide. **USA: NAMS,** 2004.

OVERLIE, I.; MØRKRID, L.; ANDERSSON, A. M.; SKAKKEBAEK, N.E.; MOEN, M. H.; HOLTE, A. Inhibin A and B as markers of menopause: a five-year prospective longitudinal study of hormonal changes during the menopausal transition. **Acta Obstet Gynecol Scand.** 2005, 84(3):281-5.

PHILLIPS, S. M.; SHERWIN, B. B. Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. **Psychoneuroendocrinology**, 1992, 17:485– 495.

PIMENTA, F.; LEAL, I.; BRANCO, J. Menopausa, a experiência intrínseca de uma inevitabilidade humana: uma revisão de literatura. **Análise Psicológica**, p. 455-466, 2007.

PINOTTI, J. A.; FONSECA, Â. M. da. Saúde da Mulher. São Paulo: **Contexto**, 1998.

PITERKIN, P.; COLE, E.; COSSETTE, M. P.; GASKIN, S.; MUMBY, D. G. A limited role for the hippocampus in the modulation of novel object preference by contextual cues. **Learn Mem.** v.15, p. 785–791, 2008.

PORSOLT, R. D *et al.* Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** 1977, 229(2):327-36.

PORSOLT, R. D *et al.* Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.** 1977, 21;266(5604):730-2.

PORSOLT, R. D *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.** 1978, 15;47(4):379-91

RAMÍREZ, O. A.; CARRER, H. F. Effect of estrogen and progesterone priming on the uptake and release of serotonin and noradrenaline from the ventromedial hypothalamus. **Acta Physiol. Lat. Am.**, 32(4):313-9, 1982.

RANCE, N. E. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. **Endocrine**, 30: 11-122, 2009.

REIS, F. M. C. V.; LIMA, F. B.; BRANDÃO, M. L.; FRANCI, JA. Effects of a Transitional Menopause Model on Anxiety Like Behaviors Assessed in the Elevated Plus Maze Test. In: First Brazilian International Symposium on Integrative. **Neuroendocrinology** 2011, Dourado, Brazil.

REIS, F. M.; PESTANA-OLIVEIRA N.; LEITE, C. M.; LIMA, F.B.; BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G.; DEL-BEM, C.M.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**. 2014, 49:130-40.

REX, A. *et al.* "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol Biochem Behav**. 1996, 53(4):1005-11.

REX, A. *et al.* Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 1996, 54(1):107-11.

RYAN, J.; STANCZYK, F. Z.; DENNERSTEIN, L.; MACK, W. J.; CLARK, M. S.; SZOEKE, C.; KILDEA, D.; HENDERSON, V. W. Hormone levels and cognitive function in postmenopausal midlife women. **Neurobiol Aging**. 2012, 33(7):1138-47

ROBAK-CHOLUBEK, D.; WDOWIAK, A.; MAKARA-STUDZIŃSKA, M.; KORCZYŃSKA, E. Perception and degree of acceptance of menopause-related changes in various spheres of life by postmenopausal women. **Ann Agric Environ Med**. 2014, 21(3):666-9.

ROBERTSON, B.A; EACOTT, M. J; EASTON, A. Putting memory in context: Dissociating memories by distinguishing the nature of context. **Behav Brain Res**. 2014, 166-4328(14)00710-4.

ROBICHAUD, M.; DEBONNEL, G. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. **J Neuroendocrinol.**, 17(3):179-85, 2005.

ROSEN, M., CEDARS, M. Endocrinologia reprodutiva feminina e infertilidade. **Endocrinologia clínica e básica**, Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, p. 417-460, 2006.

SABIA, S. *et al.* Risk of onset of menopausal symptoms in periods surrounding menopause. **Maturitas**, 58:(4), 340- 47, 2007.

SAMPAIO, H. A. C. Aspectos nutricionais relacionados ao ciclo menstrual. **Rev. Nutr.** Campinas, v.15, n. 3, p. 309-317, set. - dez. 2002.

SANTORO, N. The menopausal transition. Am J Med. 2005, 19;118 Suppl 12B:8-13.

SHERWIN, B. B. Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women. **Psychoneuroendocrinology**, 1988, 13:345–357.

SHERWIN, B. B. Menopause, early aging and elderly women. Psychopharmacology and women- sex, gender and hormones, Washington DC, **American Psychiatric**, cap. 11, 1996, p.225-37.

SCHINDLER, A. G.; LI, B.; CHAVKIN, C. Behavioral stress may increase the rewarding valence of cocaine associated cues through a dynorphin/kappa opioid receptor mediated mechanism without affecting associative learning or memory retrieval mechanisms. **Neuropsychopharmacology**. v. 35, p. 1932–1942, 2010.

SCHMIDT, P. J.; KEENAN, P. A.; SCHENKEL, L. A.; BERLIN, K.; GIBSON, C.; RUBINOW, D. R. Cognitive performance in healthy women during induced hypogonadism and ovarian steroid addback. **Arch Womens Ment Health**. 2013, 16(1):47-58.

SILVERS, J. M. *et al.* Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. **J. Neurosci. Methods.**, v. 166, n.1, 2007, p.99-103.

SOLOMON, M. B.; HERMAN, J. P. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. **Physiol Behav**. 2009, 25;97(2):250-8.

SOULES, M.R.; SHERMAN, S.; PARROTT, E.; REBAR, R.; SANTORO, N.; UTIAN, W. Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **Fertil Steril**. 2001 Nov;76(5):874-8.

SOWERS, M. R. *et al.* Antimullerian hormone and inibin B in the definition of ovarian again and the menopause transition. **Metabolism clinical and experimental**, 93:3478-83, 2008.

SUTCLIFFE, J. S.; MARSHALL, K. M.; NEILL, J. C. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. **Behav Brain Res**. 2007, 177(1):117-25.

SPRINGER, L. N.; FLAWS, J .A.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Reproductive Toxicology**, 1996, p. 137-143.

SPRINGER, L. N.; MCASEY, M .E.; FLAWS, J. A.; TILLY, J. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1996, 139: 394-401.

STETTER, K. R. *et al.* Diet preference in rats (*Rattus norvegicus*) as a function of odor exposure, odor concentration, and conspecific presence. **J. Comp. Psychol**. 109(4): 384-389, 1995.

TANGEN, T.; MYKLETUN, A. Depression and anxiety trough the climacteric period: an epidimeological study (HUNT-II). **J. Psychosom Obstet Ginaecol.**, 29(2), 2008, p. 125-31.

THOMPSON, K. E.; SIPES, I. G.; GREENSTEIN, B. D.; HOYER, P. B. 17_Estradiol Affords Protection against 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovarian Follicle Loss in Fischer-344 Rats. **Endocrinology**, 2002, 143(3):1058-1065.

THOMPSON, J.; OSWALD, I. Effect of oestrogen on the sleep, mood, and anxiety of menopausal women. **British Medical Journal**, 1977, 2: 1317-1319.

VERAS, A. B. *et al.* Prevalência de transtornos depressivos e ansiosos em uma amostra ambulatorial brasileira de mulheres na menopausa. **Revista Psiquiátrica**, 28 (2), 2006, p. 130-34.

YAN, H. C.; CAO, X.; DAS, M.; ZHU, X. H.; GAO, T. M. Behavioral animal models of depression. **Neurosci Bull.** 2010, 26(4):327-37.

WALLACE, M.; LUINE, V.; ARELLANOS, A.; FRANKFURT, M. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. **Brain Res.** 2006, 18;1126(1):176-82.

WANG, A. L.; LIOU, Y. M.; PAWLAK, C. R.; HO, Y.J. Involvement of NMDA receptors in both MPTP-induced neuroinflammation and deficits in episodic-like memory in Wistar rats. **Behav Brain Res.** 2010, 17;208(1):38-46.

WARREN, M.P. Missed symptoms of menopause. **Int J Clin Pract.** 2007, 61(12):2041-50.

WILLIAMS, N. I.; HELMREICH, D. L.; PARFITT, D. B.; CASTON-BALDERRAMA, A.; CAMERON, J. L. Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. **Clin Endocrinol Metab.** 2001, 86(11):5184-93.

WISE, P.M. *et al.* Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Research Reviews** 37: 313-319, 2001b.

WRIGHT, L. E. *et al.* Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. **J Bone Miner Res.** v. 23, 2008, p. 1296-1303.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research on the menopause in the 1990's: report of a WHO Scientific Group. **WHO Technical Report**, Series 866, Geneva, 1996.

ZHANG, *et al.* Differential factors associated with hot flashes in Chinese perimenopausal and postmenopausal women. **Alcohol**, p. 63-94-98, 2009.