

Jordana Laís De Rocco

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS
COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À DEFESA,
ANSIEDADE E MEMÓRIA EM RATAS WISTAR: POSSÍVEIS
INTERAÇÕES ENTRE O ESTRESSE CRÔNICO
IMPREVISÍVEL E A FALHA OVARIANA PRECOCE.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas
da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Fisiológicas
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda
Barbosa Lima Christian

Florianópolis – 2017

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

De Rocco, Jordana Laís
Caracterização das estratégias comportamentais
relacionadas à defesa, ansiedade e memória e ratas Wistar:
: possíveis interações entre o estresse crônico imprevisível e
a falha ovariana precoce. / Jordana Laís De Rocco ;
orientadora, Fernanda Barbosa Lima Christian -
Florianópolis, SC, 2017.
89 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Transição da Menopausa. 3.
Estresse. 4. Falha ovariana precoce. 5. Transtornos de
humor e déficit cognitivo. I. Lima Christian, Fernanda
Barbosa . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

Jordana Laís De Rocco

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS
COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À DEFESA,
ANSIEDADE E MEMÓRIA EM RATAS WISTAR: POSSÍVEIS
INTERAÇÕES ENTRE O ESTRESSE CRÔNICO
IMPREVISÍVEL E A FALHA OVARIANA PRECOCE.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2017.

Prof.^a Dr.^a Fernanda Barbosa Lima Christian
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Cilene Lino de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Cristina Marta Del Ben
Universidade de São Paulo (Videoconferência)

Dedico este trabalho
aos meus amorosos pais
Arquimedes e Marisa e
ao meu querido irmão Bruno

AGRADECIMENTOS

Agradeço humildemente, em primeiro lugar, a Deus, meu amigo, guardião, meu pastor.

Aos meus amorosos pais Arquimedes Ventura De Rocco e Marisa de Lourdes De Rocco por estarem sempre comigo, torcendo e rezando por mim e por todo seu amor incondicional. Por fazerem de tudo pela minha felicidade! Serei eternamente grata!

Ao meu querido irmão Bruno, por me dar seu carinho e amor de irmão da sua melhor maneira possível. E a minha cunhada Beatriz, pelo seu carinho e auxílio em diversos momentos.

Às minhas queridas amigas Samanta, Taianne e Estela, que apesar da distância fizeram com que a nossa amizade perdurasse! Agradeço humildemente por me ajudarem nos momentos em que eu mais estava precisando, me ouvindo e aconselhando! E também meu obrigada pelos momentos de alegria e as risadas que tivemos juntas! Carrego vocês no coração!

Aos meus amigos Preto e Ari, por todos os momentos de diversão, risadas, pelos passeios nas diversas vezes em que eu estava precisando, só para eu me distrair!

À minha amada amiga, quiropraxista e colega de profissão Thaise, por cuidar da saúde da minha coluna por meio dos seus maravilhosos ajustes, pelas conversas, as risadas, os cafés, o auxílio em diversos momentos! Eu te adoro muito!

A minha amiga Cris, por me acompanhar nessa jornada, pela sua companhia, pela ajuda nos estudos, por me escutar em diversos momentos. Ao meu amigo Ítalo, pela ajuda e companhia em momentos de lazer.

Gratidão pela prática do Yoga e pelas minhas queridas professoras que passaram por mim nesses dois anos, principalmente a prof. Aline que neste último semestre me proporcionou um estado de plenitude e iluminação durante as suas aulas, reduzindo o meu nível de ansiedade neste período conturbado.

À minha amada terapeuta Adri que me fez enxergar, de uma maneira diferente e esclarecedora, como a vida acontece e como as pessoas agem e são. Por me ajudar a enfrentar as minhas dificuldades, a esvanecer as minhas mágoas e por me proporcionar a ter uma vida mais leve e tranquila!

Gratidão ao meu ex-marido Wagner, que me ajudou em grande parte dessa caminhada.

Ao time LENEK: Elisa, Júlia, Tamires, Bruna e Flaviano, sem os quais essa pesquisa se tornaria impossível de ser realizada. Sou grata pela ajuda no laboratório e diversos momentos de descontração e risadas. Vocês são de grande importância, moram no meu coração! Obrigada por tudo!

Aos meus queridos colegas Amanda, Clenia, Márcia e James, pelos gloriosos momentos que tivemos em Porto Alegre, pelos passeios, risadas, almoços que fizemos!

Às minhas colegas de apartamento no período em estive em Porto Alegre. Foi muito divertido morar em um local com 11 mulheres!

Aos meus colegas deste curso que me ajudaram durante esses dois anos de alguma forma. Meu muito obrigada!

Às queridas Amanda, Ileana e Denise, da Clínica Una, pela acupuntura e massagem, pelas conversas, pelo auxílio em diversos momentos.

Aos meus vizinhos, por serem os melhores vigias da minha casa, por me auxiliarem em vários momentos de dificuldade.

À todos os professores que passaram pelo meu caminho, que contribuíram para a minha formação e pela colaboração de empréstimo de materiais, tanto desta instituição, quanto as instituições nucleadoras, em principal a minha orientadora Profa. Dra. Fernanda, que com sua delicadeza e paciência me guiou para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Cilene pelo uso do biotério, ensinamentos e empréstimos de materiais.

Ao Prof. Dr. Moacir pelo empréstimo do labirinto em cruz elevado para os experimentos e à Profa. Dra. Elizabeth pelo empréstimo da caixa para o Teste de Reconhecimento de Objetos.

A UFSC pela instalação e infraestrutura.

Ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, que me proporcionou uma nova visão sobre a Fisiologia e permitiu um excelente crescimento nesta área.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Aos animais.

O amor é a força mais poderosa que existe, porque
não tem limites.”
Albert Einstein

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às
mudanças.” Stephen Hawing

LOKAH SAMASTAH SUKHINO
BHAVANTHU

RESUMO

Os distúrbios psíquicos, como a depressão e a ansiedade, representam um problema de saúde pública, já que são as principais causas de incapacidade na sociedade contemporânea ocidental e um dos principais fatores que contribuem para o surgimento destes é o estresse psicossocial, presente na vida de homens e mulheres. Entretanto, estudos sugerem que a ocorrência deste tipo de estresse é maior em mulheres, visto que estes distúrbios são frequentemente diagnosticados em nesta população principalmente, durante o período da transição da menopausa. Outra injúria associada à essa fase é o déficit cognitivo. Neste período, ocorrem diversas alterações hormonais, como a flutuação dos níveis plasmáticos de estradiol e declínio de progesterona, que podem predispor as mulheres a esses problemas. O 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD) é um composto químico que promove a depleção gradual dos folículos ovarianos em roedoras, com conseqüente alteração no perfil hormonal, o qual tem sido utilizado para mimetizar o que ocorre no período de transição da menopausa humana. A fim de verificar se a falha ovariana influenciada pelo estresse conduz a modificações no comportamento de roedoras em testes relacionados a essas injúrias, ratas Wistar foram submetidas ao tratamento, por 15 dias consecutivos, com VCD ou óleo (controle) e expostas a um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) por 10 dias consecutivos. Os animais foram submetidos a testes comportamentais como: o teste do nado forçado (TNF) repetido modificado, o qual foi utilizado como um dos estímulos estressores durante a aplicação do ECI, aproximadamente 80 e 180 dias após o início do tratamento. Um grupo foi submetido apenas as TNF repetido modificado 80 dias pós-tratamento, sem o ECI. Outro grupo foi submetido ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), teste do campo aberto (TCA) e teste de reconhecimento de objetos (TRO) depois da aplicação do ECI. As ratas com falha ovariana apresentaram diferentes estratégias no TNF repetido modificado durante o ECI, demonstrando redução de comportamentos pró-ativos nos períodos de 80 e 180 dias, além de terem exibido elevação do comportamento passivo com 180 dias pós-tratamento. Já a exposição apenas ao TNF repetido modificado conduziu ao aumento de estratégias pró-ativas nestes animais. No LCE, os animais com falha ovariana apresentaram redução da duração dos braços abertos e da frequência do comportamento de imersão de cabeça, independentemente de terem sido expostas ao estresse. No TCA, as ratas com falha ovariana aumentaram o comportamento de autolimpeza e reduziram a exploração vertical após expostas ao ECI. No TRO, as ratas

com falha ovariana não exibiram diferença no índice de reconhecimento para o objeto familiar e novo, nem mesmo após estímulos estressores. Dessa forma, conclui-se que a falha ovariana conduz a estratégias modificadas para lidar com a exposição ao TNF repetido modificado durante e sem o ECI; a falha ovariana provoca aumento do comportamento ansioso dos animais no LCE, independentemente de estarem submetidos ao ECI ou nado forçado, porém no TCA, os animais submetidos ao tratamento com VCD só apresentam ansiedade após ECI; e a falha ovariana não desencadeia injúria mnemônica no TRO, mesmo após expostos à estímulos estressores.

Palavras-chave: transição da menopausa, depressão, ansiedade, déficit cognitivo, 4-vinilciclohexano diepóxido, estresse crônico imprevisível, testes comportamentais.

ABSTRACT

The psychiatric disorders, as depression and anxiety, perform a public health problem, because they are the main causes of disability in the contemporary western society and one of the main factors contributing to appearing on these disorders its the psychosocial stress, present in the lives of men and women. However, studies suggest that the occurrence of this type of stress is greater in women, since these disorders are often diagnosed in this population mainly, during the period of menopause transition. Another injury associated with this phase is cognitive deficit. During this period, several hormonal changes occur, such as fluctuation in plasma levels of estradiol and progesterone decline, which may predispose women to these problems. The 4-vinylcyclohexane diepoxide (VCD) is a chemical compound that promotes gradual depletion of ovarian follicles in rodents, with a consequent alteration in the hormonal profile, which has been used to mimic what occurs during the period of human menopause transition. In order to verify if ovarian failure influenced by stress leads to changes in the behavior rodents in tests related to these injuries, Wistar rats were treated for 15 consecutive days with VCD or oil (control) and exposed to a protocol of unpredictable chronic stress (UCS) for 10 consecutive days. The animals were submitted to behavioral tests such as: the modify repeated forced swimming test (FST), which was used as one of the stressor stimuli during UCS application, approximately 80 and 180 days after the start of treatment. One group was submitted to modify repeated FST only 80 days post-treatment, without UCS. Another group was submitted to the elevated plus-maze test (EPM), open field test (OFT) and object recognition test (ORT) after the UCS application. The rats with ovarian failure presented different strategies in the modify repeated FST during UCS, demonstrating reduction of proactive behaviors in the periods of 80 and 180 days, in addition to exhibiting increased passive behavior with 180 days post-treatment. Exposure to modify repeated FST isolated, without the other stresses, has led to an increase in proactive approaches in these animals. In EPM, animals with ovarian failure had a reduction in the duration of open arms and the frequency of head-dipping, regardless of whether they were exposed to stress. In OFT, animals with ovarian failure increased grooming and reduced the vertical activity after exposure to UCS. In ORT, rats with ovarian failure showed no difference in the recognition index for the familiar and new object, even after stressful stimuli. Thus, it is concluded that ovarian failure leads to modified strategies to cope with exposure to modify repeated FST during

and without UCS; the ovarian failure causes an increase anxious behavior of the animals in the EPM, regardless of whether they are submitted to UCS or forced swimming, but in the OFT, the animals submitted to the treatment with VCD only present anxiety after UCS; and the ovarian failure does not trigger mnemonic injury in OFT, even after exposure to stressor stimuli.

Keywords: menopausal transition, depression, anxiety, cognitive deficit, 4-vinylcyclohexane diepoxide, unpredictable chronic stress, behavioral tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.	33
Figura 2. Esquema representativo do teste de reconhecimento de objeto.	34
Figura 3. Massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	38
Figura 9. Latência do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	41
Figura 10. Duração e frequência do mergulho dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. ...	42
Figura 17. Massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	47
Figura 18. Duração da imobilidade dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	48
Figura 21. Duração, frequência e latência da escalada dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	50
Figura 23. Duração do nado dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	51
Figura 26. Duração, frequência e latência do mergulho dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	52
Figura 28. Duração dos braços fechados no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. ...	54
Figura 32. Frequência do congelamento, SAP, autolimpeza e exploração vertical no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	56

Figura 34. Duração e frequência da imobilidade durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo..	57
Figura 36. Duração e frequência da autolimpeza durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.	58
Figura 37. Permanência no centro durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo.....	59
Figura 38. Frequência da passagem no centro durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo..	59
Figura 39. Índice de Reconhecimento do Objeto Familiar (A) e Objeto Novo (B) dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo..	60
Figura 40. Dosagem da Progesterona dos animais com 80 e 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo expostos ao ECI.....	60
Figura 41. Dosagem do Estradiol dos animais com 80 e 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo expostos ao ECI.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de variância
ECC- Estresse crônico combinado
ECI- Estresse crônico imprevisível
ECP- Estresse crônico previsível
FHS – Hormônio folículo-estimulante
HHa- Hipotálamo-hipófise-adrenal
HHO- Hipotálamo-hipófise-ovário
LCE- Labirinto em cruz elevado
LH- Hormônio luteinizante
SAP- Stretched attend postures
TNF- Teste do nado forçado
TNF-r - Teste do nado forçado repetido
TCA- Teste do campo aberto
TRO- Teste de reconhecimento de objetos
VCD- 4-vinilciclohexano-diepóxido

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	17
1.1- Transição menopausal, Estresse, Depressão e Ansiedade.....	17
1.2- Transição menopausal, Estresse e Déficit Cognitivo	22
1.3- VCD: modelo experimental da transição da menopausa	24
2- OBJETIVOS	27
2.1- Objetivo Geral.....	27
2.2- Objetivos Específicos.....	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1- Animais	28
3.2- Indução da Falha Ovariana	28
3.3- Grupos experimentais	28
3.4- Protocolos Experimentais	29
3.4.1- Protocolo para o estresse crônico imprevisível (ECI).....	29
3.4.2- Protocolo para os testes comportamentais	31
3.5- Eutanásia e perfusão dos animais.....	34
3.6- Massa Relativa dos ovários e massa corporal dos animais	35
3.7- Análise dos vídeos comportamentais	35
3.8- Dosagem Hormonal	36
3.9- Análise Estatística	36
4- RESULTADOS	37
4.1- Animais 80 dias após tratamento com VCD (perimenopausa)	37
4.1.1- Efeito do estresse sobre a massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários	38
4.1.2- Teste do Nado Forçado repetido modificado aplicado durante o ECI.....	38
4.1.3- Teste do Nado Forçado repetido modificado sem exposição concomitante ao ECI.....	43
4.2- Animais 180 dias após tratamento com VCD (menopausa)	47
4.2.1- Efeito do estresse sobre a massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários	47
4.2.2- Teste do Nado Forçado repetido modificado aplicado durante o ECI.....	48

4.3-Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em ratas 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa)	53
4.4- Teste do Campo Aberto em ratas com 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa).....	57
4.5- Teste de Reconhecimento de Objeto em ratas 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa)	59
5- DISCUSSÃO	61
5.1- Teste do Nado Forçado repetido modificado na presença ou ausência do ECI.....	61
5.2- Teste do Labirinto em Cruz Elevado	68
5.3- Teste do Campo Aberto	70
5.4- Teste de Reconhecimento de Objetos	71
5.5- Níveis hormonais dos animais expostos ao ECI	73
6- CONCLUSÃO	75
7-REFERÊNCIAS.....	76
8- ANEXO	88

1- INTRODUÇÃO

1.1- Transição menopausal, Estresse, Depressão e Ansiedade

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado, que a expectativa de vida dos seres humanos tem se elevado continuamente e substancialmente (Wang *et al.*, 2012). Com a crescente população idosa, mais mulheres atingirão o período da menopausa e passarão pelo menos um terço das suas vidas na fase pós-menopausa, a qual é caracterizada por níveis reduzidos dos principais hormônios ovarianos, estradiol e progesterona (Hall, 2007).

A menopausa é definida como a cessação permanente da ovulação e menstruação por um período mínimo de 12 meses consecutivos subsequentes sem um período menstrual (WHO, 1996). Já a transição da menopausa, também é um período importante, dinâmico, que ocorre durante vários anos anterior a menopausa, em que as mulheres experimentam mudanças no seu ciclo menstrual, o qual deve ser estudado ladeado com a perimenopausa, que compreende o período que antecede a menopausa até um ano após a menopausa (Harlow *et al.*, 2012). Com o avançar da idade, as mulheres perdem gradativamente a sua capacidade reprodutiva, por meio do esgotamento do estoque de folículos ovarianos, através do processo de atresia, caracterizando assim a instalação da menopausa. Essa depleção dos folículos provoca uma série de alterações no eixo neuroendócrino, gerando a perda da retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e a glândula hipófise anterior, ocasionada pelos baixos níveis de estradiol e progesterona. A perda da retroalimentação negativa resulta em níveis plasmáticos do hormônio folículo-estimulante (FSH) elevados, que precede os níveis do hormônio luteinizante (LH) e ocorrem com maior intensidade (Hall, 2007).

Dados da literatura sugerem que estas alterações hormonais podem tornar as mulheres mais vulneráveis à estresses cotidianos sejam eles físicos ou psicossociais (Mauri, 1990; Lindheim *et al.*, 1992; Kudielka *et al.*, 1999; Ter Horst *et al.*, 2009). A resposta do organismo ao estresse é um mecanismo evolutivo fundamental para a sobrevivência. O estresse agudo é considerado uma resposta benéfica, uma vez que é uma reação de alarme que prepara o corpo para uma possível ameaça. Esta resposta é determinada pela secreção de mediadores, como os glicocorticoides e a epinefrina, o que permite a estabilidade da função

corporal pela adaptação ao estímulo estressor (McEwen, 2005). Contudo, quando a exposição ao estresse é prolongada, incontrollável e de alta intensidade, o resultado pode ser inapropriado para o organismo. A exposição ao estresse a longo prazo gera alterações biológicas e psicológicas que podem desencadear distúrbios físicos e psíquicos, como depressão maior e transtornos de ansiedade, que são as principais causas de incapacidade na sociedade ocidental contemporânea, sendo, portanto, um problema de saúde pública (Lupien *et al.*, 2009; Holden, 2005). As mulheres que foram expostas a eventos de vida estressantes, tais como falecimento de amigo próximo, ataques físicos ou mudança de residência, possuem três vezes mais risco de desenvolver depressão maior do que os homens que também foram expostos aos mesmos estresses (Maciejewski *et al.*, 2001).

Quando as mulheres passam pelo período de transição menopausal, este quadro de alterações psicológicas pode ser agravado ainda mais, devido as diversas mudanças na regulação da rede de circuitos emocionais e nos fatores hormonais, bioquímicos e sociais que ocorrem durante essa fase (Frey *et al.*, 2010). O estresse psicossocial e o estado emocional estão intimamente relacionados. A medida que as mulheres progredem na perimenopausa, as flutuações hormonais podem modificar a funcionalidade de diversas estruturas cerebrais envolvidas na regulação afetiva, como a atividade amígdala-hipocampo. Nessa fase, as mulheres podem experimentar uma reatividade alterada a eventos de vida estressantes, tornando-as mais vulneráveis a distúrbios de humor (Newhouse e Albert, 2015). Além disso, as mulheres podem exibir diferentes estratégias de enfrentamento a eventos estressantes diários ao longo da vida quando comparadas aos homens. Isso pode ser explicado pelo fato de que o eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é ativado frente ao estresse por mecanismos que diferem entre machos e fêmeas (Kendler, Thornton e Prescott, 2001). Nos ratos, em situações de estresse, os níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) são aumentados e os níveis de corticoesterona são maiores e permanecem elevados no plasma por mais tempo nas fêmeas do que nos machos (Figueiredo, Dolgas e Herman, 2002). Além disso, a globulina ligadora de corticoesteróide (CBG) é encontrada em maiores quantidades nas fêmeas do que nos machos, tornando a corticoesterona biologicamente ativa, aumentando a sua capacidade de se ligar com seu receptor (Turner e Weaver, 1985).

Em animais vertebrados, é observado que o estresse promove alterações comportamentais, que suprimem determinadas funções para que o organismo possa reagir de maneira efetiva ao estímulo estressor

(Sapolsky, 1992). Modelos de estresse crônico imprevisível (ECI) são aplicados em roedores para induzir estados depressivos nos animais, ocasionando uma transformação no desempenho comportamental, caracterizado por anedonia (Papp, Willner e Muscat, 1991; D'Aquila, Brain, Willner, 1994). O ECI consiste na aplicação de uma série de estímulos estressores distintos realizados diariamente por um longo período que varia de dias a semanas. A exposição aos estresses é randomizada, intermitente e inesperada, de forma a impedir a habituação dos animais. O ECI difere de outros tipos de estresse crônico como por exemplo, o estresse de restrição diariamente repetido (Willner *et al.*, 1987; Sadler e Bailey 2016). Este último tipo de estresse é apresentado como estresse crônico previsível (ECP) (Yoon *et al.*, 2014).

A exposição exagerada ao estresse pode conduzir a depressão maior, a qual atinge duas vezes mais mulheres do que homens e apresenta manifestações clínicas como: falta de interesse em atividades diárias, sentimento de tristeza, apatia, tédio, pessimismo, culpa, expressão de ideias que indicam doença, morte e suicídio, com alta prevalência no mundo todo, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade (Murphy *et al.*, 2000; Kessler *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2016). A maior taxa nos indivíduos femininos pode ser explicada por fatores socioeconômicos como abuso, educação e renda, bem como pela distinção nos fatores biológicos (bioquímicos e hormonais) que são experimentalmente tratáveis e podem auxiliar na compreensão do maior predomínio desta doença em mulheres (Cyranowski *et al.*, 2000; Noble, 2005).

Os sintomas da depressão são experimentados pelas mulheres em várias fases da vida como na tensão pré-menstrual, durante a perimenopausa ou após o parto, em decorrência da alteração dos hormônios ovarianos observada nesses períodos (Masmoudi *et al.*, 2014; Kruif, Spijker e Molendijk, 2016; Noble, 2005). A transição da menopausa é apresentada geralmente com sintomas vasomotores, os quais são fortemente associados com fenômenos de ansiedade e depressivos (Gold *et al.*, 2006; Kruif, Spijker e Molendijk, 2016). Os mecanismos que contribuem para isso estão pouco esclarecidos, não havendo tratamento específico para as mulheres; necessitando assim, o desenvolvimento de pesquisas nessa área (Albert, 2015).

As características da ansiedade e as situações estressantes podem ser congruentes na evocação do aumento do estado da ansiedade, determinado pela sensação de desconforto mental, inquietação e preocupação exagerada (Endler e Kocovski, 2001). Durante a fase de

transição menopausal, as mulheres passam por diversas situações, uma série de mudanças e alterações no ambiente familiar como separação, síndrome do ninho vazio, enfermidade ou falecimento de familiares, instabilidade financeira após a aposentadoria, que podem contribuir para o desenvolvimento da depressão e ansiedade (Li *et al.*, 2008).

A maneira com que a mulher lida com as mudanças neste período da vida, pode posteriormente influenciar nos níveis de desenvolvimento de ansiedade (Lazarus, 2000). O estresse associado à ansiedade e depressão tem sido visto como um potencial fator para agravar os sintomas negativos da menopausa. Mulheres afetadas emocionalmente são mais negativas, o que faz com que exista uma tendência maior de desenvolverem sintomas mais severos durante a menopausa, ocasionando uma redução da qualidade de vida nesse período (Bauld e Brown, 2009).

Para avaliação dos aspectos comportamentais relacionados à ansiedade em animais é muito aplicado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), o qual é baseado em respostas incondicionadas e espontâneas ao novo ambiente (Rodgers e Dalvi, 1997). O LCE consiste em um teste para roedores que desencadeia um conflito entre a curiosidade inata sobre explorar ambientes novos e a aversão a áreas ameaçadoras, como os braços abertos do LCE (Lister, 1987; Rodgers e Dalvi, 1997). Dessa maneira, ele é considerado uma ferramenta eficaz para explorar as bases da neurobiologia da ansiedade (File, Gonzalez e Gallant, 1998; Holmes *et al.*, 2003), sendo validada tanto em ratos como em camundongos (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987).

O LCE consiste em um equipamento elevado do chão com quatro braços situados perpendicularmente em direções opostas, dois braços fechados e dois braços abertos, no qual a ansiedade pode ser mesurada por meio das abordagens espaço-temporais e etológicas (Rodgers e Johnson, 1995; Cruz *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1998). A abordagem espaço temporal consiste nos índices primários da ansiedade, que são constatados pelo percentual de tempo gasto e a frequência de entrada nos braços abertos em relação ao tempo gasto e o número de entrada nos braços fechados (Harro, 1993), sendo este último considerado como a atividade locomotora do animal (Lister, 1987).

A inclusão da análise etológica garante uma validade ecológica ao teste, permitindo que a investigação seja analisada de maneira mais global, bem como colabora com o aumento da validade de constructo e melhora da detecção nas mudanças da ansiedade em relação às doses dos fármacos ansiolíticos aplicados (Rodgers e Dalvi, 1997; Setem *et al.*, 1999). De acordo com Cruz, Frei e Graeff (1994) e Rodgers *et al.*, (1999), essa abordagem consiste na avaliação de comportamentos como:

exploração vertical, autolimpeza, congelamento, imersão de cabeça e SAP (do inglês, “stretched attend postures”). O aumento do comportamento SAP e redução da imersão de cabeça identificam uma resposta ansiosa no LCE (Rodgers *et al.*, 1997). Realizar maior número de vezes os comportamentos de autolimpeza e congelamento também refletem aumento da ansiedade neste teste (Rodgers e Dalvi, 1997).

Existem muitas variáveis que podem influenciar nos resultados obtidos durante a realização do LCE, as quais devem ser cautelosamente analisadas como a espécie, idade, gênero do animal, bem como aspectos relacionados a procedimentos de manipulação prévia, ciclo circadiano, luminosidade do ambiente, contexto de estresse (Carobrez e Bertoglio, 2005).

Já para estudar aspectos relacionados a depressão em modelo animal foi estabelecido o teste do nado forçado (TNF). Na década de 70, esse teste foi criado para avaliar a ação de fármacos antidepressivos. Quando os ratos são forçados a nadar em um espaço restrito do qual eles não podem escapar, logo adquirem um comportamento passivo chamado de imobilidade, o qual é reduzido através da administração de alguns fármacos antidepressivos. Portanto, foi definido que o comportamento de imobilidade que os animais apresentam neste tipo de experimento, pode refletir um estado de humor depressivo dos roedores (Porsolt *et al.*, 1977, 1978, 1979).

Ao analisar mais profundamente a ação de antidepressivos, Detke, Rickels e Lucki (1995) perceberam que a redução do comportamento de imobilidade, ao final dos 5 minutos de teste, está sob controle de diferentes mecanismos de ação. Essas diferenças nos sistemas de neurotransmissores são apresentadas para os comportamentos de escalada e nado, que são considerados comportamentos pró-ativos neste teste. Estes autores mostraram que fármacos antidepressivos noradrenérgicos promovem o aumento do comportamento de escalada, enquanto fármacos antidepressivos serotoninérgicos desencadeiam o aumento do comportamento de nado ao final do teste.

Apesar da validade preditiva existente no modelo do TNF, por demonstrar uma resposta efetiva (redução do comportamento de imobilidade) frente a administração de compostos antidepressivos, Castagné, Moser e Porsolt (2005) e Spinhoven *et al.*, (2010) não consideram este um bom modelo animal para se estudar a depressão, pois tal modelo deve ter validade de face (sinal ou sintoma que mimetize depressão) e de constructo (reproduzir no animal os processos que causam esse tipo de transtorno), além da preditiva. No entanto, outros autores

argumentam que o comportamento de imobilidade é uma estratégia de sobrevivência do animal, e isso não está relacionado com a depressão, mas sim com uma maneira de conservar energia para o enfrentamento desse tipo de estresse. Portanto, consideram mais adequado usar esse teste para avaliar mecanismos subjacentes às estratégias de lidar com estresse e adaptação (Kloet e Molendijk, 2016).

O teste do nado forçado repetido foi desenvolvido a fim de se avaliar o tratamento crônico dos inibidores de recaptção da serotonina e inibidores da recaptção da noradrenalina. Ele consiste em uma aplicação de 15 minutos de nado forçado, seguida de uma segunda exposição de 5 minutos 24 horas depois, uma repetição da segunda exposição, também com duração de 5 minutos, 7 e 14 dias depois (Mezadri *et al.*, 2011).

Neste trabalho, o nado forçado foi aplicado como um dos estímulos estressores que constituíram o ECI e quatro exposições ao nado isoladas, designadas como teste do nado forçado repetido modificado, as quais foram realizadas para a representação de um estresse mais brando que o ECI. O nado forçado foi gravado e também analisado como teste comportamental, a fim de observar as estratégias de enfrentamento que os animais desenvolveram neste tipo de teste, ao longo do ECI ou das quatro exposições ao nado isoladas.

1.2- Transição menopausal, Estresse e Déficit Cognitivo

A memória envolve o processamento de um sistema de aquisição, armazenamento e evocação de informações. A aquisição denota a aprendizagem e o armazenamento compreende um mecanismo complexo que depende do tipo de memória adquirida. Já a evocação é a lembrança daquilo que foi assimilado (Izquierdo, 1989; Squire, 2004).

Já está demonstrado claramente na literatura que os esteroides ovarianos exercem um papel protetor em neurônios (Bethea *et al.*, 2009; Baudry, Bi e Aguirre, 2013; Chan *et al.*, 2014; Bourque *et al.*, 2016). Mulheres após a menopausa frequentemente se queixam de perda de concentração e memória (Devi *et al.*, 2005), o que pode ser consequência da redução da secreção de estradiol, tendo em vista que a disponibilidade desse hormônio em áreas cerebrais como córtex pré-frontal medial e hipocampo impacta positivamente em alguns aspectos da função cognitiva (Luine, 2014). Durante a transição menopausal, os níveis de estradiol estão flutuando, porém a progesterona já se encontra em redução, mostrando que este hormônio pode estar envolvido no déficit cognitivo nesta fase (Reis *et al.*, 2014).

O estresse psicossocial pode prejudicar a aprendizagem por meio da supressão da atividade hipocampal. Com o estresse constante, a prologada ativação do eixo HHA conduz a uma secreção elevada de cortisol, o qual pode agir diretamente na amígdala, que interage com neurônios hipocampais, prejudicando sua plasticidade e função cognitiva. Enquanto a amígdala é fundamental para o aprendizado das emoções, sua ativação excessiva pode suprimir o funcionamento do hipocampo (Galea *et al.*, 1997; Kim e Diamond, 2002). O estradiol pode modular esse processo, protegendo o hipocampo, reduzindo os efeitos do estresse e emoções negativas (Albert, Pruessner e Newhouse, 2015).

Tendo em vista que as mulheres possuem uma maior sensibilidade do que os homens a baixos níveis de cortisol após expostas a estímulos estressores repetidos, se tornam mais vulneráveis a injúrias em diversas regiões encefálicas. Estas injúrias podem estar relacionadas com transtornos psíquicos, bem como a função cognitiva, principalmente na transição menopausal, por meio da interação do cortisol com os níveis flutuantes dos hormônios ovarianos característicos dessa fase (Newhouse e Albert, 2015).

Para estudar a função cognitiva e memória episódica em roedores é comumente utilizado o Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO). Este teste é análogo a técnicas utilizadas na neuropsicologia clínica. Ele é fundamentado na preferência inerente dos roedores em explorar novos objetos em um contexto conhecido, não sendo necessário um aprendizado prévio, evitando possíveis variáveis de confusão (Ennaceur e Delacour, 1988).

Esse teste é caracterizado como um paradigma de aprendizagem de julgamento, no qual o roedor mostra a capacidade de discriminar entre objetos familiares e novos, consistindo em duas análises, um ensaio aquisição, seguido de uma retenção após um intervalo que varia de minutos a horas (Silvers *et al.*, 2007; Ennaceur, 2010). É considerado um teste apropriado para investigar efeitos em diferentes fases de aprendizagem e memória como codificação, consolidação e recuperação (Tuscher *et al.*, 2015). Além disso, é um teste com baixo nível de estresse, o que permite estudos da neuroendocrinologia, pois não há influência dos glicocorticoides sobre os hormônios ovarianos, os quais poderiam intervir nos resultados (Bowman, Ferguson e Luine, 2002).

O reconhecimento do objeto é determinado pela diferença no tempo de exploração entre os objetos novos e familiares, pois os roedores tem a tendência de explorar por mais tempo os objetos novos, por supostamente lembrar dos antigos (Ennaceur e Delacour, 1988). O TRO

tem sido empregado na literatura para estudos neurológicos e farmacológicos de regiões encefálicas como o hipocampo, córtex-pré-frontal, frontal, parietal e temporal, que são locais especializados na formação e evocação de memórias (Soch *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). As vantagens de sua utilização incluem o fato de ser uma tarefa simples, pois pode ser realizada num curto período de tempo, não ser onerosa, não requerer motivação, recompensa ou punição dos animais, e exigir pouco treinamento ou habituação (Silvers *et al.*, 2007). Previamente ao TRO é comumente realizada a habituação dos animais ao novo local, a qual é utilizada também como avaliação da capacidade locomotora e exploratória dos animais, conhecido como teste do campo aberto (TCA). Neste teste, os animais experimentam um conflito entre a tendência instintiva da exploração do novo local e a tendência de evitar essa experiência nova (Walsh, Lamb e Tilson, 1986; Treit, 1985). Um aumento da atividade exploratória no campo aberto é interpretado com um efeito ansiolítico (Davies e Steinberg, 1984).

1.3- VCD: modelo experimental da transição da menopausa

Modelos de experimentação animal podem contribuir para o entendimento de aspectos biológicos do período de vida conturbado em que a mulher passa durante a menopausa. Muitos estudos têm utilizado o modelo da ovariectomia para investigar aspectos hormonais relacionados à menopausa (Ibrahim *et al.*, 2016; Gervais *et al.*, 2016; Maslov *et al.*, 2016). Porém, este não é o melhor modelo para esta representação, devido ao fato de que a retirada dos ovários conduz a uma queda brusca dos hormônios ovarianos; ausência do tecido remanescente, não permite manipulação sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HHO) e não possui a fase de transição da perimenopausa (Frye *et al.*, 2012).

Um dos modelos que mais se assemelha a transição da menopausa é o que utiliza o composto químico 4 vinilciclohexano-diepóxido (VCD) para indução da falha ovariana precoce em roedoras (ratas e camundongas) com a preservação do tecido residual (Springer *et al.*, 1996; Lohff *et al.*, 2005; Frye *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2002). O VCD seletivamente promove a depleção dos folículos primordiais e primários gradualmente e sua subsequente maturação, através da aceleração do processo natural de atresia – apoptose, sem provocar toxicidade em outros tecidos (Hu *et al.*, 2001). O período entre a perda desses folículos e a falha ovariana ocasionada por este composto é análogo a etapa da perimenopausa na mulher (Mayer *et al.*, 2002).

Além disso, com o passar do tempo após o início do tratamento com VCD é observada a instabilidade dos níveis de estradiol, que conduz a interrupção da retroalimentação negativa e consequente elevação dos níveis de FSH e LH, acompanhada da perda da regularidade do ciclo estral das roedoras. Esses episódios ocorrem previamente a falha ovariana total quando há um platô nos níveis de FSH, queda dos níveis de estradiol e resulta na aciclicidade (Mayer *et al.*, 2002).

Reis e colegas (2014) observaram que os níveis de FSH começam a se elevar 90 dias após o início da administração do VCD (dado não publicado). Já Mayer e colaboradores (2002) demonstraram que os níveis de FSH se elevam a partir de 120 dias após o início do tratamento com VCD, acompanhado pela redução dos folículos antrais. Como o final da perimenopausa humana é caracterizado por aumento dos níveis séricos de FSH (Hall, 2004), foi definido como aproximadamente 80 dias, o período correspondente à transição menopausal neste modelo animal (Reis *et al.*, 2014).

O período cerca de 180 dias após o início da administração do VCD já apresenta características que se assemelham a menopausa humana, pois nesta fase já há uma redução significativa dos folículos primordiais e primários (Muhammad *et al.*, 2009), com subsequente diminuição contínua, conforme demonstra o estudo de Mayer e colegas (2002) nas datas de 240 e 360 dias após o início do tratamento com VCD.

Também foi observada uma redução dos níveis séricos de progesterona, testosterona e di-hidrotestosterona nas ratas que foram tratadas com VCD 80 dias após início do tratamento (Reis *et al.*, 2014). Tendo em vista essas características apresentadas pela literatura, a indução da falha ovariana através do tratamento com VCD é considerada um modelo eficiente para mimetizar as mudanças hormonais que ocorrem durante a fase de transição menopausal e instalação da menopausa na mulher, sendo utilizado, portanto, em estudos que visam investigar estas mudanças.

No período da transição da menopausa ocorrem muitas transformações na vida das mulheres, além das alterações hormonais. Esses eventos podem colaborar para o aumento da vulnerabilidade a estresses físicos e psíquicos e contribuir para o crescimento da suscetibilidade a distúrbios de humor como depressão e ansiedade, e outras injúrias como déficit cognitivo na população feminina que passa por essa fase. Não havendo tratamentos adequados para esses problemas voltados para este público, o presente trabalho se faz necessário. Nós hipotetizamos que a falha ovariana precoce pode desencadear aumento do

comportamento de imobilidade no nado forçado, aumento do comportamento ansioso no LCE e pode conduzir a um déficit de cognição e memória. Ainda hipotetizamos que as ratas com falha ovariana são mais susceptíveis à exposição ao estresse, apresentando aumentos ainda mais significativos do comportamento ansioso e do déficit de cognição e memória.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Estudar se as ratas com falha ovariana precoce são mais susceptíveis a exposição do estresse crônico imprevisível (ECI) do que as ratas com os ovários intactos.

2.2- Objetivos Específicos

Avaliar o efeito que a exposição ao ECI promove no comportamento das ratas com falha ovariana precoce 80 e 180 dias após o início do tratamento com VCD no teste do nado forçado repetido modificado;

Avaliar o efeito que a exposição ao ECI promove no comportamento das ratas com falha ovariana precoce 80 dias após o início do tratamento com VCD no teste do labirinto em cruz elevado;

Avaliar o efeito que a exposição ao ECI promove na cognição e memória de ratas com falha ovariana precoce 80 dias após o início do tratamento com VCD no teste de reconhecimento de objetos;

Avaliar se a exposição ao nado forçado repetido modificado desencadeia as mesmas alterações comportamentais que o ECI em ratas com falha ovariana precoce 80 dias após o início do tratamento com VCD.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), as quais foram alojadas no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento (BIO 066). As ratas chegaram ao biotério setorial com 21 dias de vida e foram mantidas em caixas polipropileno branco (30 x 19 x 13 cm), 5 animais por caixa, sob um ciclo claro-escuro de 12h (luzes apagadas às 6h e luzes acessas às 18h) e temperatura ambiente controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), com acesso a água e ração *ad libitum*. No período da manhã, três vezes por semana, foi realizada a limpeza das caixas e o reabastecimento de alimento e água durante toda a fase de experimentação. Os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – Nº PP00842 (anexo 1).

3.2- Indução da Falha Ovariana

Após uma semana de adaptação no novo ambiente, quando os animais completaram 28 dias de idade, foi iniciado o tratamento com VCD (grupo experimental) ou óleo de milho (grupo controle), no qual foram administrados 160 mg/Kg via intraperitoneal durante 15 dias consecutivos. Os animais foram estudados em dois períodos após o início do tratamento com VCD: aproximadamente 80 dias, quando as ratas apresentam alterações similares às aquelas encontradas no período de perimenopausa (Reis *et al.*, 2014) e cerca de 180 dias, quando já pode ser encontrado um quadro de falha ovariana instalada (Lohff, 2005; Mayer, 2002). A dose utilizada foi baseada em estudos realizados anteriormente (Mayer *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2014).

3.3- Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, não cegado, nos seguintes grupos:

- 1) Grupo CTL (óleo) exposto ao estresse do nado forçado repetido modificado + LCE + TRO
- 2) Grupo VCD exposto ao estresse do nado forçado repetido modificado + LCE + TRO

- 3) Grupo CTL (óleo) exposto ao ECI + LCE + TRO
- 4) Grupo VCD exposto ao ECI + LCE + TRO
- 5) Grupo CTL (óleo) sem ECI + LCE + TRO
- 6) Grupo VCD sem ECI + LCE + TRO
- 7) Grupo CTL (óleo) exposto ao ECI
- 8) Grupo VCD exposto ao ECI

ECI: Estresse crônico imprevisível; LCE: Labirinto em cruz elevado; TRO: Teste de reconhecimento de objeto

3.4- Protocolos Experimentais

3.4.1- Protocolo para o estresse crônico imprevisível (ECI)

Os animais foram submetidos ao protocolo de ECI, validado pela literatura (Willner *et al.*, 1987; Grippo, Beltz e Johnson, 2003; Zhang *et al.*, 2012), aproximadamente 10 dias antes de completar 80 e 180 dias após o início do tratamento com VCD ou veículo. O teste fundamentou-se na aplicação de diferentes estímulos estressores duas vezes por dia ao longo de dez dias consecutivos (adaptado de Ortiz *et al.*, 1996). Os estímulos estressores realizados foram: imobilização por uma hora, inversão do ciclo circadiano, nado forçado durante 5 minutos sob luz acesa, privação hídrica e alimentar no decorrer de 12 horas e exposição ao frio (4°C) pelo período de uma hora.

A imobilização consistiu em conter o animal em um cilindro de PVC branco por uma hora. O cilindro tinha 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro, com uma das extremidades contendo apenas um orifício para manter a cauda do roedor para fora do tubo, a fim de impedir um grande desconforto ao animal e a outra com mais aberturas para permitir a circulação de ar pelo cilindro.

Para o nado forçado foi utilizado um compartimento de PVC opaco (marrom) com capacidade para 50 L, o qual foi abastecido com água a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), com uma quantidade suficiente para que o animal não conseguisse se apoiar no fundo do recipiente e uma borda alta o bastante para impedir que ele escapasse.

Na exposição ao frio, os animais foram postos em caixas sem maravalha, água e comida e foram isolados no refrigerador durante 60 minutos a uma temperatura de 4 ± 2 °C. Após esse período, os animais foram recolocados em suas caixas e retornaram às condições adequadas de temperatura e alimentação.

Para privação alimentar e hídrica durante o período de 12 horas, os animais permaneceram normalmente no seu ciclo, bem como em temperatura e exaustão adequados. A água e ração foram repostos ao término desse tempo.

Em relação à inversão do ciclo circadiano, os animais foram mantidos em condições ideais de temperatura e exaustão, bem como tiveram acesso à água e ração. O ciclo foi invertido (luz apagada no período que deveria ser claro ou luz acesa no período que deveria ser escuro), submetendo os animais a permanecerem 36 horas com a luz acesa ou apagada.

A tabela a seguir apresenta o protocolo de ECI e a disposição da exposição aos estímulos estressores durante 10 dias consecutivos:

Tabela 1. Protocolo de disposição da aplicação e tipos de estímulos estressores utilizados.

DIA	TIPO DE ESTRESSE	HORÁRIO
1	Imobilização por 60 minutos	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos na luz acesa	Tarde
2	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada no período claro	Noite
3	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 minutos	Tarde
4	Natação forçada por 5 minutos na luz acesa	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde
5	Luz acesa no período escuro	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde
6	Imobilização por 60 minutos	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos na luz acesa	Tarde
7	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada no período claro	Noite
8	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 minutos	Tarde
9	Natação forçada por 5 minutos na luz acesa	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde
10	Luz acesa no período escuro	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde

Os animais expostos ao ECI que foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de reconhecimento de objeto

(TRO) sofreram uma modificação no último dia do protocolo. Este grupo de animais passou por privação hídrica e alimentar pela manhã e imobilização à tarde, a fim de impedir que os outros grupos (controle e nado) sofressem alguma condição de estresse, pois todos se encontravam no mesmo ambiente.

3.4.2- Protocolo para os testes comportamentais

3.4.2.1- Teste do Nado Forçado Repetido Modificado

Os animais foram submetidos a quatro exposições de nado forçado (modificado de Mezdri *et al.*, 2011) com duração de 5 minutos cada sob a luz acesa. Os comportamentos foram registrados por uma câmera digital posicionada 30 cm acima do recipiente. Na análise posterior, foi quantificada a duração, frequência e latência de cada comportamento. Os intervalos entre as sessões foram de 60 horas, nas quais foram intercaladas outros estímulos estressores, conforme o protocolo de ECI (tabela 1).

Os comportamentos investigados foram catalogados como: a) nado, o qual consistia do movimento realizado pela rata com as patas dianteiras horizontalmente deslocando-se ou não pela cuba; b) escalada, caracterizada pelo movimento vertical das patas dianteiras que o animal executa na borda ou no meio do cilindro, com ou sem deslocamento; c) mergulho, determinado quando o animal fica com a cabeça totalmente submersa na água; e d) imobilidade, que fundamentou-se na ausência de movimentos ativos, em que a rata realizava apenas leves movimentos com as patas, necessários para manter a cabeça fora da água. O nado, a escalada e o mergulho consistiram em comportamentos pró-ativos e a imobilidade foi considerada um comportamento passivo.

3.4.2.2- Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Após a aplicação do protocolo de ECI, aproximadamente 80 dias após o início do tratamento com VCD, foi realizado o teste do LCE, no período escuro do animal, a partir das 17 horas. O teste consistiu em apenas uma exposição ao aparato, com duração de 5 minutos, onde o animal pôde explorar livremente todos os compartimentos.

O LCE (figura 1) fundamenta-se em um aparato de madeira elevado a 50 cm do chão que é constituído por dois braços abertos e opostos, medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, envolvido por uma borda com 1 cm de acrílico transparente; e dois braços fechados

em suas três faces externas com vidro fumê de 40 cm de altura, compostos com as mesmas medidas de comprimento e largura dos braços abertos, que os atravessa perpendicularmente, configurando uma cruz simétrica, estabelecendo uma área central de 10 cm². A fonte de iluminação foi ordenada igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto, com quatro lâmpadas fluorescentes cada uma com 15W, a qual proporcionou diferentes níveis de iluminação nos braços abertos (249 lux) e fechados (197 lux), estabelecendo assim um gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados de 52 lux.

Previamente ao teste, o aparato foi limpo com álcool 70% e entre a exposição de cada rata foi utilizado álcool 20% para evitar rastros deixados pelo animal que realizou o teste anteriormente. O teste foi iniciado com a colocação do animal no aparato posicionado com a face virada para um dos braços fechados. Todos os testes foram gravados com uma câmera digital para posterior análise, onde foi quantificado a duração e frequência das variáveis comportamentais espaço-temporais e a frequência das variáveis etológicas.

As variáveis espaço-temporais consistem no percentual de tempo gasto e a frequência de entrada nos braços abertos e braços fechados (Harro, 1993). As variáveis etológicas consistem na avaliação de comportamentos como: a) exploração vertical, que compreende o movimento vertical onde o animal sustenta seu corpo erguido pela patas traseiras; b) autolimpeza, que consiste no movimento em que o animal faz com a língua, dentes ou patas dianteiras para limpar qualquer local sob a superfície do corpo; c) congelamento, determinado como a posição em que o animal fica estagnado; d) imersão de cabeça, caracterizado pelo movimento em que o animal inclina a cabeça/ombros no sentido do chão através da porção lateral dos braços abertos; e) SAP (do inglês, “stretched attend postures”), que compreende o ato em que o animal coloca as patas dianteiras para frente esticando o corpo e retorna para posição inicial (Cruz, Frei e Graeff, 1994; Rodgers *et al.*, 1999).



Figura 1. Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

3.4.2.3- Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO)

No dia seguinte ao teste do LCE, foi conduzida a ambientação de todos os grupos para o TRO, também intitulado de Teste do Campo Aberto (TCA). Cada animal foi colocado no centro de uma caixa preta (1 m de comprimento x 50 cm largura x 50 cm altura), permanecendo em livre exploração durante 10 minutos, para habituação ao ambiente novo, sob luz vermelha, no período escuro dos animais (entre 8 e 12 h). A luz vermelha foi equiparada utilizando o luxímetro digital Lux Meter (MLM-1011) da marca Iminipa, para que toda a caixa estivesse sob a mesma intensidade de luz. A exploração ao ambiente novo foi mensurada pela ambulação geral correlacionada com outras atividades como a autolimpeza, elevação sob as patas traseiras, imobilidade, permanência e passagem pelo centro (Matsubara, K.; Matsushita, 1982; File, 1973).

Aproximadamente 24 horas após a adaptação, os animais foram expostos ao TRO, no qual foi realizado um protocolo modificado de An-li Wang, *et al.*, 2010. O TRO consistiu em três exposições de 5 minutos cada, que teve um intervalo de uma hora entre cada exposição (figura 2). Na primeira exposição, foram colocados quatro objetos de plásticos, organizados da mesma forma em todas as sessões. Após o período de uma hora ocorreu a 2ª exposição, onde foram posicionados quatro objetos de porcelana, de acordo com a figura 2. Após mais uma hora foi realizada a 3ª exposição, na qual um objeto de plástico foi mantido na sua posição original e outro objeto de plástico em uma posição alterada. A mesma ordenação foi feita para os objetos de porcelana: um na posição original e outro em posição alterada. Todos os testes foram gravados com uma

câmera digital e analisados posteriormente. Nesta análise foi quantificada o tempo em que o animal permaneceu explorando cada objeto.

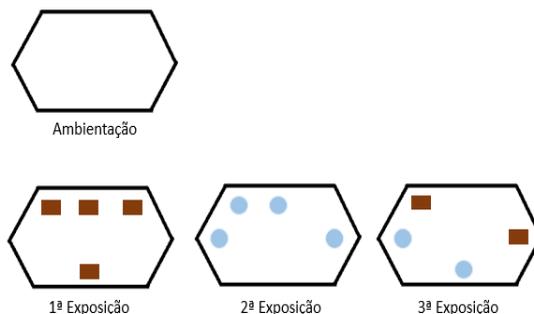


Figura 2. Esquema representativo do teste de reconhecimento de objeto.

A investigação de um objeto foi determinada quando o animal cheirava ou explorava o objeto. Passar ao lado ou em cima dos objetos não foi considerado como investigação do mesmo. O comportamento exploratório dos animais foi quantificado através do índice de reconhecimento (IR), o qual demonstra a memória do animal para o objeto familiar em relação ao objeto novo (Antunes e Biala, 2012). Os objetos de plásticos foram designados como “objeto familiar”, pois foram apresentados primeiramente aos animais. Como os objetos de porcelanas foram apresentados na 2ª exposição foram chamados de “objeto novo”. Segundo Piterkin *et al.* (2008) e Schindler *et al.* (2010), o IR pode ser representado pelo tempo gasto investigando o objeto em posição alterada dividido pelo tempo gasto explorando o objeto em posição alterada + o tempo gasto investigando o objeto em posição original. Dessa maneira pode-se determinar o IR dos objetos de plástico (objeto familiar) e dos objetos de porcelana (objeto novo).

3.5- Eutanásia e perfusão dos animais

No dia seguinte ao TRO, os animais foram pesados em uma balança e em seguida, anestesiados com uretana (1.3 g/ kg, i.p.), utilizada por ser estável com duração perdurável e pouca intervenção aos sistemas fisiológicos (Zheng e Zhang, 2013). Após, foram testados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital a fim de verificar a eficácia da anestesia.

Com o animal sedado, a coleta de sangue foi feita por punção intracardíaca e foi realizada uma incisão longitudinal mediana na pele e musculatura desde a região pré-pubiana até o manúbrio com o objetivo de realizar a perfusão através do sistema circulatório e a coleta de órgãos. O sangue foi centrifugado a 400G e o plasma armazenado a -20°C.

Para realizar a perfusão intracardíaca, o diafragma foi perfurado e as costelas foram cortadas, a fim de expor o coração. Foi realizada uma pequena secção no átrio direito e uma agulha foi colocada no ventrículo esquerdo para permitir a passagem das soluções. Cada animal foi perfundido com 200 ml de sacarose (9,25%) heparinizada, quantidade suficiente para retirar o sangue dos tecidos do animal, mantendo a integridade das células; seguida de 200 ml de paraformaldeído à 4% dissolvido em PBS (0,1 M).

Para os grupos expostos somente ao ECI, após a perfusão, com auxílio de pinça e tesoura, foram removidos os ovários, glândulas adrenais e coração. A fim de retirar o encéfalo, utilizando-se uma tesoura, o pescoço do animal foi cortado e o crânio foi aberto; e com o auxílio de pinça e espátula o encéfalo foi removido. Nos demais grupos apenas os ovários e cérebro foram retirados.

Em seguida, os órgãos foram pesados e fixados em PFA 4%, exceto o encéfalo, o qual permaneceu 24 h em PFA 4% e então foi colocado em uma solução de sacarose 30% e mantido sob refrigeração (4° C) durante uma semana. Passado este período, os cérebros foram congelados com nitrogênio líquido e conservados a -80°C a fim de serem utilizados em estudos posteriores.

3.6- Massa Relativa dos ovários e massa corporal dos animais

A massa relativa dos ovários foi determinada por meio da soma da massa dos ovários direito e esquerdo dividido por dois, logo após sendo dividida pela massa corporal do animal e em seguida, multiplicado por 100.

Para o cálculo da massa relativa dos ovários e demarcação da massa corporal foram utilizados os animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo que foram expostos ao LCE e TRO e os animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo expostos ao ECI.

3.7- Análise dos vídeos comportamentais

Os vídeos dos testes foram gravados por meio de uma câmera digital através do programa Virtual Dub e posteriormente analisados pelo software de análise comportamental EthoWatcher desenvolvido pelo Laboratório de Neurofisiologia Comparada da UFSC (Crispim Junior *et al.*, 2012). O software permitiu a criação prática de um catálogo comportamental com as categorias que foram avaliadas, bem como a quantificação da duração, frequência e latência dos comportamentos. A duração foi estipulada pelo tempo gasto realizando determinado comportamento, a frequência consistiu no número de vezes que a rata executou um evento de determinado comportamento e a latência foi definida como o tempo entre o começo do teste e o primeiro episódio de dado comportamento. A gravação e análise dos vídeos foi realizada pelo próprio pesquisador, não sendo este um estudo cego.

3.8- Dosagem Hormonal

As amostras de plasma para a dosagem de progesterona foram encaminhadas para a Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, e dosadas por radioimunoensaio (RIA) de duplo anticorpo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP, de acordo com o protocolo utilizado em Reis *et al.*, (2014). O ensaio foi feito por meio da utilização de um kit específico da MP Biomedicals (MP Biomedicals; Orangeburg-NY, USA). Para a detecção de progesterona foi estabelecido o menor limite de 0,02 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5%. Todas as amostras foram dosadas em duplicata e no mesmo ensaio, para evitar variações inter-ensaios.

A técnica de quimioluminescência foi utilizada para determinar as dosagens de estradiol por uma empresa terceirizada especializada em dosagens hormonais em animais (Citovet Lab., Florianópolis, SC, Brasil). Os resultados foram apresentados em pg/mL.

3.9- Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Graph-Pad Prisma. A simetria dos dados foi testada aplicando-se o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. Considerando-se 95% de confiabilidade, os pontos que se encontravam fora de um intervalo da média para mais ou para menos (intervalo definido pelo desvio padrão x 2) foram considerados “outliers”, e retirados das análises. Os dados comportamentais do teste do nado forçado repetido modificado com e sem exposição concomitante ao ECI foram analisados pelo teste T de

Student, quando apresentaram distribuição normal, ou Mann-Whitney, quando não apresentaram distribuição normal, para comparação de 2 grupos. As comparações entre as quatro sessões do teste do nado forçado repetido modificado com e sem exposição concomitante ao ECI foram avaliadas por meio do teste ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey para os grupos que apresentaram distribuição normal; para os grupos que não tiveram distribuição normal foi aplicado teste de Friedman, seguido do pós teste de Dunn.

Para o teste do LCE, TCA e o TRO foi realizado o teste ANOVA de duas vias, o qual teve como fatores o tratamento (VCD/óleo) e o estresse (ECI ou nado forçado), seguido do pós teste de Tukey.

Para a dosagem hormonal foi utilizado o teste Mann-Whitney devido a diferença apresentada na distribuição dos grupos analisados. Os dados encontram-se como média \pm erro padrão da média e o nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

4.1- Animais 80 dias após tratamento com VCD (perimenopausa)

4.1.1- Efeito do estresse sobre a massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários

A massa corporal e a massa relativa dos ovários das ratas com 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo foi mensurada. Não houve efeito de nenhum dos fatores (tipo de estresse ou tratamento com VCD) sobre a massa corporal (figura 3A), bem como sobre a massa relativa dos ovários dos animais (figura 3B).

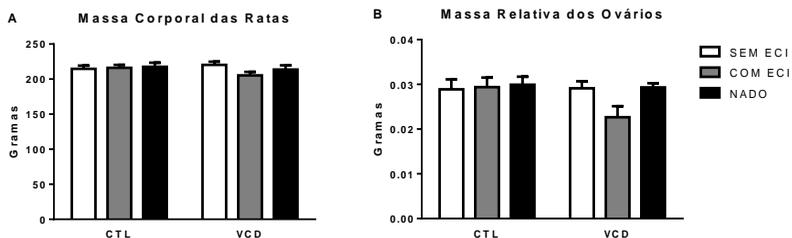


Figura 3. Massa corporal dos animais (A) e massa relativa dos ovários (B) com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two way ANOVA, não significante.

4.1.2-Teste do Nado Forçado repetido modificado aplicado durante o ECI

O comportamento de imobilidade foi analisado nas quatro sessões de teste. Entre estas sessões foram aplicados outros tipos de estresse, como descrito anteriormente. As ratas tratadas com VCD apresentaram o comportamento de imobilidade com duração similar às ratas CTL ao longo das 4 exposições realizadas (teste 1 – 4) (figura 4).

Ao comparar a progressão dos testes (figura 4) foi observado um aumento significativo na duração da imobilidade no grupo VCD ($p=0,0090$) entre os testes 1 vs 4 (teste 1: $118,6\pm 46,47$ vs teste 4: $168,9\pm 64,82$) e 2 vs 4 (teste 2: $116,1\pm 73,89$ vs teste 4: $168,9\pm 64,82$), bem como no grupo CTL ($p= 0,0124$) na análise dos testes 3 vs 4 (teste 3: $96,28\pm 35,37$ vs teste 4: $167,7\pm 55,72$).

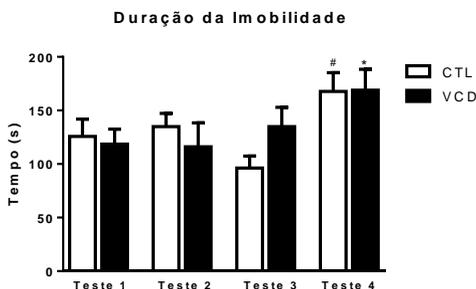


Figura 4. Duração da imobilidade dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. #: CTL teste 4 vs 3; *: VCD teste 4 vs 2, VCD teste 4 vs 1.

Em relação a frequência e latência da imobilidade não houve diferença significativa entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas (teste 1 – 4) e durante a progressão dos testes (resultados não mostrados).

Em relação ao comportamento de escalada não foi observada diferença entre os grupos VCD e CTL ao ser averiguada a duração deste comportamento ao longo das 4 exposições. Porém, quando examinada a progressão dos testes, o grupo VCD apresentou duração significativamente menor ($p=0,0614$) no teste 4 ($108,4 \pm 61,99$) comparado ao teste 2 ($151,7 \pm 70,30$) (figura 5).

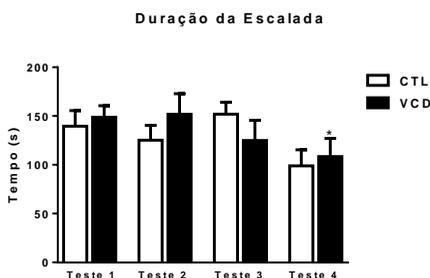


Figura 5. Duração da escalada dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD testes 4 vs 2.

A frequência da escalada (figura 6), ao longo das 4 exposições, foi significativamente menor nas ratas com falha ovariana durante o teste 3 ($p=0,0377$; $6,818 \pm 2,136$). Com relação à latência da escalada, não houve diferença entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas (teste 1 – 4) e durante a progressão dos testes (resultados não mostrados).

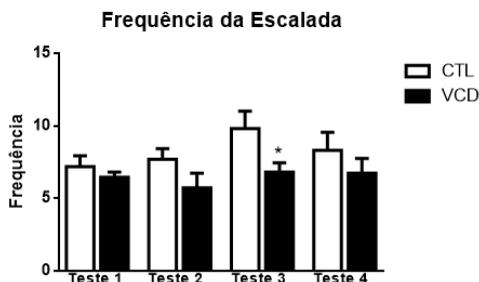


Figura 6. Frequência da escalada dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL.

Na duração do comportamento de nado não foram observadas diferenças comparando-se os grupos VCD e CTL em cada um dos 4 testes ou durante a progressão dos testes para cada grupo (figura 7).

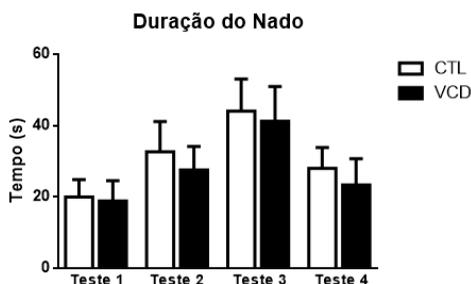


Figura 7. Duração do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, não significante.

Já com relação à frequência do nado, não foi observada diferença entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas. Entretanto, foi observado um aumento ao longo da progressão dos testes no grupo CTL ($p=0,0439$, teste 1: $2,600\pm 1,430$ vs teste 3: $6,300\pm 3,802$) (figura 8), revelando um aumento do comportamento pró-ativo nestes animais.

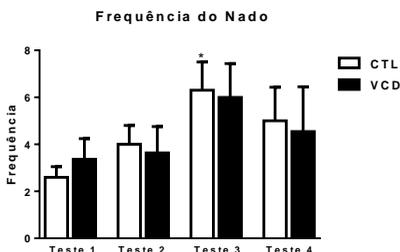


Figura 8. Frequência do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: CTL testes 3 vs 1.

Com relação à latência do nado, o grupo VCD exibiu maior latência ($p=0,0441$; $133,3\pm 90,55$) no teste 2 comparado ao grupo CTL. Além disso, na progressão dos testes observou-se que o grupo VCD apresentou latência significativamente maior no teste 2 ($133,3\pm 90,55$) comparado ao teste 1 ($99,28\pm 116,1$), ($p=0,0197$ - figura 9).

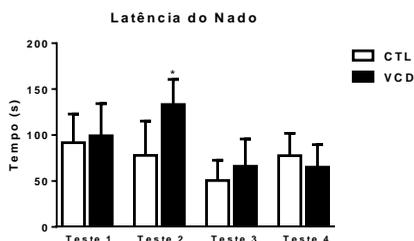


Figura 4. Latência do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL; VCD testes 2 vs 1.

Em relação ao mergulho, o grupo VCD reduziu a duração deste comportamento no teste 3 ($p= 0,0365$; $0,5364\pm 1,058$) e teste 4 ($p= 0,0035$; $0,3545\pm 1,176$) na comparação com o CTL (figura 10A). O mesmo ocorreu com relação à frequência do mergulho no teste 3 ($p= 0,0473$; $0,3636\pm 0,6742$) e teste 4 ($p= 0,0043$; $0,1818\pm 0,6030$) (figura 10B). Além de diminuir tanto a duração ($p= 0,0003$) quanto à frequência ($p= 0,0003$) nos testes 3 e 4 quando comparado com o teste 1 (duração: $5,845\pm 9,061$; frequência: $4,636\pm 4,388$) na progressão dos testes, demonstrando redução do comportamento pró-ativo (figura 10A e 10B respectivamente).

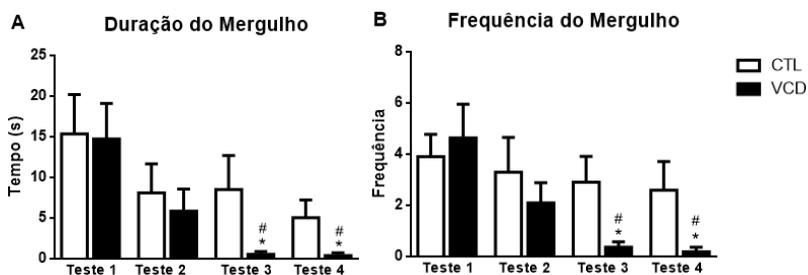


Figura 50. Duração (A) e frequência (B) do mergulho dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. #: VCD testes 3 e 4 vs teste 1. *: VCD vs CTL

O grupo VCD apresentou maior latência para o mergulho no teste 1 ($p= 0,0144$; $108,0\pm 120,7$) e teste 4 ($p= 0,0100$; $279,2\pm 68,93$) em comparação ao grupo CTL. Porém, durante a progressão dos testes, tanto o grupo VCD ($p= 0,0041$) como o CTL ($p= 0,0405$) apresentaram maior latência no teste 4 (VCD: $279,2\pm 68,93$; CTL: $170,9\pm 103,8$) comparado ao teste 1 (VCD: $108,0\pm 120,7$; CTL: $39,15\pm 11,24$) (figura 11).

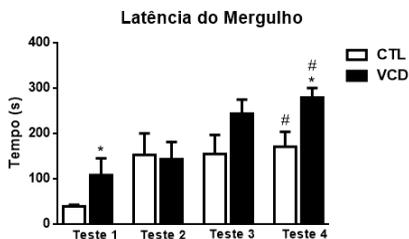


Figura 11. Latência do mergulho dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 11; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. #: VCD teste 4 vs 1; CTL teste 4 vs 1. *: VCD vs CTL.

4.1.3-Teste do Nado Forçado repetido modificado sem exposição concomitante ao ECI

No comportamento de imobilidade não foi observada diferença na duração, frequência ou latência na comparação entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas, bem como na progressão dos testes (figura 12).

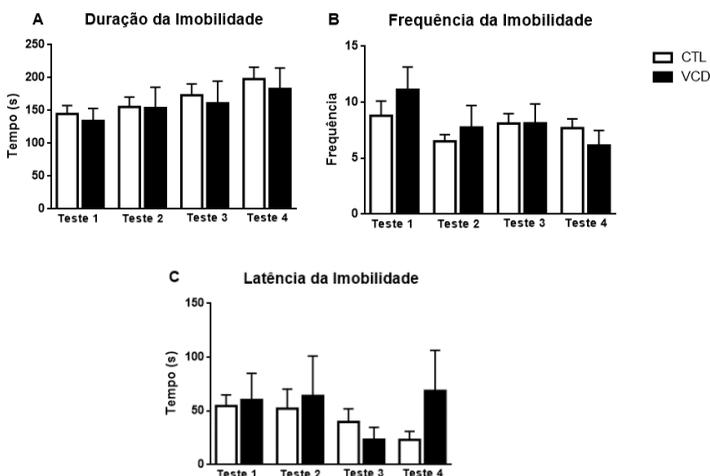


Figura 12. Duração (A), frequência (B) e latência (C) da imobilidade dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 8; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, não significativa.

No que diz respeito à duração, frequência e latência da escalada não foi constatada diferença entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições feitas. Porém, quando analisada a progressão dos testes, foi observado aumento na duração da escalada para o grupo CTL ($p=0,0034$) no teste 4 ($101,6\pm 57,36$) comparado com os testes 1 ($130,2\pm 33,08$), 2 ($137,8\pm 44,94$) e 3 ($120,3\pm 52,39$) (figura 13A). Na frequência da escalada não houve diferença entre os grupos VCD e CTL e nem na progressão dos testes (figura 13B). Em relação à latência, não foi observada diferença entre os grupo VCD e CTL. Já na progressão dos testes, o grupo VCD apresentou maior latência da escalada ($p= 0,0503$) no teste 4 ($2,320\pm 2,297$) na comparação com o primeiro teste ($3,060\pm 6,835$) (figura 13C).

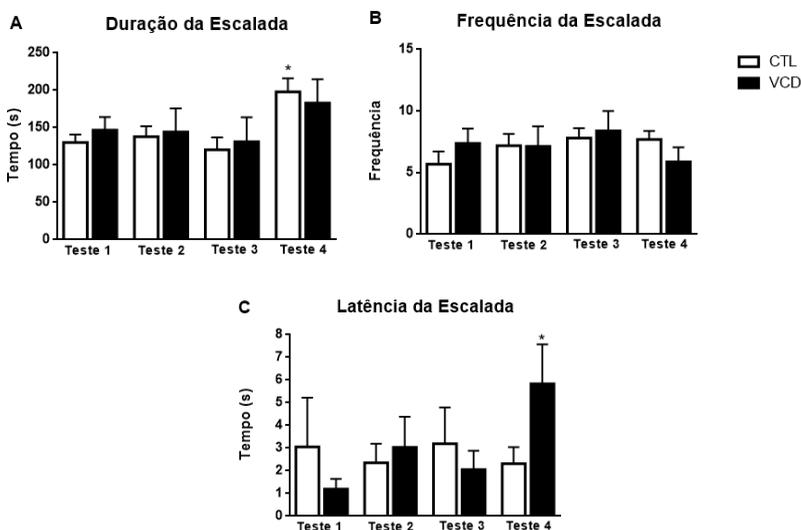


Figura 13. Duração (A), frequência (B) e latência (C) da escalada dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 8; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. * duração: CTL testes 4 vs 1. * latência: VCD testes 4 vs 1.

Ao ser analisado o comportamento de nado, o grupo VCD reduziu ($p= 0,0068$) a duração do comportamento no teste 1 ($0,2750\pm 0,7778$). Não foram observadas diferenças nos testes 2 e 3. Entretanto, no teste 4 ($4,925\pm 6,175$), o grupo VCD apresentou maior duração ($p= 0,0015$) do comportamento (figura 14A).

Em relação à frequência deste comportamento, o grupo VCD apresentou menor frequência ($p= 0,0084$) no teste 1 ($0,1250\pm 0,3536$) comparado com o grupo CTL. Não houve diferença nos testes 2 e 3. No entanto, no teste 4 ($1,500\pm 1,414$), o grupo VCD realizou maior número de vezes ($p= 0,0038$) o comportamento de nado do que o grupo CTL (figura 14B).

Na progressão dos testes, o grupo VCD exibiu aumento ($p= 0,0142$) da duração do nado no quarto teste ($4,925\pm 6,175$) quando comparado com os testes 1 ($0,2750\pm 0,7778$), 2 ($0,1000\pm 0,2828$) e 3 ($5,963\pm 8,389$) e o grupo CTL demonstrou redução ($p= 0,0332$) do tempo do nado no quarto teste ($0,0\pm 0,0$) em relação ao primeiro ($6,640\pm 10,90$) (figura 14A). Além disso, também na progressão dos testes, o grupo VCD apresentou maior frequência ($p=0,0248$) no teste quatro ($1,500\pm 1,414$) comparado com os testes 3 ($1,000\pm 1,195$), 2 ($0,1250\pm 0,3536$) e 1 ($0,1250\pm 0,3536$). O grupo CTL exibiu menor frequência ($p=0,0084$) do nado no teste quatro ($0,0\pm 0,0$) comparado com o teste 1 ($1,600\pm 1,776$) (figura 14B).

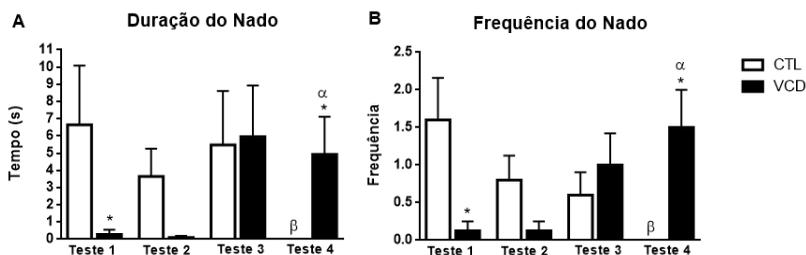


Figura 14. Duração (A) e frequência (B) do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 8; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. α : VCD testes 4 vs 3, 2 e 1. β : CTL teste 4 vs 1. *: VCD vs CTL

Na latência do nado, o grupo VCD retardou ($p=0,0070$) para realizar o comportamento no teste 1 ($266,0\pm 96,13$) e antecipou ($p=0,0013$) a efetuação do comportamento no teste 4 ($144,8\pm 126,7$) comparado com o grupo CTL. Na progressão dos testes, o grupo CTL retardou ($p=0,0036$) para efetuar o comportamento no teste 4 ($0,0\pm 0,0$) em comparação com o teste 1 ($103,6\pm 119,0$) (figura 15).

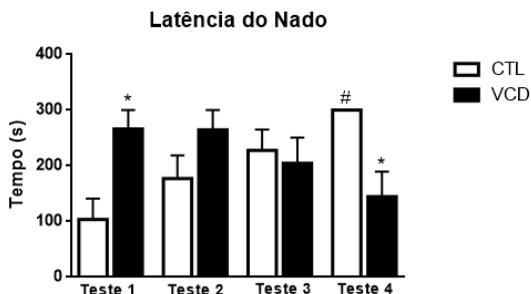


Figura 15. Latência do nado dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 8; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. #: CTL teste 4 vs 1. *: VCD vs CTL.

Em relação ao mergulho, ambos os grupos expressaram o comportamento de maneira similar, sem apresentar diferença entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas, reduzindo sua atividade conforme foi ocorrendo a progressão dos testes. O grupo VCD reduziu o tempo de mergulho ($p=0,0004$) nos testes 2 ($1,425 \pm 1,760$), 3 ($1,138 \pm 1,702$) e 4 ($1,025 \pm 1,863$) comparado com o teste 1 ($13,19 \pm 6,439$) (figura 16A), além de ter diminuído a frequência do comportamento ($p=0,0011$) nos testes 3 ($1,125 \pm 1,727$) e 4 ($0,6250 \pm 1,061$) comparado com o teste 1 ($7,375 \pm 4,658$) (figura 16B). O grupo CTL também apresentou redução do tempo de mergulho ($p=0,0010$) nos testes 3 ($0,5200 \pm 1,213$) e 4 ($0,1800 \pm 0,4050$) em relação ao teste 1 ($12,83 \pm 11,92$) (figura 16A), bem como diminuiu a frequência ($p=0,0014$) nos testes 3 ($0,6000 \pm 1,350$) e 4 ($0,2000 \pm 0,4216$) comparado com o primeiro teste ($5,300 \pm 3,945$) (figura 16B). Não houve diferença com relação à latência do mergulho entre os grupos VCD e CTL ao longo das 4 exposições realizadas, bem como na progressão dos testes (resultado não mostrado).

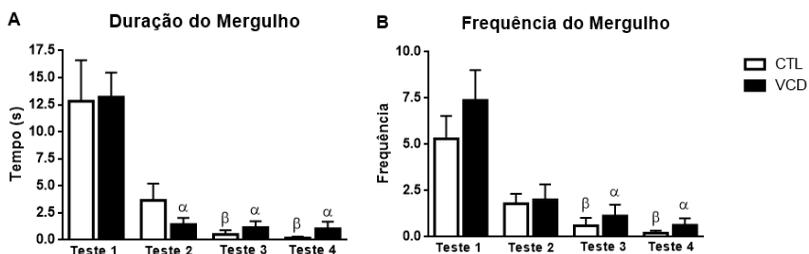


Figura 16. Duração (A) e frequência (B) do mergulho dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 8; N (CTL)= 10. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. α : VCD testes 1 vs 2, 3 e 4. β : CTL testes 1 vs 3 e 4.

4.2- Animais 180 dias após tratamento com VCD (menopausa)

4.2.1- Efeito do estresse sobre a massa corporal dos animais e massa relativa dos ovários

Não foram observadas diferenças significantes entre as ratas CTL e tratadas com VCD após exposição ao ECI no que diz respeito à massa corporal (Figura 17A). Já em relação à massa relativa dos ovários, as ratas com falha ovariana apresentaram um redução após exposição ao ECI (Figura 17B).

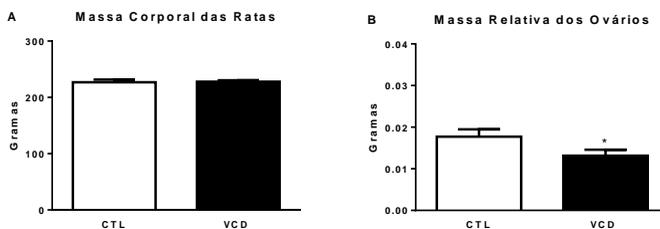


Figura 176. Massa corporal dos animais (A) e massa relativa dos ovários (B) com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 12; N (CTL)= 16. Teste-T ou Mann-Whitney, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL.

4.2.2- Teste do Nado Forçado repetido modificado aplicado durante o ECI

A progressão da falha ovariana apresentada com 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo resultou em dados diferentes comparando-se com as ratas com 80 dias pós tratamento. O grupo VCD com 180 dias aumentou o tempo de imobilidade ($p=0,0482$) no teste 2 ($145,8\pm55,76$) comparado com o CTL e no teste 4 ($158,6\pm74,51$) em relação ao 1º teste ($114,1\pm53,39$) na progressão dos testes ($p=0,0139$). Já o grupo CTL não apresentou alterações na duração da imobilidade ao longo da progressão dos testes (figura 18).

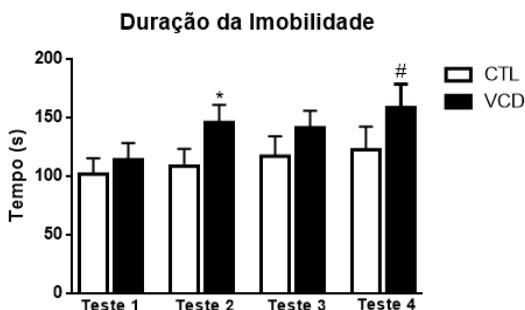


Figura 7. Duração da imobilidade dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL. #: VCD teste 4 vs 1.

Com relação à frequência de imobilidade, o grupo VCD apresentou um aumento ($p=0,0330$) no teste 3 ($8,786\pm3,641$) quando comparado com o CTL e na progressão dos testes, não foi observada diferença tanto para o grupo VCD quanto para o grupo CTL (figura 19).

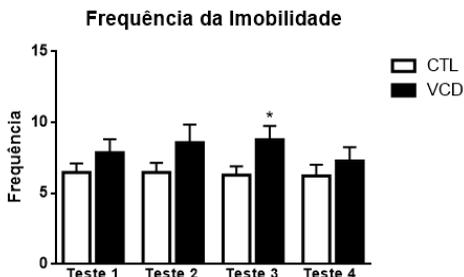


Figura 19. Frequência da imobilidade dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL.

Em relação à latência, não houve diferença entre os grupos VCD e CTL. No grupo CTL foi observada uma redução da latência da imobilidade ($p=0,0095$) nos testes 3 ($47,99 \pm 71,16$) e 4 ($50,19 \pm 76,25$) em comparação ao primeiro ($71,79 \pm 50,27$) ao ser analisada a progressão dos testes (figura 20).

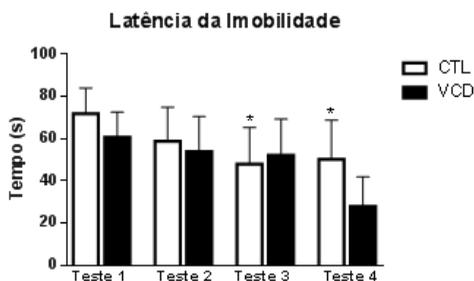


Figura 20. Latência da imobilidade dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: CTL testes 3 e 4 vs 1.

Em relação ao comportamento de escalada não foram observadas diferenças entre animais tratados com VCD e CTL, tanto na duração como na frequência e latência. O mesmo ocorreu quando foi analisada a progressão ao longo dos quatro testes (figura 21).

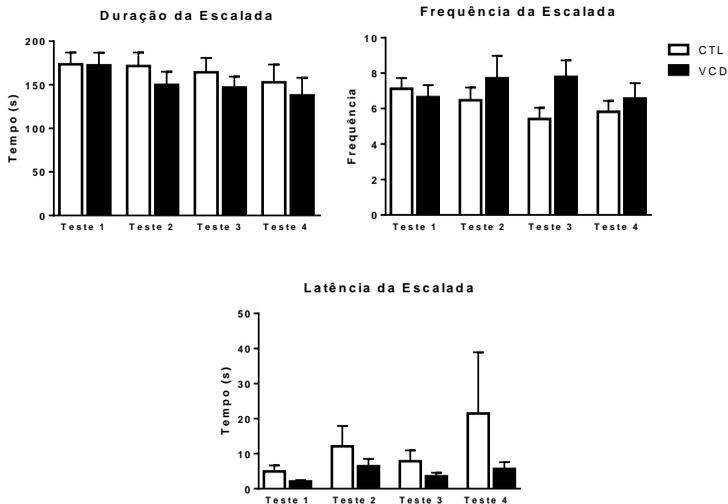


Figura 8. Duração, frequência e latência da escalada dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, não significante.

No comportamento de nado, o grupo VCD apresentou redução da duração do comportamento nos testes 2 ($p= 0,0045$, $1,450\pm 2,036$), 3 ($p=0,0020$, $1,929\pm 3,485$) e 4 ($p= 0,0007$, $2,264\pm 3,673$) comparado com o grupo CTL. O grupo CTL exibiu um aumento significativo na duração do comportamento ($p=0,0082$) no teste 4 ($22,15\pm 28,82$) em relação com o primeiro ($6,647\pm 11,15$) na progressão dos testes (figura 23). Na frequência do nado, o grupo VCD exibiu redução ao ser comparado com o CTL nos testes 2 ($p= 0,0095$, $0,8571\pm 1,099$), 3 ($p=0,0067$, $0,6000\pm 1,121$) e 4 ($p= 0,0005$, $0,6667\pm 1,175$) (figura 24); além de este grupo ter apresentado aumento da latência nos testes 2 ($p= 0,0033$, $235,2\pm 91,53$), 3 ($p= 0,0011$, $274,9\pm 112,7$) e 4 ($p= 0,0042$, $228,9\pm 105,7$) em relação ao CTL (figura 25). A respeito da progressão dos testes, não houve diferença tanto na frequência quanto na latência deste comportamento (figuras 24 e 25 respectivamente).

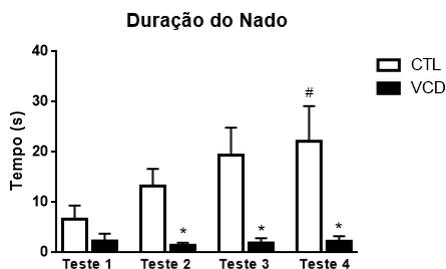


Figura 9. Duração do nado dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL. #: VCD teste 4 vs 1.

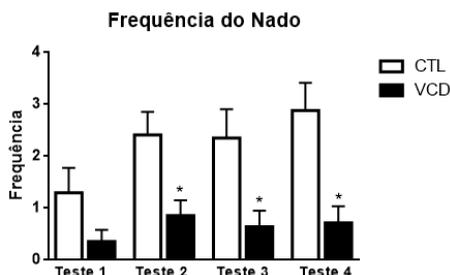


Figura 24. Frequência do nado dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL.

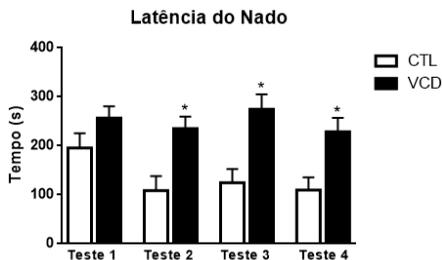


Figura 25. Frequência do nado dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. *: VCD vs CTL.

Com relação ao mergulho, os grupos apresentaram comportamento semelhante na progressão dos testes, apresentando redução na duração nos testes 3 (VCD: $p = 0,0002$; $1,307 \pm 2,771$; CTL: $p < 0,0001$; $1,300 \pm 2,548$) e 4 (VCD: $0,07143 \pm 0,2673$; CTL: $1,224 \pm 3,569$) comparado com o primeiro teste (VCD: $9,493 \pm 8,527$; CTL: $16,62 \pm 14,19$) (Figura 26A).

O grupo VCD reduziu a frequência deste comportamento no teste 4 ($0,07143 \pm 0,2673$) comparado com o primeiro teste ($p = 0,0013$; $2,929 \pm 2,674$), similar ao grupo CTL que também exibiu redução da frequência do mergulho; nos testes 3 ($0,4118 \pm 0,8703$) e 4 ($0,6471 \pm 1,618$) comparado com o primeiro teste ($p < 0,0001$; $3,824 \pm 2,481$) (Figura 26B).

Em relação a latência, ambos os grupos exibiram maior latência para o mergulho (VCD: $p = 0,0038$; CTL: $p = 0,0001$) na progressão dos testes. O grupo VCD demonstrou maior latência do mergulho no teste 4 ($295,7 \pm 16,28$) comparado com o primeiro teste ($127,6 \pm 104,9$) e o grupo CTL apresentou maior latência do mergulho nos testes 3 ($265,5 \pm 82,38$) e 4 ($249,7 \pm 111,9$) comparado com o primeiro teste ($88,82 \pm 110,1$) (Figura 36C).

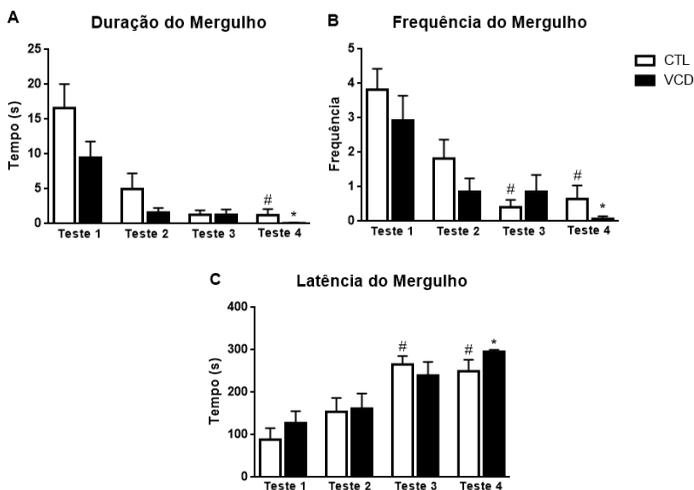


Figura 10. Duração (A), frequência (B) e latência (C) do mergulho dos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD)= 14; N (CTL)= 17. One-way ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$. * duração: VCD testes 1 vs 4. # duração: CTL testes 1 vs 4. * frequência: VCD testes 1 vs 4. # frequência: CTL testes 1 vs 3 e 4. * latência: VCD testes 1 vs 4. # latência: CTL testes 1 vs 3 e 4.

4.3-Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em ratas 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa)

Quando foi quantificada a permanência dos animais nos braços abertos, verificou-se que houve efeito significativo tanto do estresse ($p=0,0082$; $F=5,26$) quanto do tratamento com VCD ($p=0,011$; $F=6,92$) (Figura. 27), sem interação significativa entre os fatores. Estes resultados mostram que, nos animais controle, o estresse do nado forçado repetido modificou reduziu a permanência nos braços abertos, o que não ocorreu nos animais tratados com VCD, onde mesmo sem a exposição ao ECI (grupo sem ECI), o percentual de tempo de permanência nos braços abertos já é reduzido, por efeito do próprio VCD. .

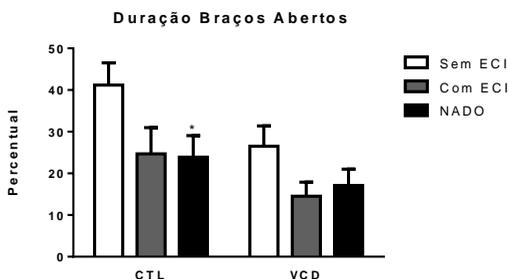


Figura 27. Duração dos braços abertos no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. *: CTL nado vs CTL sem ECI.

Com relação à permanência nos braços fechados, não houve interação entre o tratamento com VCD e o estresse. Porém, foi observado efeito significativo tanto do fator tratamento com VCD ($p=0,0078$, $F= 7,6$) quanto do fator “tipo de estresse” ($p= 0,0009$, $F= 8$). Tanto os animais CTL ($36,40 \pm 17,93$) como os tratados com VCD ($54,10 \pm 23,29$) exibiram aumento no percentual de tempo nos braços fechados quando submetidos ao ECI. Além disso, os animais CTL submetidos ao nado forçado repetido modificou aumentaram o tempo nos braços fechados quando comparado com o grupo que não foi exposto a nenhum tipo de estresse ($60,10 \pm 18,73$). Esses últimos resultados não foram encontrados nos animais com falha ovariana (figura 28).

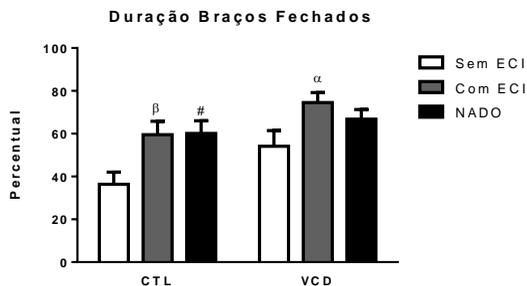


Figura 11. Duração dos braços fechados no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média ± EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. α : VCD sem ECI vs VCD com ECI. β : CTL sem ECI vs CTL com ECI. #: CTL nado vs CTL sem ECI.

Os resultados demonstraram que não houve interação entre o tratamento com VCD e o estresse em relação ao tempo em que os animais permaneceram no centro do LEC. Apesar disso, houve diferença significativa do fator “tipo de estresse”, revelando que as ratas com falha ovariana apresentaram redução da permanência no centro ($p=0,0029$, $F=6,5$; $19,50 \pm 9,407$) quando expostas previamente ao ECI, o que não ocorreu nas ratas controle (figura 29).

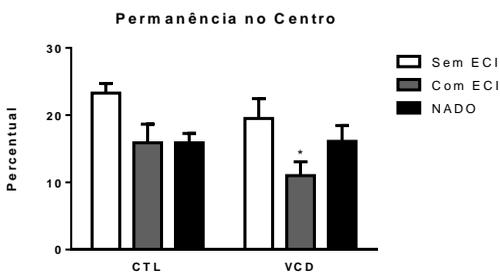


Figura 29. Permanência no centro do LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média ± EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. *: VCD com ECI vs VCD sem ECI.

Não foi observada interação entre o tratamento com VCD e o estresse ao ser analisada a frequência de entrada nos braços abertos, fechados e centro. Porém, houve efeito significativo do “tipo de estresse”, onde os animais CTL expostos ao ECI apresentaram redução da frequência de entrada nos braços

abertos ($p=0,0236$, $F=4$; $8,900\pm 4,677$), revelando aumento da ansiedade (figura 30).

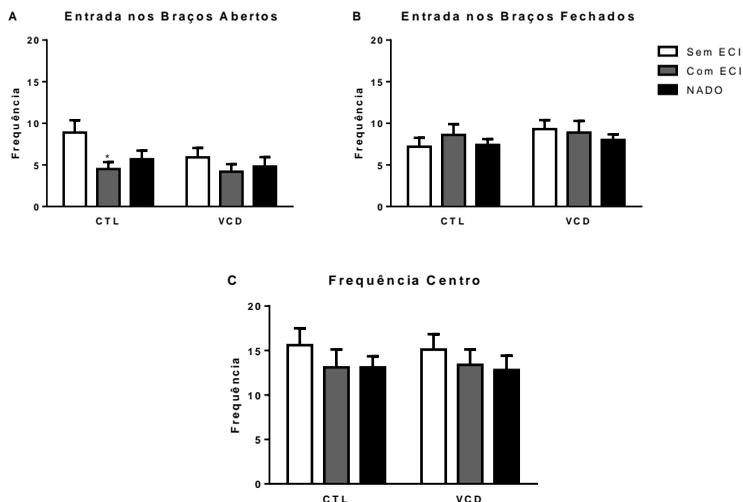


Figura 30. Frequência de entrada nos braços abertos (A), braços fechados (B) e centro (C) no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. *: CTL com ECI vs CTL sem ECI.

Em relação à frequência do comportamento de imersão de cabeça, os animais CTL expostos ao ECI ($1,500\pm 1,354$) e ao nado forçado repetido modificado ($2,700\pm 2,111$) exibiram redução significativa ($p=0,0024$, $F=6,8$) quando comparados com os animais CTL não submetidos ao ECI ($6,800\pm 5,692$), indicando aumento do comportamento ansioso. Este efeito não ocorreu nos animais com falha ovariana, apesar da interação entre o tratamento com VCD e o tipo de estresse ter ficado muito próximo do nível de significância ($p=0,0566$, $F= 3$) (Figura 31).

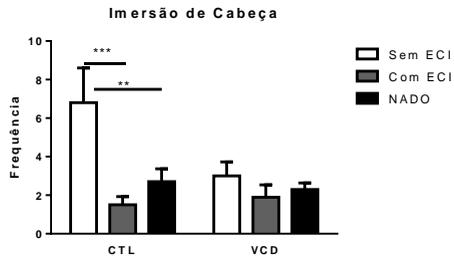


Figura 31. Frequência da imersão de cabeça no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

Em relação às outras variáveis etológicas como congelamento, stretched attend postures (SAP), autolimpeza e exploração vertical não houve efeito significativo de nenhum dos fatores analisados (tratamento com VCD e “tipo de estresse”), bem como interação entre eles (Figura 32).

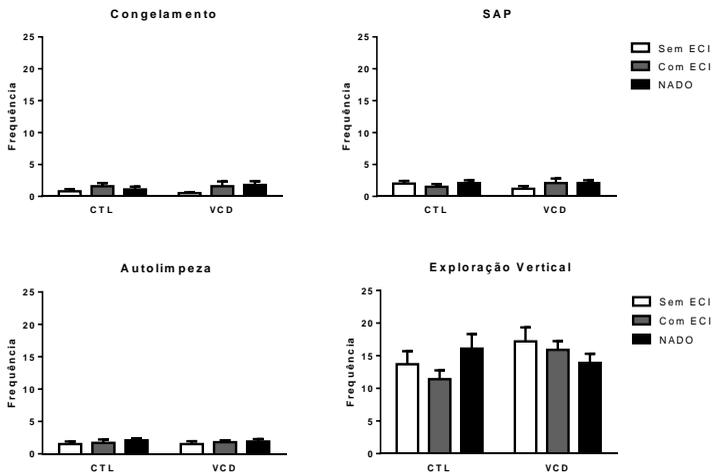


Figura 12. Frequência do congelamento, SAP, autolimpeza e exploração vertical no LCE dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

4.4- Teste do Campo Aberto em ratas com 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa)

Com relação a ambulação dos animais no campo aberto (Figura 33) e ao comportamento de imobilidade (Figura 34A e 34B), não foi observado efeito significativo de nenhum dos fatores analisados, bem como interação entre eles.

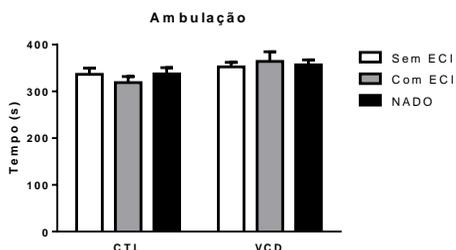


Figura 33. Ambulação dos animais no Campo Aberto com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

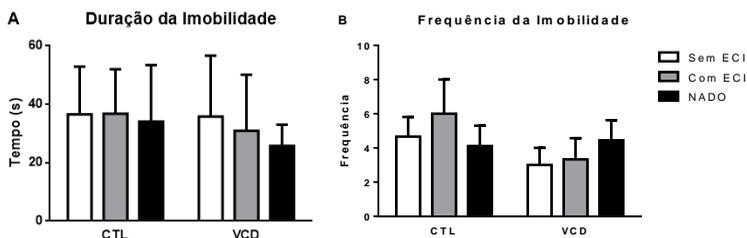


Figura 13. Duração (A) e frequência (B) da imobilidade durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

Não houve interação entre os fatores tratamento com VCD e “tipo de estresse” ao ser analisado o comportamento de exploração vertical. Porém foi observado efeito significativo do tratamento com VCD tanto na duração ($p=0,0410$, $F=4,4$) quanto na frequência ($p=0,0342$, $F=4,8$) (figura 35A e 35B respectivamente).

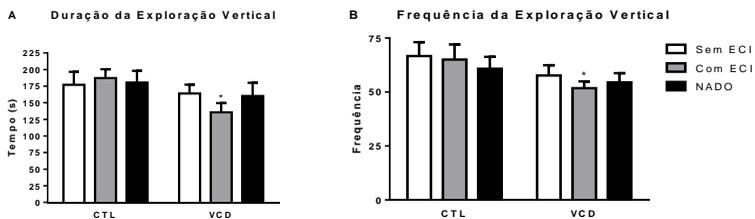


Figura 35. Duração (A) e frequência (B) do comportamento de exploração vertical durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. *: VCD com ECI vs VCD sem ECI.

Houve interação entre os fatores ao ser analisado a duração do comportamento de autolimpeza ($p=0,0491$, $F=3,2$). O grupo VCD exposto ao ECI realizou este comportamento por mais tempo ($13,92 \pm 11,12$ comparado com o grupo VCD não exposto ao ECI (figura 36A). Em relação à frequência da autolimpeza não houve efeito significativo tanto do estresse quanto do tratamento com VCD, bem como a interação entre os fatores analisados (figura 36B).

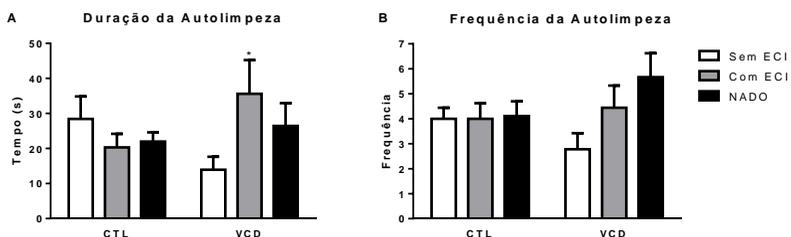


Figura 14. Duração (A) e frequência (B) da autolimpeza durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$. *: VCD com ECI vs VCD sem ECI.

Com relação ao tempo de permanência no centro do campo aberto, não houve efeito significativo de nenhum dos fatores analisados, bem como interação entre eles (figura 47).

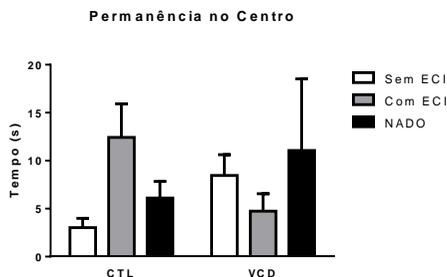


Figura 15. Permanência no centro durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

Houve interação entre os fatores tratamento com VCD e “tipo de estresse” ao ser analisada a frequência da passagem no centro ($p=0,0138$, $F=4,7$). O grupo CTL exposto ao ECI exibiu maior frequência de passagens no centro do que o grupo CTL não submetido ao ECI, o que não ocorreu no grupo tratado com VCD (figura 38).

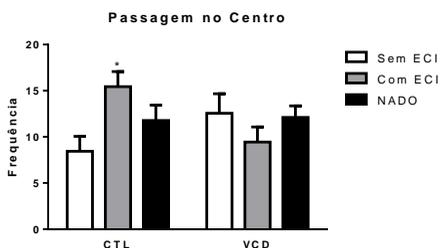


Figura 16. Frequência da passagem no centro durante o teste do Campo Aberto dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

4.5- Teste de Reconhecimento de Objeto em ratas 80 dias após a administração do VCD ou óleo (perimenopausa)

Ao ser calculado o IR dos objetos não houve efeito significativo de nenhum dos fatores analisados (tratamento com VCD ou tipo de estresse), bem como interação entre eles tanto para o objeto familiar como para o objeto novo (figura 39A e 39B respectivamente).

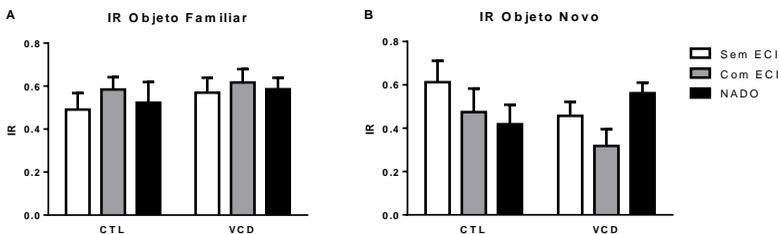


Figura 17. Índice de Reconhecimento do Objeto Familiar (A) e Objeto Novo (B) dos animais com 80 dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 9. Two-way ANOVA, $p < 0,05$.

3.6- Dosagem de Progesterona e Estradiol

Foi mensurada a progesterona e o estradiol dos animais expostos apenas ao ECI. Não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de progesterona (Figura 40A) ou estradiol (Figura 41A) entre os animais estudados 80 dias após tratados com VCD comparados a seus respectivos controles. Nos animais estudados 180 dias após o tratamento, houve uma redução próxima do nível de significância ($p=0,0589$) na concentração de progesterona das ratas com falha ovariana (figura 40B). Já para os níveis de estradiol, não houve diferença nos animais com 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo (figura 41B).

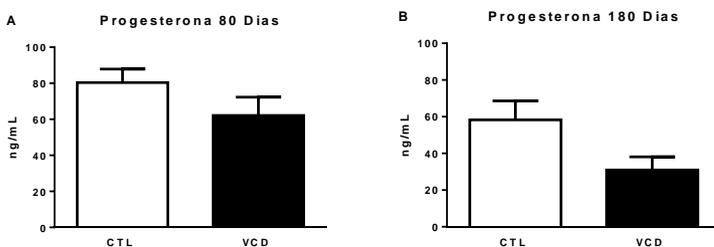


Figura 18. Dosagem da Progesterona (ng/mL) dos animais com 80 (A) e 180 (B) dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo expostos ao ECI. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD c/ 80 dias)= 8; N (CTL c/ 80 dias)= 10; N (VCD c/ 180 dias)= 11; N (CTL c/ 180 dias)= 14. Teste Mann Whitney, não significativa.

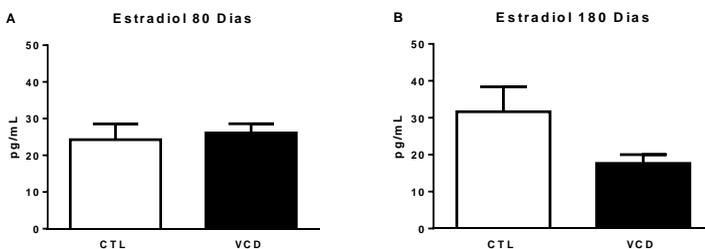


Figura 19. Dosagem do Estradiol (pg/mL) dos animais com 80 (A) e 180 (B) dias após o início do tratamento com VCD (160 mg/Kg) ou óleo expostos ao ECI. Valores expressos como média \pm EPM. N (VCD c/ 80 dias)= 4; N (CTL c/ 80 dias)= 7; N (VCD c/ 180 dias)= 8; N (CTL c/ 180 dias)= 7. Teste Mann Whitney, não significante.

5- DISCUSSÃO

5.1- Teste do Nado Forçado repetido modificado na presença ou ausência do ECI

Nossos resultados demonstraram que a falha ovariana, tanto 80 quanto 180 dias após o tratamento com VCD, levou à exibição de padrões comportamentais distintos do seu grupo CTL no TNF repetido modificado quando aplicado junto com outros estresses. Também foi observado que a falha ovariana 80 dias pós-tratamento promoveu diferentes comportamentos do grupo CTL no TNF repetido modificado quando isolado, ou seja, quando aplicado sem os outros estresses. Esses padrões são, provavelmente, influenciados pelas alterações neuroendócrinas provocadas pela depleção dos folículos ocasionada pelo VCD. Por outro lado, nem a falha ovariana por 80 ou 180 dias e tampouco a exposição ao ECI foram capazes de alterar a massa corporal dos animais. Nossos dados corroboram a pesquisa de Muhammad *et al.*, (2009), que ao final do experimento (31 dias), também não apresentou diferença na massa corporal dos animais entre os grupos VCD e veículo. Zhang *et al.*, (2016) também encontrou esse resultado ao final de seu estudo, 60 dias após o início do tratamento. Entretanto, foi observada uma redução da massa relativa dos ovários dos animais expostos ao ECI com 180 dias pós-tratamento com VCD. Além disso, a análise morfológica dos ovários destes mesmos animais também mostrou redução no número de folículos saudáveis e aumento do número de folículos atresicos (Gregorio,

2016, dados não publicados), confirmando os efeitos deletérios do VCD nos ovários. Esses dados corroboram o estudo de Battiston *et al.*, (2017), que mostrou hipotrofia ovariana nas ratas após 170 dias do tratamento com VCD. Mayer (2002) também demonstrou uma redução da massa relativa dos ovários dos animais tratados com VCD, após 360 dias de tratamento.

A exposição de ratas jovens com falha ovariana precoce (80 dias pós-tratamento com VCD) ao ECI não afetou o comportamento de imobilidade durante o TNF repetido modificado. Já 180 dias após o tratamento, as ratas apresentaram maior tempo de imobilidade na progressão dos testes, revelando que conforme a falha ovariana progrediu ao longo do tempo, estes animais desenvolveram abordagens diferentes ao desafio do nado forçado durante a exposição ao ECI. Esta diferença envolve a transição de uma resposta ativa nas ratas mais jovens, passando para uma resposta passiva, correspondente ao aumento do tempo de imobilidade, nas ratas expostas à falha ovariana por mais tempo (180 dias). Este comportamento passivo leva a uma economia de energia, que a longo prazo pode ser considerada um mecanismo eficiente de adaptação em resposta ao estresse do TNF repetido modificado. Além disso, esta resposta passiva fica estocada na memória via receptores para glicocorticóides (GR) no hipocampo, o que poderia explicar o aumento do tempo de imobilidade ao longo das exposições repetidas ao TNF repetido modificado durante o ECI, [para revisão ver (Kloet e Molenijk, 2016)]. Isto corrobora a ideia de que este teste pode não refletir comportamentos depressivos, mas sim mecanismos de adaptação ao lidar com diferentes estresses e que são retidos na memória e expressos em situações posteriores (Kloet e Molenijk, 2016). Embora ainda não tenhamos as dosagens de corticosterona plasmática dos animais utilizados no presente estudo, é esperado que a exposição aos diferentes estresses do ECI leve a um aumento nos níveis deste glicocorticoide. Consequentemente, pode-se esperar que este aumento afete a transmissão neural no hipocampo, já que é uma região que expressa alta densidade de receptores para glicocorticóides (GRs) [para revisão ver (Galeeva *et al.*, 2010)]. Em 1994, Morano e colaboradores, estudaram ratos Fisher de 26-27 meses de idade e mostraram que o envelhecimento leva à perda de GRs no hipocampo e alterações na resposta ao estresse. Tendo em vista que no presente estudo ambos os grupos, 80 e 180 dias pós-VCD são constituídos por ratas jovens, podemos inferir que as diferenças encontradas na estratégia no TNF repetido modificado não sejam resultado do processo de envelhecimento, mas sim de alterações neuroendócrinas proporcionadas pela falha ovariana, que poderiam afetar a função destes

receptores no hipocampo. Apesar do presente estudo ter encontrado apenas uma tendência de redução dos níveis plasmáticos de progesterona nos animais de 180 dias pós-VCD, outros dados de nosso laboratório mostram que ocorre redução significativa dos níveis plasmáticos de progesterona nesta fase (dados não publicados). Além disso, a literatura mostra que há também uma instabilidade nos níveis de estradiol neste modelo (Zhang *et al.*, 2016), o que sugere uma possível participação dos esteroides ovarianos no planejamento ou na construção destas estratégias comportamentais passivas e ativas em resposta a situações de desafio. Isto corrobora o estudo de Mahmoud *et al.*, (2016), que demonstrou um aumento da imobilidade no TNF em ratas Sprague-Dawley de 10 meses de idade, 4 meses após a ovariectomia, e expostas a 6 semanas de ECI. Além destes mesmos animais apresentarem aumento da anedonia no teste de preferência por sacarose ao final do ECI. A testosterona também parece participar destes mecanismos, pois o estudo de Stepanichev *et al.*, (2016) demonstrou que machos Wistar apresentam anedonia após serem expostos ao ECI ou estresse crônico combinado (ECC); que consiste em uma sequência de estresses com menor quantidade de estímulos estressores e de maior intensidade que o ECI, mas também por um período crônico; relacionando a redução do consumo por soluções palatáveis após estresse como indicador do comportamento tipo-depressivo dos animais. Neste mesmo estudo, também mostrou-se que os animais não apresentam diferença no comportamento passivo (imobilidade) no TNF após estresse.

No presente estudo deve-se lembrar ainda que o TNF repetido modificado era parte dos diferentes estresses que constituíam o ECI, ou seja, os animais foram expostos também a outros tipos de estresses além das quatro exposições ao nado forçado, os quais podem ter intensificado as respostas encontradas neste teste. Além disso, também houve um grupo que foi exposto apenas ao TNF repetido modificado isoladamente, sem os possíveis efeitos do ECI, onde mostramos que a falha ovariana *per si*, após 80 dias do início do tratamento com VCD, não afetou significativamente a frequência, duração ou a latência da imobilidade. É um achado interessante, já que Mezadri *et al.*, (2011) mostrou que ratos machos reduzem o tempo de imobilidade e aumentam a duração do comportamento de nado no último teste do nado forçado repetido (TNF-r) quando estão sob tratamento com 2.5mg/kg de fluoxetina. Nossos resultados corroboram um estudo realizado no Laboratório de Neurobiologia do Comportamento, do Depto de Ciências Fisiológicas, CCB, UFSC, onde ratas com falha ovariana (90 dias pós-VCD) não

apresentam aumento na duração da imobilidade nas últimas três sessões do TNF-r, mesmo sob tratamento com 2,5 mg/kg de fluoxetina administradas diariamente (Cadore, 2016, dados não publicados). Além de também corroborar outro trabalho realizado pelo mesmo laboratório, no qual ratas intactas (administração com sacarose e com 2,5 mg/Kg de fluoxetina) com 90 dias de idade, não exibem diferenças na duração da imobilidade no TNF-r (Domingues, 2015, dados não publicados).

Os animais expostos ao TNF repetido modificado durante o ECI (80 dias) apresentaram aumento do comportamento de imobilidade (passivo) no último teste, já os animais que passaram apenas pelo TNF repetido modificado sem os outros estresses do ECI não exibiram essa diferença. Isso indica que o ECI apresenta uma maior intensidade no nível de estresse capaz de modificar as abordagens de defesa desses animais.

A transição para comportamento passivo já foi demonstrada na literatura em outras espécies, bem como em outros testes comportamentais. O trabalho de Rodríguez Echandía *et al.*, (1988) mostrou que ratas Holtzman com 3 meses de idade apresentam aumento do tempo de imobilidade ao final de 10 minutos de TNF após serem expostas ao ECI. Outro estudo utilizou ratas albinas Fisher-344, onde foram primeiramente expostas ao TNF e depois ao ECI, exibindo maior tempo de imobilidade no teste do campo aberto (Sikiric *et al.*, 2000). Camundongos apresentam aumento da imobilidade no teste de suspensão da cauda após exposição ao estresse crônico previsível (ECP) e ao ECI. Neste último, a latência para imobilidade foi menor do que no grupo CTL no primeiro minuto de teste (Yoon *et al.*, (2014). Camundongas intactas com 3 meses de idade, expostas ao ECI, apresentam aumento na duração da imobilidade no teste de suspensão da cauda e TNF, bem como redução no consumo da solução de sacarose (Zhu *et al.*, 2014).

No entanto, é importante ressaltar que as estratégias adotadas podem variar de acordo com a espécie estudada, os tipos de estresses que compõe o ECI, o tempo de exposição ao estresse, entre outros parâmetros. Um exemplo disto é que nem sempre a estratégia adotada é a passiva. Camundongos adultos e juvenis, por exemplo, quando expostos a 3 e 14 dias de estresse de restrição por duas horas, desenvolvem diferentes abordagens de defesa para lidar com este tipo de estresse, apresentando redução do tempo de imobilidade e aumento do tempo de nado no TNF. Já no teste de preferência por sacarose, os camundongos juvenis apresentam comportamento anedônico após o estresse (Sadler e Bailey, 2016). Em ratos expostos ao estresse crônico moderado também ocorre redução no consumo de sacarose, demonstrando comportamento anedônico (Grønli *et al*, 2005).

No presente estudo, ratas com falha ovariana precoce (80 dias pós-tratamento com VCD) apresentaram redução da escalada na progressão dos testes durante o ECI. Este resultado sugere que a falha ovariana precoce levou à redução de uma resposta proativa, a qual é aumentada, por exemplo, em animais tratados com moclobemida, um inibidor seletivo da monoamina oxidase A utilizado no tratamento da depressão (Cryan, Page e Lucki, 2005). Isto indica que o declínio de alguns hormônios, tais como progesterona e testosterona, bem como a instabilidade dos níveis de estradiol característicos desta fase (Reis *et al.*, 2014) podem reduzir algumas estratégias proativas no TNF repetido modificado, quando este é aplicado junto com outros estresses.

O estudo de Mahmoud *et al.*, (2016) apresentou redução do tempo de escalada no TNF em ratas Sprague-Dawley de meia idade ovariectomizadas e expostas a 6 semanas de ECI, corroborando a ideia de que o declínio dos hormônios ovarianos diminui este comportamento proativo. Por outro lado, esta resposta não ocorreu nas ratas com 180 dias após tratamento com VCD, ou seja, a progressão da falha ovariana e da idade levaram a uma reversão da resposta encontrada aos 80 dias pós-tratamento. Comparando-se este resultado com aquele encontrado por Mahmoud e seus colaboradores (2016), pode-se inferir que o avanço da idade e a retirada abrupta dos hormônios ovarianos têm um impacto mais marcante sobre esta resposta proativa no TNF do que a falha ovariana gradual que ocorre no modelo VCD.

Já, quando o TNF repetido modificado, nos animais com 80 dias pós-tratamento, foi aplicado isoladamente, o tratamento com VCD inibiu a resposta de aumento da duração da escalada visto nas ratas CTL durante a última exposição neste teste. É interessante notar que este aumento da duração da escalada no último teste não foi observado em machos tratados com fluoxetina (Mezadri *et al.*, 2011), sugerindo que podem ocorrer diferenças sexuais nas respostas de enfrentamento ao nado forçado. O tratamento com VCD levou também ao aumento da latência para este comportamento no último teste comparado ao primeiro. Estes dados corroboram a ideia de que a falha ovariana reduziu alguns componentes da estratégia proativa destes animais no TNF repetido modificado, sem os possíveis efeitos dos outros estresses do ECI. Entretanto, as ratas intactas veículo (sacarose) do trabalho de Domingues (2015, dados não publicados), contradizem os resultados exibidos pelo grupo CTL do nosso trabalho, pois apresentam redução deste comportamento nos testes 1 e 2 no TNF-r.

A falha ovariana precoce 80 dias após o tratamento com VCD não afetou a duração do comportamento de nado durante o ECI. Porém, foi observada uma redução na duração deste comportamento nas ratas com falha ovariana com 180 dias nas últimas 3 sessões de teste. Isso demonstra que com a progressão da falha ovariana, as ratas realizaram por menos tempo este comportamento proativo, além de demonstrarem um atraso para iniciá-los, corroborando os resultados encontrados aqui para o comportamento de imobilidade. Esta resposta não foi observada nas ratas com 80 dias, indicando outro fator para o desenvolvimento de um desempenho distinto nas ratas com falha ovariana para enfrentar o ECI. Novamente sugerimos que estas diferenças de desempenho no TNF repetido modificado podem não ser resultado do processo de envelhecimento, mas sim de alterações neuroendócrinas proporcionadas pela falha ovariana, uma vez que mesmo as ratas com 180 dias pós-tratamento com VCD não são ainda consideradas senis. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que a idade e a condição endócrina se correlacionam na construção das estratégias a serem apresentadas neste teste, pois já foi demonstrado que ratas de meia idade ovariectomizadas também apresentam redução no tempo deste comportamento no TNF após ECI (Mahmoud *et al.*, 2016).

Quando as ratas com falha ovariana foram expostas ao TNF repetido modificado isolado, ou seja, sem os outros estresses do ECI, apresentaram redução do tempo de nado na primeira exposição, aumentando o mesmo na última reexposição. Já as CTL mantiveram-se imóveis e elevaram o tempo de escalada no último teste, demonstrando que estes animais desenvolvem estratégias diferentes para lidar com este estresse. Essas estratégias diferentes não foram observadas em machos tratados com fluoxetina (Mezadri *et al.*, 2011), mostrando mais uma vez que os hormônios sexuais e outros parâmetros relacionados ao gênero, podem influenciar nas estratégias comportamentais de enfrentamento neste tipo de teste. No trabalho de Domingues (2016, dados não publicados), ratas intactas (administração com sacarose e com 2,5 mg/Kg fluoxetina) não apresentam diferença neste comportamento no teste e retestes 1 e 2 no TNF-r. Outro indicativo de que as ratas com falha ovariana desenvolvem estratégias distintas para lidar com este tipo de situação.

Em relação ao comportamento de mergulho, a falha ovariana (80 dias), durante o ECI, levou a uma redução do tempo e frequência de exibição deste comportamento, bem como um aumento da latência. Esta resposta não ocorreu nos animais 180 dias após o tratamento com VCD, onde as ratas apresentaram comportamento similar, demonstrando que as

ratas desenvolvem estratégias diferentes para lidar com o ECI, dependendo da extensão do tempo em que se encontram expostas à falha ovariana. Esta diferença de estratégia refere-se a uma redução de comportamentos proativos quando o período de falha ovariana é curto (80 dias), e uma supressão desta resposta quando o período de falha ovariana é mais longo (180 dias). Entretanto, os animais que foram expostos ao TNF repetido modificado (80 dias) sem os outros estresses do ECI, também comportaram-se de forma semelhante aos seus controles neste comportamento.

Ao analisar-se as abordagens pró-ativas no TNF repetido modificado, percebe-se que o ECI conduz à redução de comportamentos como a escalada e o mergulho nas ratas com falha ovariana com 80 dias, e, em relação ao nado, não são observadas grandes diferenças. Já nos animais tratados com VCD que não foram expostos ao ECI, nota-se que as ratas aumentaram o comportamento de nado e não apresentaram grandes diferenças em relação ao mergulho e escalada. Então, pode-se sugerir que ao final do ECI, este induz modificações mais significantes no comportamento dos animais com falha ovariana, por meio da redução de abordagens pró-ativas, que não são tão significantes nos animais que não foram expostos ao ECI.

É importante ressaltar que os animais expostos ao ECI foram submetidos a esfregaços vaginais, porém as ratas que foram expostas apenas ao TNF repetido modificado não passaram por esta intervenção. Apesar da técnica ser simples e os animais se habituarem ao procedimento, que é feito sempre pelo mesmo experimentador e de maneira a causar o menor desconforto possível aos animais, não podemos descartar a hipótese de que este procedimento possa ter contribuído de alguma maneira para as diversas alterações no comportamento apresentadas neste estudo.

Diversos trabalhos na literatura associam o TNF com o comportamento tipo-depressivo dos roedores, representado pelo aumento do tempo e frequência da imobilidade neste teste (Porsolt *et al.*, 1977, 1978, 1979). No presente estudo as ratas com 180 dias exibiram aumento de imobilidade durante o ECI, o que também poderia ser interpretado como um aumento do comportamento tipo-depressivo desses animais. Diferente das ratas com 80 dias, que não apresentaram diferenças nesse comportamento durante o ECI. Uma das justificativas mais utilizadas para esta correlação com depressão é o fato de drogas antidepressivas reduzirem o tempo de imobilidade de roedores no TNF. Se levarmos estes trabalhos em consideração, podemos inferir que o fator envelhecimento,

ou ainda o maior tempo de falha ovariana, pode estar associado a transtornos de humor como a depressão maior, a qual também é desencadeada pelo estresse por meio da atenuação da neurogênese (Lazarov; 2010). Por outro lado, recentemente diversos autores têm demonstrado que as respostas comportamentais de roedores no TNF não estão relacionadas à depressão, mas sim a estratégias comportamentais de adaptação a uma situação inescapável. Neste caso, os efeitos dos antidepressivos poderiam ser explicados pelo fato destes afetarem os mecanismos de consolidação da resposta aprendida de imobilidade e por esta razão diminuir este comportamento [para revisão ver (Kloet e Molenijk, 2016)]. Assim, nossos resultados sugerem que o tempo mais prolongado de falha ovariana (180 dias), pode levar à alteração das estratégias comportamentais de enfrentamento do estresse, aumentando os comportamentos passivos. Esta estratégia leva à economia de energia, o que em um contexto evolutivo, pode ser considerado benéfico. Além disso, a manutenção desta resposta ao longo dos re-testes mostra uma capacidade de retenção do aprendizado nestas ratas com falha ovariana, o que pode indicar ausência de déficit cognitivo, pelo menos relacionado à retenção de memória aprendida. No presente trabalho, os resultados referentes ao TRO referem-se apenas ao grupo 80 dias após tratamento com VCD. Entretanto, dados prévios do nosso laboratório mostram que aos 150 dias pós-VCD as ratas realmente não apresentam déficit de memória (dados não publicados), corroborando os nossos resultados no TNF.

5.2- Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Nossos dados do LCE demonstraram que o ECI levou a um aumento do comportamento ansioso no grupo controle. Este efeito do ECI não ocorreu nas ratas tratadas com VCD, o que pode ser explicado pelo fato das ratas com falha ovariana já apresentarem redução da permanência nos braços abertos mesmo sem a exposição ao ECI. O mesmo ocorreu com relação ao comportamento de imersão de cabeça, cuja redução da frequência corresponde a um aumento dos índices de ansiedade no LCE. Em conjunto, estes resultados sugerem que a falha ovariana pode aumentar os índices de ansiedade independentemente de estarem condicionadas ao ECI ou estresse mais leve como o nado forçado repetido modificado.

Os presentes resultados, demonstrando efeito do ECI nas ratas controle, corroboram o estudo de Mahmoud *et al.*, (2016), no qual ratas ovariectomizadas apresentaram uma elevação do comportamento

ansioso, pelo aumento da latência para a ingestão de alimento no teste de ingestão suprimida pela novidade, após expostas ao ECI. Entretanto, Mitra *et al.*, (2005), não observaram efeitos ansiogênicos da exposição ao ECI em ratas Wistar de 3 meses de idade testadas no LCE. O mesmo foi constatado em ratos Lister machos após estresse crônico moderado (D'Aquila, Brain, Willner, 1994). Portanto, deve-se levar em consideração que as respostas comportamentais no LCE após exposição ao ECI podem variar de acordo com os tipos de estresses que compõem o ECI, bem como o gênero e a espécie animal que são utilizados.

Com relação aos efeitos do VCD aumentando os índices de ansiedade, os dados do presente estudo estão de acordo com aqueles encontrados por Reis *et al.*, (2014), que mostraram que ratas com falha ovariana precoce em diestro apresentam redução tanto do percentual de tempo nos braços abertos, quanto da frequência de imersão de cabeça, indicando aumento do comportamento ansioso no LCE. Por outro lado, Van Kempen *et al.*, (2014) não encontraram diferença significativa entre os grupos VCD e CTL no tempo gasto nos braços abertos, 74 dias após o início do tratamento com VCD (130 mg/kg durante 5 dias seguidos cada semana por três semanas) ou veículo. Esta diferença encontrada pode ser pelo fato de que neste estudo foi utilizada uma dose menor de VCD, bem como não houve separação por fases do ciclo estral como em Reis *et al.*, (2014).

Já em relação ao comportamento de SAP, o presente estudo não foi capaz de demonstrar um efeito do tratamento com VCD sobre este parâmetro, diferentemente de Reis *et al.*, (2014), onde os animais com falha ovariana exibiram aumento da frequência do comportamento de SAP tanto em diestro como proestro, o que indica um aumento do grau de ansiedade. Este comportamento também não foi afetado pelo estresse no presente estudo, seja o ECI ou nado forçado repetido modificado.

Sadler e Bailey (2016) demonstraram que camundongos juvenis aumentam o comportamento exploratório no LCE (aumento do tempo e entradas nos braços abertos) após exposição ao estresse de restrição repetido, demonstrando uma redução da ansiedade. Contudo, camundongas expostas ao ECI e estresse de restrição crônica apresentam menor tempo nos braços abertos, além do aumento da latência para a ingestão no teste de ingestão suprimida pela novidade, indicando elevação da ansiedade (Zhu *et al.*, 2014). No presente estudo, o estresse do nado forçado promoveu uma redução no tempo nos braços abertos dos animais CTL, indicando elevação da ansiedade para estes animais. Portanto, pode-se dizer que o estresse crônico contribui para o aumento da ansiedade no

LCE tanto em camundongas, como nas fêmeas intactas (grupo CTL) do presente estudo.

A exposição ao ECI promoveu um aumento do tempo gasto nos braços fechados tanto para o grupo VCD quanto para o grupo CTL, indicando uma elevação da ansiedade independente da falha ovariana precoce. Além disso, o grupo CTL também permaneceu mais tempo nos braços fechados após ser exposto ao nado forçado repetido modificado. Isso indica que este estresse teve maior influência sobre os animais CTL. O estudo de D'Aquila, Brain e Willner (1994), mostrou que ratos machos Lister permanecem mais tempo nos braços abertos no LCE após serem expostos ao estresse crônico moderado, demonstrando que o estresse não influencia em parâmetros relacionados com a ansiedade nestes animais, já que os ratos CTL gastam mais tempo nos braços fechados no LCE. Já Varga *et al.*, (2011), mostraram que ratos machos Brattleboro deficientes de vasopressina e com diabetes insípido congênito apresentam maior número de entradas nos braços fechados após expostos ao estresse crônico moderado. Assim, pode-se notar que o estresse influencia parâmetros relacionados à ansiedade de maneira distinta nos machos e fêmeas.

5.3- Teste do Campo Aberto

O presente estudo mostrou que o ECI promoveu uma redução da duração e frequência do comportamento de exploração vertical nas ratas com falha ovariana no TCA, indicando aumento do comportamento ansioso. Machos expostos ao estresse crônico moderado exibem maior exploração do campo aberto, com maior tendência de investigação no centro (Grønli *et al.*, 2005). Machos Wistar expostos ao ECI também apresentam elevação da frequência do comportamento de exploração vertical e do centro no TCA. Estes dados da literatura indicam que machos podem ser menos vulneráveis do que fêmeas aos efeitos do ECI no que diz respeito ao desempenho no TCA. O ECC também não afeta o desempenho de ratos machos neste teste (Stepanichev *et al.*, 2016). Animais Wistar-Kyoto, tanto machos como fêmeas, exibem aumento do comportamento ansioso no TCA, quando comparados com ratos Sprague-Dawley, mesmo sem estarem expostos a qualquer tipo de estresse. Portanto, também é importante considerar que a linhagem pode interferir no comportamento dos animais (Burke *et al.*, 2016). Já camundongos apresentam tigmotaxia quando expostos ao ECI e ECP, revelando aumento do comportamento ansioso (Yoon *et al.*, 2014).

Os nossos dados não apresentaram diferença no tempo de permanência no centro, o que corrobora um estudo prévio realizado no

nosso laboratório, o qual também não demonstrou diferença entre os grupos VCD e CTL no TCA, 80 dias pós-tratamento com VCD (Sehnm, 2015, dados não publicados). Van Kempen *et al.*, (2014), também não apresentaram diferença entre o grupos VCD e CTL, em relação ao tempo gasto no centro, nos momentos pós tratamento com VCD estudados (52, 73 e 127 dias pós-VCD) neste teste. Entretanto, estes resultados contradizem os encontrados por Zhu e seus colaboradores (2014), onde demonstram que camundongas expostas ao ECI e estresse de restrição crônica permanecem no centro do campo aberto por tempo menor (Zhu *et al*; 2014). No entanto, é importante ressaltar que estes animais foram expostos à restrição crônica, o que não foi feito no presente estudo.

O comportamento de autolimpeza é considerado um indicativo de aumento de ansiedade (Rodgers, Dalvi; 1997), assim como reduzir o tempo de permanência e a quantidade de passagens pelo centro do campo aberto (Burke *et al*; 2016). No presente estudo, as ratas com falha ovariana expostas ao ECI apresentaram um indicativo de comportamento ansioso, pois realizaram por maior tempo o comportamento de autolimpeza no TCA. Com relação à frequência de passagem pelo centro do campo, apenas o grupo CTL exposto ao ECI exibiu maior número de passagens, indicando redução da ansiedade, o que não aconteceu com o grupo VCD. Portanto, podemos sugerir que o ECI tenha ocasionado um efeito ansiogênico nos animais com falha ovariana neste teste. Já foi demonstrado que machos não exibem comportamento de autolimpeza no TCA após exposição ao ECI ou ao estresse crônico de restrição (Stepanichev *et al.*, 2016), Dessa forma, podemos sugerir que a alteração hormonal apresentada pelo modelo do VCD, e não necessariamente um declínio total dos esteróides ovarianos, possa ter interagido com outros hormônios, principalmente os glicocorticoides, levando a comportamentos que indicam aumento da ansiedade.

O grupo CTL exposto ao ECI aumentou o número de passagens no centro do campo aberto, indicando redução do comportamento ansioso. Já no LCE, o mesmo grupo permaneceu menos tempo nos braços abertos, indicando aumento do comportamento ansioso. Isso é um resultado contraditório, demonstrando a importância de se analisar o comportamento dos animais em diferentes testes.

5.4- Teste de Reconhecimento de Objetos

O presente estudo não demonstrou efeitos da falha ovariana ou dos tipos de estresse aplicados sobre o IR para o objeto antigo ou para o

novo. Este dado não corrobora um trabalho prévio realizado no nosso laboratório, que demonstrou que as ratas com falha ovariana obtiveram um IR maior para o objeto familiar comparadas às controles, 80 dias após o tratamento com VCD (Sehnm, 2015, dados não publicados). Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato destes animais não terem sido expostos a nenhum tipo de estresse, embora no presente estudo também haja um grupo VCD sem exposição ao estresse. No entanto, a análise global dos dados, a comparação de todos os grupos pelo ANOVA de duas vias, acaba por levar em consideração todos estes parâmetros, o que poderia justificar as diferenças encontradas entre o presente estudo e os dados não publicados do nosso laboratório.

Por outro lado, nossos dados corroboram os de Van Kempen *et al.*, (2014), que demonstraram não haver diferença entre os grupos VCD e CTL na exploração do objeto na nova localização em qualquer um dos momentos dos períodos da transição menopausal neste modelo. No trabalho de Acosta (2009), o qual utilizou ratas com 14 meses de idade, o grupo VCD apresentou dano na aprendizagem ao resolver o teste de atraso ligado à amostra (DMS- delayed-match-to-sample), um teste para verificar a memória espacial. Entretanto, devemos ressaltar que nestes animais o componente do envelhecimento está presente, diferentemente das ratas do presente estudo. Apesar disso, Koebele *et al.*, (2016) demonstrou que a indução da transição menopausal em ratas jovens (6 meses de idade) é prejudicial ao desempenho da memória em comparação com ratas de meia-idade (12 meses de idade), analisando a performance desses animais por meio do labirinto aquático radial pelo período de quatro meses. Este teste comportamental é utilizado para identificar a memória de trabalho espacial e memória de referência. Já no estudo de Acosta (2009), o grupo VCD-OVX apresentou melhor desempenho no labirinto aquático radial, demonstrando que a perda dos hormônios ovarianos de maneira gradual seguida da ovariectomia foi menos prejudicial para a cognição do que a retirada abrupta dos esteroides ovarianos.

Dados da literatura demonstram que as alterações funcionais na cognição e memória têm sido atribuídas às modificações fisiológicas induzidas pelo envelhecimento (Grady, 2012). Os animais do presente estudo são jovens e não apresentaram injúria mnemônica por meio do teste de reconhecimento de objetos, indicando assim, que a ocorrência de danos cognitivos nesses animais parece não ter sido influenciada pela falha ovariana precoce, corroborando a ideia de que o processo de envelhecimento possa estar mais relacionado aos déficits cognitivos durante a transição da menopausa do que o declínio hormonal.

5.5- Níveis hormonais dos animais expostos ao ECI

Cento e oitenta dias após a falha ovariana foi possível observar uma redução nos níveis de progesterona muito próxima do nível de significância. Esse dado corrobora o de Acosta (2009), onde ratas mais velhas, com 14 meses de idade, tratadas VCD apresentaram os níveis de progesterona reduzidos, bem como ausência de corpo lúteo nesses animais. Em Reis *et al.*, (2014) também foi encontrada uma redução plasmática de progesterona nas ratas (90 dias) com falha ovariana no proestro e diestro.

Nossos dados não demonstraram diferença significativa entre os grupos para os níveis de estradiol tanto nas ratas com 80 como 180 dias após o início do tratamento com VCD. Este dado corrobora o estudo de Reis *et al.*, (2014), que também não encontrou redução nos níveis plasmáticos de estradiol no proestro ou no diestro, 80 dias pós-VCD. O estudo de Mayer *et al.*, (2002) não apresenta diferença nos níveis plasmáticos de estradiol 30, 60, 120, 240, ou 360 dias pós-tratamento. Entretanto, no dia 360 o grupo com falha ovariana apresenta maior grau de variabilidade destes níveis entre os animais, sendo o mesmo encontrado para camundongas tratadas com VCD (160 mg/kg) por 10 dias (Zhang *et al.*, 2016). As ratas juvenis e adultas com falha ovariana do estudo de Frye *et al.*, (2012) não apresentam diferenças nos níveis de estradiol, ao longo de 20 e 11 meses de experimento, respectivamente. Estes resultados corroboram dados clínicos que mostram que os níveis de estradiol demoram mais para declinar no período da perimenopausa em comparação com outros hormônios como progesterona e testosterona (Burger *et al.*, 2002; Hall, 2004; Prior e Hitchcock, 2011).

No trabalho de Koebele *et al.*, (2016), não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de 17- β -estradiol e progesterona entre os grupos VCD e veículo, tanto em ratas juvenis quanto em ratas de meia idade, quando estudadas 52 dias após o início do tratamento com VCD. Entretanto, contingentemente os níveis de progesterona das ratas de meia-idade com falha ovariana se encontraram elevados em relação às ratas juvenis com falha ovariana.

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que os animais com falha ovariana precoce desenvolvem diferentes estratégias de enfrentamento para lidar com a exposição ao TNF repetido modificado durante exposição ao ECI e sem exposição ao mesmo. O ECI provoca

alterações no comportamento, reduzindo estratégias pró-ativas nas ratas com falha ovariana independente da idade. Já o TNF repetido modificado aplicado sem os outros estresses, conduz a uma elevação destas estratégias nos animais com falha ovariana. As flutuações hormonais que ocorrem neste modelo podem ter contribuído para estas abordagens comportamentais diferenciadas.

As ratas com falha ovariana precoce apresentam aumento do comportamento ansioso no teste do LCE, independentemente de serem expostas ao estresse, seja o ECI ou nado forçado repetido modificado. Já no TCA, o qual também é utilizado para verificar parâmetros de ansiedade, as ratas com falha ovariana apresentam comportamento ansioso apenas após expostas a estímulos estressores crônicos como a sequência de estímulos realizada pelo ECI.

Os animais com falha ovariana precoce não exibem déficit de cognição e memória, mesmo após exposição a diferentes estresses, pelo menos 80 dias após o tratamento com VCD.

6- CONCLUSÃO

O ECI parece levar a modificações mais acentuadas no comportamento de ratas com falha ovariana no TNF, reduzindo abordagens pró-ativas, que não se apresentam tão significantes nos animais expostos apenas ao TNF repetido modificado. Este resultado não confirmou nossa hipótese, já que ainda é controverso se a redução de abordagens pró-ativas no TNF é prejudicial e indicativa de comportamento depressivo ou se é benéfica e adaptativa, por permitir que o animal economize energia.

A falha ovariana precoce provoca o aumento do comportamento ansioso no teste do LCE, independente da exposição ao ECI ou não forçado, confirmando parcialmente a hipótese inicial, já que as ratas com falha ovariana não foram mais susceptíveis aos efeitos do ECI. No entanto, no TCA, esta hipótese se confirmou, pois a falha ovariana associada ao ECI levou ao aumento do comportamento ansioso.

A falha ovariana precoce não provoca injúria mnemônica no TRO, nem mesmo após estímulos estressores. Este resultado não confirmou a hipótese proposta. Tendo em vista que os animais deste estudo são jovens, sugerimos que o déficit cognitivo possa estar mais relacionado com fatores associados a senescência do que com fatores hormonais referentes a falha ovariana.

7-REFERÊNCIAS

ACOSTA, J. I. *et al.* Transitional Versus Surgical Menopause in a Rodent Model: Etiology of Ovarian Hormone Loss Impacts Memory and the Acetylcholine System. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4248-59, 2009.

ADAMS, H. *et al.* The Relation Between Catastrophizing and Occupational Disability in Individuals with Major Depression: Concurrent and Prospective Associations. **J Occup Rehabil.** 2016

ALBERT, P.R. Why is depression more prevalent in women?. **J Psychiatry Neurosci**, v. 40, n. 4, p. 219-21, 2015

ALBERT K, PRUESSNER J, NEWHOUSE P. Estradiol levels modulate brain activity and negative responses to psychosocial stress across the menstrual cycle. **Psychoneuroendocrinology**, v. 59, p. 14-24, 2015.

AN-LI WANG, *et al.* Involvement of NMDA receptors in both MPTP-induced neuroinflammation and deficits in episodic-like memory in Wistar rats. **Behav Brain Res**, v. 208, n.1, pg. 38-46, 2010.

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.

BATTISTON F.G, *et al.* Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 165, p. 170-18, 2017.

BAUDRY, M; BI, X; AGUIRRE, C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection. **Neuroscience**, v. 3, n. 239, p. 280-94, 2013.

BAULD, R; BROWN, R.F. Stress, psychological distress, psychosocial factors, menopause symptoms and physical health in women. **Maturitas**, 62, 160–165, 2009.

BETHEA, C.L, *et al.* Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 2, p. 212-38, 2009.

BOURQUE, M, *et al.* Neuroprotective Effect of Progesterone in MPTP-Treated Male Mice. **Neuroendocrinology**, v. 103, n. 3-4, p. 300-14, 2016.

BOWMAN, R.E; FERGUSON, D; LUINE, V.N. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v. 113, p. 401–410, 2002.

BURGER, H.G, *et al.* Hormonal changes in the menopause transition. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 257-75, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CASTAGNÉ, V; MOSER, P; PORSOLT, R.D. “Behavioral assessment of antidepressant activity in rodents”. In **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**, K. R. Bailey and J. N. Crawley, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2009.

CHAN, M., *et al.* Effects of chronic oestradiol, progesterone and medroxyprogesterone acetate on hippocampal neurogenesis and adrenal mass in adult female rats. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 6, p. 386-99, 2014.

CRYAN, J.F; PAGE, M.E; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 335-44, 2005.

CRISPIM JUNIOR, C. F. *et al.* EthoWatcher: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257-264, 2012.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-6, 1994.

CYRANOWSKI, J.M. *et al.* Adolescent onset of the gender difference in lifetime rates of major depression: a theoretical model. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 1, p. 21-7, 2000.

DAVIES, C.; STEINBERG, H. A biphasic effect of chlordiazepoxide on animal locomotor activity. **Neurosci. Lett**, v. 46, p. 347-351, 1984.

D'AQUILA, P.S; BRAIN, P; WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiol Behav**, v. 56, n. 5, p. 861-7, 1994.

DETKE, M.J; RICKELS, M; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, p. 66-72, 1995.

DEVI G *et al.* Prevalence of Memory Loss Complaints and Other Symptoms Associated with the Menopause Transition: A Community Survey. **Gender Medicine**, v 2, n 4, pg 255-264, 2005.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behav Brain Res**, v. 215, p. 244-254, 2010.

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

ENDLER NS, KOCOVSKI NL. State and trait anxiety revisited. **J Anxiety Disord**, v. 15, n. 3, p. 231-45, 2001.

FIGUEIREDO, H.F; DOLGAS, C.M; HERMAN, J.P. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2534-2540, 2002.

FILE, S.E; GONZALEZ, L.E; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 397-405, 1998.

FILE, S. E. Potentiation of the effects of chlotpromazine on exploration in the rat by a prior experience of the drug. **Psychopharmacologia**, v29, p.357-363, 1973.

FREY, B.N. *et al.* Shift in the brain network of emotional regulation in midlife women: is the menopausal transition the turning point?. **Menopause**, v. 17, n. 4, p. 840-5, 2010.

FRYE, J.B. Modeling perimenopause in Sprague-Dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. **Comp Med**, v. 62, n. 3, p. 193-202, 2012.

GALEA, L.A., *et al.* Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 81, n. 3, p. 689-97, 1997.

GALEEVA, A., *et al.* Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. **Vitam Horm**, v. 82, p. 367-89, 2010.

GERVAIS, N.J., *et al.* The middle-aged ovariectomized marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model of menopausal symptoms: Preliminary evidence. **Neuroscience**, v. 9, p. 337:1-8, 2016.

GOLD, E.B.; *et al.* Longitudinal analysis of the association between vasomotor symptoms and race/ethnicity across the menopausal transition: study of women's health across the nation. **Am J Public Health**, v. 96, n. 7, p. 1226-35, 2006.

GRADY, C. The cognitive neuroscience of ageing. **Nat.Rev.Neurosci**, v. 13, p. 491-505, 2012.

GRIPPO, A.J.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiol Behav**, v.78, p.703-710, 2003.

GRØNLI, J; *et al.* Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. **Physiol Behav**, v. 31;84, n. 4, p. 571-7, 2005.

HALL, J.E. Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am**, v. 33, p. 637-659, 2004.

HALL JE. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women. **Semin Reprod Med**, v. 25, n. 5, p. 344-51, 2007.

HARLOW S.D. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop 1 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 4, p. 1159–68, 2012.

HARRO, J. Measurement of exploratory behavior in rodents. **Methods in neurosciences**. New York: Academic Press, v. 14, p. 359–377, 1993.

HOLMES A, *et al.* Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. **Genes Brain Behav**, v. 2, p. 365–80, 2003.

HU, X, *et al.* Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. **Biol. Reprod**, v. 65, p. 87-93, 2001.

IBRAHIM, W.W; *et al.* 17 β -Estradiol augments antidepressant efficacy of escitalopram in ovariectomized rats: Neuroprotective and serotonin reuptake transporter modulatory effects. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 74, p. 240-250, 2016.

IZQUIERDO I. Different forms of post-training memory processing. **Behav Neural Biol**, v. 51, n. 2, p. 171-202, 1989.

KENDLER K.S, THORNTON L.M, PRESCOTT C.A. Gender differences in the rates of exposure to stressful life events and sensitivity to their depressogenic effects. **Am J Psychiatry**, v. 158, p. 587–593, 2001.

KESSLER RC, *et al.* Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **J Affect Disord**, 29(2):85–96, 1993.

KOEBELE, S.V, *et al.* Cognitive changes across the menopause transition: A longitudinal evaluation of the impact of age and ovarian status on spatial memory. **Horm Behav**, v. 26;87, p. 96-114, 2016.

KLOET, E.R; MOLENDIJK, M.L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plast**, v. 2016. 6503162, 2016.

KRUIF, M; SPIJKER A.T; MOLENDIJK, M.L. Depression during the perimenopause: A meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 206, p. 174-180, 2016.

KUDIELKA, B.M, *et al.* Psychological and endocrine responses to psychosocial stress and dexamethasone/corticotropin-releasing hormone in healthy postmenopausal women and young controls: the impact of age and a two-week estradiol treatment. **Neuroendocrinology**, v. 70, n. 6, p. 422–430, 1999.

LAZAROV, O, *et al.* When neurogenesis encounters aging and disease. **Trends Neurosci**, v. 33, p. 569–579, 2010.

LAZARUS, R. Evolution of a model of stress, coping, and discrete emotions. **Handbook of stress, coping, and health: Implications for nursing research, theory, and practice**. Thousand Oaks, CA: Sage; 2000.

LINDHEIM, S.R, *et al.* Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. **Am J Obstet Gynecol**, v. 167, n. 6, p. 1831–1836, 1992.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180–5, 1987.

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

LUINE, V.N. Estradiol and cognitive function: past, present and future. **Horm Behav**, v. 66, n. 4, p. 602-18, 2014.

MACIEJEWSKI, P.K, *et al.* Sex differences in event-related risk for major depression. **Psychological Medicine**, v. 31, n. 4, p. 593-604, 2001.

MAHMOUD, R. *et al.* Ovarian hormones, but not fluoxetine, impart resilience within a chronic unpredictable stress model in middle-aged female rats. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 278-93, 2016.

MANN, J.J. The medical management of depression. **The New England Journal of medicine**, v. 353, n. 17, p. 1819–1834, 2005.

MASLOV, M.Y. Hemorheological effects of secoisolariciresinol in ovariectomized rats. **Biorheology**, v. 7, n. 53(1), p. 23-31, 2016.

MASMOUDI, J; *et al.* Postpartum depression: prevalence and risk factors. A prospective Study concerning 302 Tunisian parturients. **Tunis Med**, v. 92, n. 10, p. 615-21, 2014.

MATSUBARA, K.; MATSUSHITA, A. Changes in ambulatory activities and muscle relaxation in rats after repeated doses of diazepam. **Psychopharmacology**, v 77, p. 279-283, 1982.

MAURI, M. Sleep and the reproductive cycle: a review. **Health Care Women Int**, v.11, n. 4, p. 409-21, 1990.

MAYER, L.P. *et al.* The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol. Reprod**, v. 71, p. 130-138, 2002.

MAYER, L.P. *et al.* Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 6, p. 775-81, 2002.

MCEWEN, B.S. Stressed or stressed out: what is the difference?. **J Psychiatry Neurosci**, v. 30, p. 315–8, 2005.

MEZADRI, T. *et al.* Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200-205, 2011.

MITRA, R. *et al.* Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. **Neurosci Lett**, v. 383, n. 3, p. 278-83, 2005.

MORANO, M.I; VÁZQUEZ, D.M; AKIL, H. The role of the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the aged Fisher rat. **Mol Cell Neurosci**, v 5, n 5, p. 400-12, 1994.

MUHAMMAD, F.S. *et al.* Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague-Dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes. **Comp Med**, v. 59, n.1, p. 46-59, 2009.

MURPHY, J.M. *et al.* A 40-year perspective on the prevalence of depression: the Stirling County Study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 209-15, 2000.

NEWHOUSE P, ALBERT K. Estrogen, Stress, and Depression: A Neurocognitive Model. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 7, p. 727-9, 2015.

NOBLE, R.E. Depression in women. **Metabolism**, v. 54 (5 Suppl 1), p.49-52, 2005.

ORTIZ, J. *et al.* Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-452, 1996.

PAPP, M; WILLNER, P e MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, v. 104, n. 2, p. 255–259, 1991.

PELLOW, S; *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, p. 149–67, 1985.

PITERKIN, P. *et al.* A limited role for the hippocampus in the modulation of novel-object preference by contextual cues. **Learn Mem**, v.15, p. 785–79, 2008.

PRIOR, J.C; HITCHCOCK, C.L. The endocrinology of perimenopause: need for a paradigm shift. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 1, n. 3, p. 474-86, 2011.

REIS, F.M. *et al.* Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, p. 130-40, 2014.

RODGERS, R. J; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 801-810, 1997.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J. *et al.* Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, v. 68, p. 47-53, 1999.

RODRÍGUEZ ECHANDÍA *et al.* A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. **Physiol Behav**, v. 43, n. 6, p. 789-95, 1988.

SADLER, A.M; BAILEY, S.J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiol Behav**, v. 16, n. 167, p. 313-323, 2016.

SAPOLSKY, R. M. Stress, the Aging Brain, and the Mechanisms of Neuron Death. MIT Press, Cambridge, MA, 1992.

SCHINDLER, A.G. *et al.* 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.

SETEM, J. *et al.* Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plusmaze. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 62, p. 515-521, 1999.

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

SIKIRIC, P. *et al.* The antidepressant effect of an antiulcer pentadecapeptide BPC 157 in Porsolt's test and chronic unpredictable stress in rats. A comparison with antidepressants. **J Physiol Paris**, v. 94, n. 2, p. 99-104, 2000.

SŁOPIEN', R. *et al.* Depressive symptoms and hormonal profile in climacteric women. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 42, n. 3, p. 285-91, 2015.

SOCH, A, *et al.* Effects of exercise on adolescent and adult hypothalamic and hippocampal neuroinflammation. **Hippocampus**, v. 26, n. 11, p. 1435-1446, 2016.

SPINHOVEN, P, *et al.* The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. **Journal of Affective Disorders**, v. 126, n. 1-2, p. 103–112, 2010.

SPRINGER, L.N, *et al.* 1996. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in rats. **Reprod. Toxicol**, v. 10, p. 137-143, 1996.

SQUIRE, L.R. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. **Neurobiol Learn Mem**, v. 82, n. 3, p. 171-7, 2004.

STEPANICHEV, M.Y, *et al.* Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 76, n. 4, p. 324-333, 2016.

TER HORST, G.J., *et al.* Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones. **Physiol Behav**, v. 25,97, n. 2, p. 239-49, 2009.

TOUNG T.J; TRAYSTMAN R.J; HURN P.D. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. **Stroke**, v. 29, n. 8, p.1666-70, 1998.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. **Neurosci Biobehav**, v. 9, p. 203-222; 1985.

TURNER, B.B; WEAVER, D.A. Sexual dimorphism of glucocorticoid binding in rat brain. **Brain Res**, v. 343, n. 1, p. 16–23, 1985.

VAN KEMPEN, T.A., *et al.* Characterization of neural estrogen signaling and neurotrophic changes in the accelerated ovarian failure mouse model of menopause. **Endocrinology**, v. 155, n. 9, p. 3610-23, 2014.

VARGA, J., *et al.* Lack of vasopressin does not prevent the behavioural and endocrine changes induced by chronic unpredictable stress. **Brain Res Bull**, v. 15;84, n. 1, p. 45-52, 2011.

WALSH, T. J.; LAMB, R. L.; TILSON, H.A. A comparison of the effects of RO17-1788 and chlordiazepoxide on hot-plate latencies, acoustic startle and locomotor activity. **Psychopharmacology**, v. 88, p. 514-519, 1986.

WANG, C., *et al.* Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. **Toxicology**, v. 3, p. 341-343:56-64, 2016.

WANG, H., *et al.* Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2071–94, 2012.

WEISS, S. M. *et al.* Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neurosc. Biobehav**, v. 23, p. 265-71, 1998.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v.93, n.3, p.358-64, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Research on the Menopause in the 1990s: Report of WHO Scientific Group. Geneva: WHO; 1996.7

YOON, S.H; *et al.* Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 3, p. 263-8, 2014.

ZHANG, T; *et al.* The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 81, p. 223-232, 2016.

ZHANG, W.Y. *et al.* Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. **J. Pharm. Biomed**, v.70, p.534-538, 2012.

ZHENG, C.; ZHANG, T. Alteration of phase–phase coupling between theta and gamma rhythms in a depression-model of rats. **Cogn Neurodyn**, v.7, n.2, p.167-172, 2013.

ZHU, S; *et al.* Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. **Neuroreport**, v. 1;25, n. 14, p. 1151-5, 2014.

8- ANEXO

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00842

Título

Procedimentos para o uso de animais experimentais no Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução

Data de Entrada

20/12/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/05/2013

Considerações

Ofício nº 023/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(ã): Prof(a) Dr(a) Fernanda Barbosa Lima Christian, Depto. Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(s) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (Wistar) fêmeas.

- Procedência do animal: Biotério Central

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 03/08/2017

Data 07/05/2013

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

 
[Parecer01_PP00842.pdf](#) [Parecer02_PP00842.pdf](#)

 
[Resposta_Pesquisador_PP00842.pdf](#) [Parecer_Final_PP00842.pdf](#)