

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÁGATA KISS

EFEITO DO TRATAMENTO COM 17 β -ESTRADIOL SOBRE A MEMÓRIA E O
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO DE RATAS *Wistar* OVARIECTOMIZADAS
JOVENS, ADULTAS E DE MEIA-IDADE

CURITIBA

2010

ÁGATA KISS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM 17 β -ESTRADIOL SOBRE A MEMÓRIA O
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO DE RATAS *Wistar* OVARIECTOMIZADAS
JOVENS, ADULTAS E DE MEIA-IDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anete Curte Ferraz

CURITIBA

2010

Às pessoas que mais amo, Johnny, Roberto, Mafalda e Michele. Sem vocês, este sonho não teria se realizado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Johnny, pelo amor, por estar sempre ao meu lado e me apoiar incondicionalmente. Obrigada por sonhar comigo. *Ohne dich kann ich nicht sein...*

Aos meus pais Roberto e Mafalda, pelo amor incondicional, pelo incentivo e motivação, pelo apoio sempre. Obrigada por servirem de exemplo e serem meu porto seguro.

À minha irmã Michele, pela eterna amizade, carinho e amor.

À Prof^a. Dr^a. Anete Curte Ferraz pelos ensinamentos, pela amizade e permanente atenção, e por sua extrema dedicação. Obrigada pelas inestimáveis contribuições não somente a este trabalho, como também à minha pessoa.

À amiga Msc. Ana Márcia Delattre, pelo carinho, atenção e dedicação constante, e pela bela amizade que se fortificou ao longo deste trabalho. Obrigada por poder contar sempre com você!

Às colegas de laboratório que me acompanharam em todo o experimento, em especial às amigas Francesca, Giovana, Karin e Marcela, que me ensinaram e me auxiliaram nas técnicas experimentais utilizadas nesta pesquisa.

Às amigas Adelita, Anamaria e Deise, por me acompanharem desde nossa graduação e me incentivarem em mais uma jornada. Obrigada pelo carinho e pela amizade duradoura.

Às amigas Analúcia, Ana Paula, Beatrice e Carla, por me escutarem e me fazerem sorrir, pela amizade cultivada com muito carinho.

À Prof^a. Sônia Grötzner, pelo apoio, interesse e motivação.

Aos professores Dr. Fernando M. Louzada e Dr. Marcelo M.S. Lima, pelas críticas e contribuições na avaliação deste trabalho.

À mestranda Sofia R. Pereira, pelo auxílio, pela troca de experiências e pela dedicação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo ensino e incentivo, e pela oportunidade de crescimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Dalsenter, que gentilmente cedeu sua sala do biotério para a manutenção dos animais deste trabalho em ambiente circunspecto aos experimentos.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Fernandes, que permitiu a utilização dos equipamentos do seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Carolina Arruda, que prestativamente possibilitou a manutenção de minhas amostras em freezer – 80 °C.

Ao Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, que atenciosamente colaborou com a análise de resultados.

À Marlene, secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela atenção e presteza.

À Prof^a Dr^a Janete Anselmo-Franci e ao Dr. Rafael Escorsim Szawka, do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da USP Ribeirão Preto-SP, pela pronta colaboração nas análises.

Aos alunos do Departamento de Farmacologia, pela convivência amigável e prestativa.

A todos que trabalham no biotério central da UFPR, pelo cuidado com os nossos animais.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Du fliegst durch die Stadt wie ein sehr schweres Blatt
Deine Jacke ist mit Wind gefüllt
Deine Augen suchen Halt an populären Zeichen
Und du hast dich in Schweigen gehüllt
Du hast zweihundert Worte auf den Unterarm gekritzelt
Es sind sehr schöne Worte dabei
Und jetzt brauchst du nur noch ein gutes Erlebnis
Ein Jobangebot oder zwei*

*Und da sind sie die antiken Lampen
Die dein Bewusstsein so warm beleuchten
Und du siehst all die Leute und du bist dir sicher
Dass sie auch solche Lampen bräuchten*

*Sie wollen den Vertrag nicht verlängern
Sie schätzen sich dich nicht mehr so stark wie früher ein
Du denkst "Na, denen werd ich's zeigen"
Obwohl du weisst sie haben Recht*

*Mach sie an die antiken Lampen
Die dein Bewusstsein so warm beleuchten
Mach sie an die antiken Lampen
Von denen du glaubst, dass Sie alle bräuchten*

RESUMO

Evidências clínicas e experimentais propõem que o estrógeno tenha grande impacto sobre a função cognitiva já que o mesmo apresenta ação neurotrófica e de neuroproteção em regiões envolvidas na cognição. Desta forma, muitos estudos cogitam um potencial papel do estrógeno como fator de neuroproteção de distúrbios neurológicos, como o Transtorno Depressivo Maior, e neurodegenerativas, tais como a Doença de Alzheimer. Alguns trabalhos, porém, indicam que certos regimes de tratamento hormonal podem ter efeito nulo ou até mesmo agravante sobre funções cognitivas e neurológicas em mulheres. Tendo isto em mente, o presente estudo avaliou os efeitos do tratamento crônico com 17β -estradiol sobre funções cognitivas e comportamento depressivo de ratas *Wistar* ovariectomizadas jovens, adultas, e de meia-idade, bem como a relação destas funções e comportamentos a alterações nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico. O tratamento com 17β -estradiol não influenciou a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais experimentais em nenhuma faixa etária, mas foi capaz de melhorar o desempenho da memória de referência espacial de ratas adultas e de meia-idade, sendo este grupo mais rapidamente responsivo ao tratamento estrogênico. Além disso, o tratamento com 17β -estradiol produziu ação benéfica sobre o comportamento depressivo de ratas adultas, as quais apresentaram diminuído tempo de imobilidade frente ao teste da natação forçada. Neste mesmo teste, os animais adultos também apresentaram aumentado comportamento de natação, caracteristicamente controlado por via serotoninérgica, e avaliações neuroquímicas confirmaram que o tratamento com 17β -estradiol foi capaz de aumentar a taxa de *turnover* de serotonina hipocampal nos animais desta faixa etária. Por fim, os dados deste trabalho apóiam o conceito de que os efeitos benéficos do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória de referência espacial e o comportamento depressivo de roedores dependam de uma janela temporal ótima para serem evidenciados.

Palavras-chave: estradiol, cognição, memória, depressão, tratamento de reposição hormonal

ABSTRACT

Clinical and experimental evidence suggest that estrogens have a major impact over cognition, since they present neurotrophic and neuroprotective actions in regions involved in such function. Therefore, a potential role for estrogens as a neuroprotection factor for neurologic and neurodegenerative disorders has been proposed. In opposite, some studies indicate that certain hormone therapy regimens may provoke null or even detrimental effects over female cognitive and neurological function. For that matter, this study assessed the effects of chronic 17β -estradiol treatment over cognition and depressive-like behaviors of young, adult and middle-aged female ovariectomized *Wistar* rats. Also, these functions were correlated with alterations in the serotonergic and noradrenergic systems. 17β -estradiol treatment did not influence animals' locomotor activity and exploratory behavior, although it was able to improve the performance of adult and middle-aged rats in a spatial reference memory task, the latter being more responsive to the treatment. 17β -estradiol also showed beneficial effects over the depressive-like behavior in adult rats, which displayed decreased immobility time in the forced swim test. This same test revealed increased swimming behavior, triggered by serotonergic pathway, in adult rats. Neurochemical evaluations indicated that 17β -estradiol treatment was able to increase serotonin turnover rate in the hippocampus of adult rats, correlating behavioral and neurochemical results. These findings support the notion that the beneficial effects of 17β -estradiol over spatial reference memory and depressive-like behavior are evident only when hormone therapy occurs within a critical period.

Keywords: estradiol, cognition, memory, depression, hormone replacement therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	MOLÉCULA DE 17 β -ESTRADIOL.....	17
FIGURA 2 -	SÍNTESE DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES A PARTIR DE SEU PRECURSOR, COLESTEROL.....	18
FIGURA 3 -	PROCESSOS DE MEMÓRIA.....	24
FIGURA 4 -	CIRCUITARIA NEURAL DA DEPRESSÃO.....	31
FIGURA 5 -	ENVOLVIMENTO DO HIPOCAMPO NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO.....	33
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	45
FIGURA 7 -	CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE 17B-ESTRADIOL DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO.....	54
FIGURA 8 -	ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO NO TESTE DE HABITUAÇÃO.....	57
FIGURA 9 -	ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO NO TESTE DE HABITUAÇÃO.....	58
FIGURA 10 -	DESEMPENHO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS TRATADOS COM ESTRÓGENO OU ÓLEO DE MILHO QUANDO SUBMETIDOS AO TESTE DE MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	61

- FIGURA 11 - TEMPO DE LATÊNCIA DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO NO ÚLTIMO DIA DE TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS62
- FIGURA 12 - DESEMPENHO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO FRENTE AO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA COM RELAÇÃO AO TEMPO DE NATAÇÃO, DE IMOBILIDADE E DE ESCALADA63
- FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE NORADRENALINA (NA) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO65
- FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA (5-HT) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO66
- FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DO METABÓLITO DA SEROTONINA (5-HIAA) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO67
- FIGURA 16 - TAXA DE *TURNOVER* SEROTONINÉRGICO NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS, ADULTOS E DE MEIA-IDADE DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TIPOS DE MEMÓRIA, DEFINIDOS COM RELAÇÃO A TEMPO DE RETENÇÃO E NATUREZA	25
TABELA 2 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	28
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE 17B-ESTRADIOL NO PLASMA DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO.....	53
TABELA 4 - COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO QUANDO EXPOSTOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3β -HSD – 3β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase
 5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético
 5-HT – 5-hidroxitriptamina – Serotonina
 5-HT₁₋₇ – Famílias de receptores para Serotonina
 AD – Animais adultos
 ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
 ANOVA – Análise de Variância
 ATP – Adenosina Trifosfato
 BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-derived Neurotrophic Factor*)
 C – Animais controle
 CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
 DA – Doença de Alzheimer
 DG – Giro denteado
 DHEA – Dehidroepiandrosterona
 DOP – Dopamina
 DP – Doença de Parkinson
 DR – Rafe dorsal
 DSM-IV – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
 EPM – Erro Padrão da Média
 ER α – Receptor alfa de estrógeno
 ER β – Receptor beta de estrógeno
 ERs – Receptores intracelulares de estrógeno
 HP – Hipocampo
 HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
 HPLC-ED – Cromatografia Líquida de Alta Precisão com Detecção Eletroquímica
 IGF-1 – Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*)
 i.m. – Intramuscular
 J – Animais jovens
 LC – Locus coeruleus
 MI – Animais de meia-idade
 MAO – Monoamina Oxidase
 NA – Noradrenalina
 NAC – Núcleo accumbens
 NGF – Fator de Crescimento Neural (*Nerve Growth Factor*)
 OVX-E – Animais ovariectomizados com implante de cápsula de 17β -estradiol
 OVX-O – Animais ovariectomizados com implante de cápsula de óleo de milho
 PFC – Córtex Pré-Frontal
 RIA – Radioimunoensaio
 s.c. – Subcutâneo
 SNC – Sistema Nervoso Central
 SNRIs – Inibidores de recaptção seletiva de Noradrenalina (*Selective Noradrenaline Reuptake Inhibitors*)
 SSRIs – Inibidores de recaptção seletiva de Serotonina (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*)
 StaR – Proteína regulatória aguda esteroidogênica (*Steroidogenic acute Regulatory*)

TDM – Transtorno Depressivo Maior
VTA – Área Tegmentar Ventral
WHI – *Women's Health Initiative*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRÓGENO

1.1.1 Fisiologia do estrógeno..... 16

1.1.2 Estrógeno e sistema nervoso..... 20

1.1.2.1 Receptores intracelulares de estrógeno (ERs) e sistema nervoso 22

1.2 MEMÓRIA

1.2.1 Definição..... 23

1.2.2 Neurobiologia da memória..... 25

1.3 DEPRESSÃO

1.3.1 Definição..... 27

1.3.2 Teoria monoaminérgica da depressão 28

1.3.3 Circuitaria neural da depressão 30

1.3.4 Tratamento da depressão 34

1.4 INTERAÇÕES ENTRE ESTRÓGENO, MEMÓRIA E DEPRESSÃO

1.4.1 Estrógeno e memória..... 35

1.4.2 Estrógeno e depressão..... 37

1.4.3 Memória e depressão 39

2 JUSTIFICATIVA..... 41

3 OBJETIVOS..... 42

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS 43

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS 43

4.3 OVARECTOMIA E TRATAMENTO HORMONAL 44

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Campo aberto..... 45

4.4.2 Habituação 46

4.4.3 Labirinto aquático de Morris..... 47

4.4.4 Natação forçada modificada 49

4.5 DOSAGEM HORMONAL..... 50

4.6 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA..... 50

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 51

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM HORMONAL	53
5.2 CAMPO ABERTO	54
5.3 HABITUAÇÃO	
5.3.1 Atividade locomotora	56
5.3.2 Atividade exploratória	56
5.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	
5.4.1 Memória de referência espacial	59
5.4.2 Tempo de latência	59
5.5 NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA	60
5.6 ANÁLISE NEUROQUÍMICA	64
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	80
8. REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O estrógeno é classicamente considerado um sinal hormonal importante que regula vários tecidos e funções corporais. Além disso, evidências clínicas e experimentais mostram que tal hormônio tenha grande impacto sobre a função cognitiva por apresentar ação neurotrófica e de neuroproteção em determinadas regiões encefálicas, tais como hipocampo, córtex e estriado. Desta forma, um potencial papel do estrógeno como fator de neuroproteção de doenças neurológicas, como o Transtorno Depressivo Maior, e neurodegenerativas, tais como Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), tem sido cogitado por muitos estudos (BRANN *et al.*, 2007; TALBOOM *et al.*, 2008).

Distúrbios neurodegenerativos como DP e DA normalmente são acompanhadas por outros estados, tais como ansiedade e depressão. A presença de comorbidades pode não apenas complicar o tratamento, mas também limitar a recuperação de patologias co-ocorrentes. Portanto, estudos que definam alguns dos processos compartilhados por comorbidades podem oferecer melhor compreensão de mecanismos subjacentes, além de fornecer indicações importantes para eficiente tratamento profilático e terapêutico (ANISMAN *et al.*, 2008b). Este tópico representa uma área promissora para a pesquisa biomédica, e aplicações potenciais do estrógeno estão relacionadas a novas estratégias terapêuticas para o combate ao envelhecimento, a eventos neurodegenerativos e respectivas patologias co-ocorrentes (MELCANGI; PANZICA, 2006).

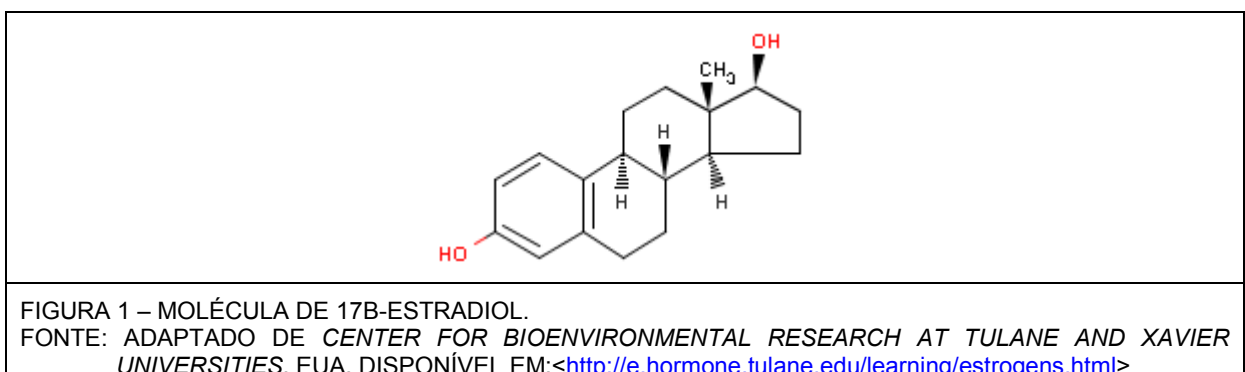
1.1 ESTRÓGENO

1.1.1 Fisiologia do estrógeno

Um grande número de diferenças cognitivas relacionadas ao sexo tem sido observado em estudos envolvendo tarefas cognitivas não apenas com animais, mas também em humanos (SUTCLIFFE *et al.*, 2007; LORD *et al.*, 2008). Tal observação

tem, logicamente, suscitado a questão da variação hormonal entre gêneros, e trabalhos sobre este tema vêm contribuindo de modo construtivo ao mundo científico. Em se tratando mais especificamente da fisiologia reprodutiva feminina, os dois tipos de hormônios sexuais ovarianos, estrógeno e progesterina, têm sido exaustivamente estudados. Estradiol (FIGURA 1), considerado o principal tipo de estrógeno, e progesterona, o principal tipo de progesterina (SCHUMACHER *et al.*, 2003; GUYTON; HALL, 2005; MICEVYCH *et al.*, 2008; MORISSETTE *et al.*, 2008), são os hormônios sexuais femininos essenciais para um normal fenótipo feminino, maturação sexual, funcionamento dos órgãos genitais, assim como para a manutenção do esqueleto (BIRZNIECE *et al.*, 2006).

Na mulher adulta, as principais fontes de estradiol são, classicamente, as células da granulosa do folículo em desenvolvimento. Os hormônios sexuais são, portanto, sintetizados nas gônadas, ligam-se a proteínas plasmáticas e alcançam o encéfalo via circulação sanguínea (MELCANGI; PANZICA, 2006; HOJO *et al.*, 2008), e as concentrações destes hormônios esteróides no plasma variam ao longo do ciclo menstrual (BIRZNIECE *et al.*, 2006). Uma vez os hormônios esteróides serem lipofílicos e terem um baixo peso molecular, estradiol e progesterona cruzam prontamente a barreira hematoencefálica e se tornam disponíveis para suas ações em locais-alvo que possuem os receptores apropriados, dentre eles o encéfalo (SCHUMACHER *et al.*, 2003; BIRZNIECE *et al.*, 2006; MICEVYCH; SINCHAK, 2008).



Nas gônadas, a síntese de hormônios esteróides (FIGURA 2) começa pela clivagem de cadeias laterais do colesterol por ação da enzima P450sc (cytochrome

P450side-chain cleavage), localizada por toda a membrana mitocondrial interna. Como consequência, o precursor colesterol é convertido a pregnenolona. No retículo endoplasmático liso, pregnenolona é desidrogenada a progesterona pela enzima 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase), e ainda pode ser sucessivamente convertida a 17-OH-pregnenolona e a dehidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima 17 α -hidroxilase/17,20-liase. DHEA é convertida a androstenediona pela ação da 3 β -HSD, e subseqüentemente a testosterona pela 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase. A enzima aromatase converte testosterona a estradiol e representa o último passo da síntese deste esteróide (RUNE; FROTSCHER, 2005; MICEVYCH; SINCHAK, 2008; MICEVYCH *et al.*, 2008).

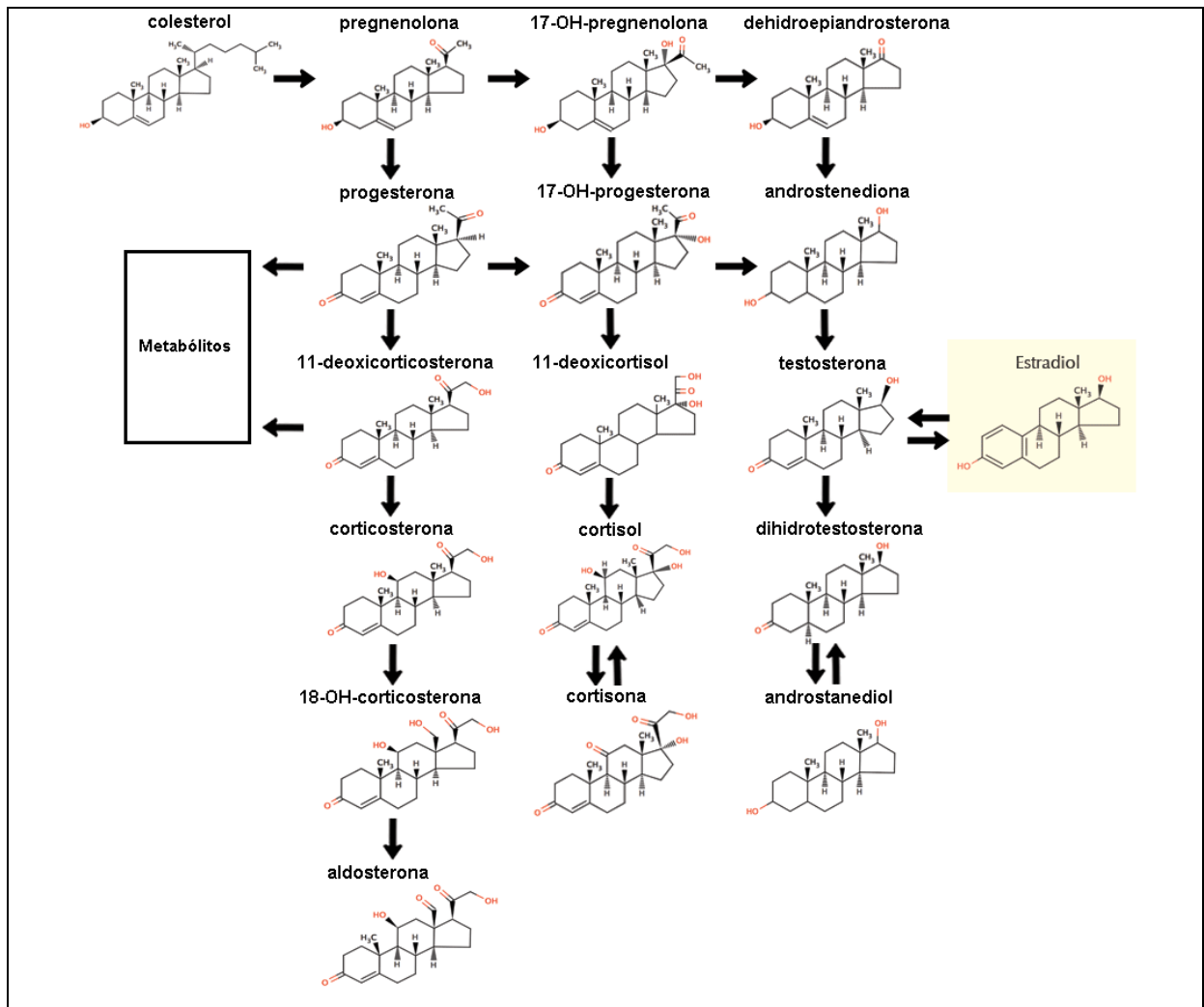


FIGURA 2 – SÍNTESE DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES A PARTIR DE SEU PRECURSOR, COLESTEROL. FONTE: ADAPTADO DE CENTER FOR BIOENVIRONMENTAL RESEARCH AT TULANE AND XAVIER UNIVERSITIES, EUA. DISPONÍVEL EM: <<http://e.hormone.tulane.edu/learning/estrogens.html>>

Um avanço no entendimento do papel dos hormônios esteróides sobre o encéfalo de roedores foi a descoberta da chamada “conversão periférica”, a partir da qual androgênios podem ser convertidos localmente em estrógeno, e desta forma agir sobre o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (MELCANGI; PANZICA, 2006). Além disso, trabalhos recentes indicam que a síntese endógena local de estrógeno também ocorre em certas áreas encefálicas de mamíferos, tais como o hipocampo. Desta forma, o estradiol tem sido classificado como um neuroesteróide, classicamente definido por Baulieu (1991) como qualquer esteróide sintetizado no SNC e periférico, em astrócitos e neurônios (BIRZNIECE *et al.*, 2006; HOJO *et al.*, 2008; MICEVYCH; SINCHAK, 2008). De acordo com Schumacher e colaboradores (2003), existem pelo menos dois requisitos para se qualificar um esteróide como um neuroesteróide. O primeiro é a persistência deste esteróide no sistema nervoso mesmo na ausência de glândulas endócrinas que sintetizam hormônios esteróides. O segundo requisito é a expressão e a atividade de enzimas envolvidas na síntese local deste esteróide. Ainda segundo Micevych e Sinchak (2008), determinadas características dos neuroesteróides permitem que os mesmos sejam classificados também como neurotransmissores: são sintetizados no encéfalo, sua síntese e seus níveis são regulados e eles influenciam a atividade neuronal por modularem vias de sinalização intracelular, canais e transcrição.

A descoberta de Baulieu e colaboradores adicionou mecanismos parácrinos e/ou autócrinos à lista de modos como os esteróides podem regular o funcionamento encefálico, além dos mecanismos endócrinos (RUNE; FROTSCHER, 2005; MELCANGI; PANZICA, 2006). A presença de várias enzimas formadoras de esteróide, juntamente com a recente descoberta da proteína StaR (*Steroidogenic acute Regulatory*) no encéfalo, sugerem que a síntese *in situ* de esteróides no cérebro possa começar diretamente a partir de seu precursor, o colesterol, e que a esteroidogênese é um processo generalizado no SNC (MELCANGI; PANZICA, 2006). Uma vez o colesterol circulante não ser capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, o precursor colesterol pode ser fornecido por biossíntese ou pode ainda ser derivado de lipoproteínas de baixa densidade em muitas células do sistema nervoso (HOJO *et al.*, 2008; MICEVYCH; SINCHAK, 2008). StaR é uma proteína responsável pelo transporte do colesterol para a mitocôndria, considerada por isso a molécula passo-limitante da biossíntese de esteróides (RUNE; FROTSCHER, 2005). As enzimas necessárias para a síntese do estradiol, P450 17 α

e P450 aromatase, estão localizadas em neurônios hipocâmpais não somente no retículo endoplasmático, como também na região pré-sináptica e na região pós-sináptica de neurônios piramidais nas regiões CA1 e CA3, além de em neurônios granulares do giro denteado, sugerindo a síntese sináptica de estrogênio (HOJO *et al.*, 2008).

Todas estas observações indicam que o sistema nervoso é alvo de dois diferentes grupos de esteróides, um vindo das glândulas periféricas (*i.e.* hormônios esteróides) e o segundo se originando diretamente no sistema nervoso (*i.e.* neuroesteróides) (MELCANGI; PANZICA, 2006; MICEVYCH; SINCHAK, 2008). Entretanto, em muitas circunstâncias é difícil discriminar se um efeito do esteróide é devido à síntese *in situ*, a hormônios periféricos, ou ainda à ativação enzimática de esteróides em metabólitos mais ativos, os quais em alguns casos utilizam um diferente mecanismo de ação. Logo, alguns investigadores preferem o uso do termo “esteróides neuroativos”, como uma forma genérica de referência à ação destes hormônios no encéfalo (MELCANGI; PANZICA, 2006).

1.1.2 Estrogênio e sistema nervoso

A ação dos esteróides ovarianos não está limitada a neuroendocrinologia e comportamento reprodutivos, mas também engloba profundos efeitos sobre vários outros órgãos que não os reprodutores, incluindo o SNC (AMANTEA *et al.*, 2005). Sugere-se que várias ações dos esteróides gonadais seriam responsáveis pelos efeitos benéficos destes hormônios no encéfalo, incluindo modulação de sinaptogênese, proteção contra apoptose, atividade anti-inflamatória, e fluxo sanguíneo cerebral aumentado (AMANTEA *et al.*, 2005; PROKAI; SIMPKINS, 2007). Estes hormônios podem induzir mudanças permanentes na arquitetura de circuitos nervosos, incluindo alterações no número de células, na densidade de conexões axonais e na arquitetura dendrítica. Como consequência, os esteróides também influenciam profundamente o estabelecimento de comportamentos relacionados (MELCANGI; PANZICA, 2006).

Os mecanismos para se alcançar tais efeitos são muitos e têm sido amplamente estudados em uma variedade de sistemas de modelos experimentais

baseados em espécies de vertebrados (MELCANGI; PANZICA, 2006). Evidências clínicas e experimentais indicam que os hormônios esteróides atuam sobre o funcionamento cerebral, têm a habilidade de influenciar as propriedades estruturais das regiões cerebrais subjacentes à aprendizagem e à memória, agindo sobre a cognição e o humor, bem como apresentam efeitos neuroprotetores (BIRZNIECE *et al.*, 2006; SUTCLIFFE *et al.*, 2007). Um recente trabalho desenvolvido por Lord e colaboradores (2008) apóia um papel neuroprotetor do estrógeno sobre o volume hipocampal durante o processo de envelhecimento. Ainda, uma excelente revisão de Melcangi e Panzica (2006) sobre estudos envolvendo o tratamento com estrógeno e seus efeitos aponta resultados eficazes do estrógeno na proteção do desenvolvimento de DA em modelos animais, na reação neuroinflamatória, na sobrevivência neuronal e na neuroproteção em um modelo animal de DP, bem como na neuroproteção frente a dano hipocampal epiléptico induzido.

Os mecanismos subjacentes aos efeitos do estrógeno ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, acredita-se que estes sejam primariamente mediados através da ativação de receptores intracelulares de estrógeno (ERs), ER α e ER β , distribuídos em vários órgãos tais como útero, mama, ovário, pulmão e rim, além de serem encontrados nos ossos e pelo encéfalo. O hormônio 17 β -estradiol se liga igualmente a ambos subtipos de receptores, e a ativação de ERs, por sua vez, resulta na modulação da transcrição de genes alvo pelo estrógeno (AMANTEA *et al.*, 2005; BIRZNIECE *et al.*, 2006; ÖSTERLUND, 2009), dentre eles fatores neurotróficos que favorecem diretamente funções importantes dos neurônios como o fator de crescimento neural (*nerve growth factor* – NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), neurotrofinas 3 e 4, além do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*insulin-like growth factor 1* – IGF-1), bem como seus receptores (PROKAI; SIMPKINS, 2007).

Além de sua capacidade de produzir ações genômicas diretas, o estrógeno também pode agir no SNC via receptores não-nucleares, caracterizados por proteínas semelhantes à ER associadas à membrana plasmática ou ainda por ER dispersos no citoplasma. Estes complexos estrógeno-ER podem funcionar como moléculas sinalizadoras citoplasmáticas (PROKAI; SIMPKINS, 2007), ativando vias envolvidas em rápidas ações não-genômicas do estrógeno sobre o funcionamento cerebral, bem como sobre a neuroproteção e a sobrevivência neuronal (AMANTEA *et al.*, 2005; SHERWIN, 2005; ZHAO; BRINTON, 2007). Deste modo, também, estes

receptores podem rapidamente afetar a fisiologia celular por meio de ativação de segundos mensageiros, potencializando sua ação genômica (MELCANGI; PANZICA, 2006). Adicionais efeitos de neuroproteção, tais como a ação antioxidante do estradiol, também não dependem de ER (PROKAI; SIMPKINS, 2007). Sendo assim, a atividade das enzimas envolvidas na síntese de estradiol pode ser regulada por modificações transcricionais induzidas por esteróides a longo prazo (horas ou dias), assim como por rápidos mecanismos não-genômicos (dentro de minutos) tais como variações na concentração de Ca^{++} e Mg^{++} , ou ATP. Estes dois modos de controle fornecem variações na disponibilidade local de estrógeno e combinam bem a clássica ação genômica e a não-genômica deste esteróide sobre circuitos neuronais e comportamentos relacionados (MELCANGI; PANZICA, 2006).

1.1.2.1 Receptores intracelulares de estrógeno (ERs) e sistema nervoso

Recentemente, o uso de camundongos nocaute e ligantes seletivos têm servido como ferramentas no estudo dos subtipos de ERs, o que por sua vez tem levado a uma melhor compreensão neste campo (ÖSTERLUND, 2009). Tanto ER α como ER β contribuem para mecanismos neuronais que levam à promoção do funcionamento neuronal pelo estrógeno, com perfis de sinalização característicos, e ambos os receptores desempenham um papel igualmente importante na mediação da neuroproteção por este hormônio (ZHAO; BRINTON, 2007). Pesquisas que têm investigado o efeito do estrógeno sobre funções cognitivas comprovam que, no encéfalo, os ERs estão localizados predominantemente no sistema límbico, em regiões como amígdala, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (SUTCLIFFE *et al.*, 2007). Tanto ER α quanto ER β são encontrados nestas áreas, mas o padrão de expressão destes dois subtipos é distinto e está muito bem revisado por Österlund (2009). ER α e ER β são detectados em níveis baixos a moderados no córtex entorrinal, sendo que o córtex cingulado e o pré-frontal medial apresentam predominância de ER β . Ambos os subtipos estão presentes ainda na amígdala e no hipotálamo, mesmo embora com padrões de distribuição diferentes e variações espécie-específicas entre humanos e roedores. Estas áreas são ricas em ER α , especialmente em núcleos envolvidos no sistema reprodutivo. Porém, em

roedores, ER β é primariamente expresso no núcleo paraventricular e supraóptico do hipotálamo e no núcleo medial da amígdala. Já em humanos, a expressão geral de ER β nestas regiões é um tanto quanto baixa (ÖSTERLUND, 2009). No hipocampo, tanto ER α como ER β estão expressos nas regiões CA1–3 e no giro denteado (ÖSTERLUND, 2009), e a razão ER α /ER β é notavelmente alta em primatas e roedores (SHERWIN, 2005).

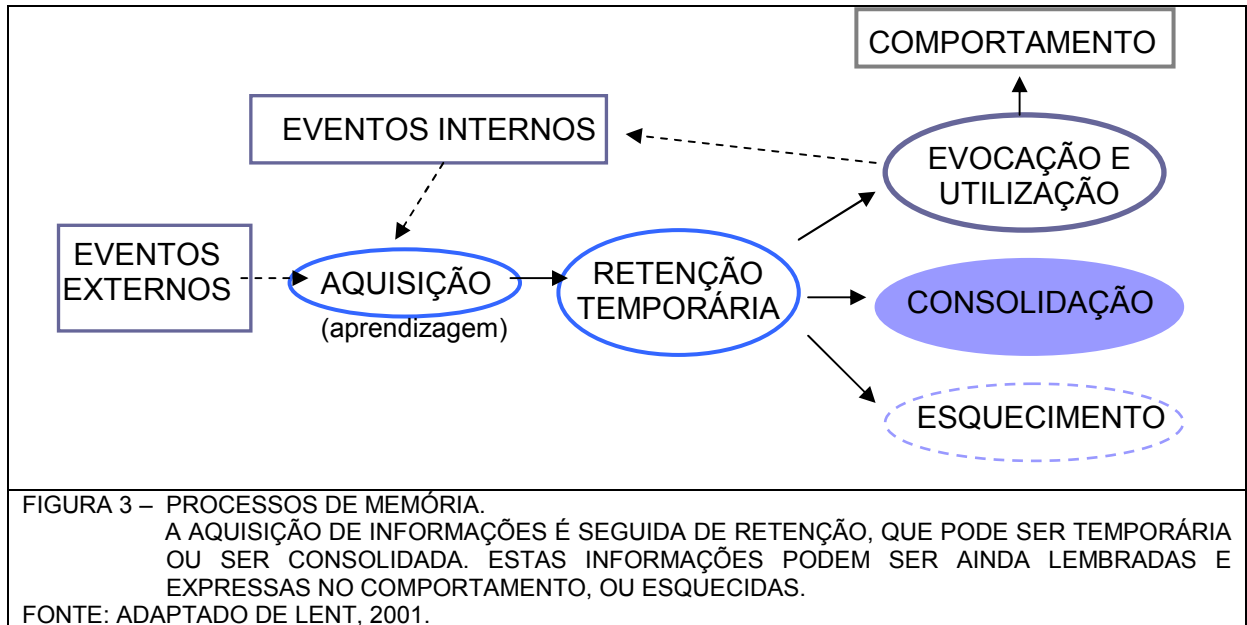
A revisão de Österlund (2009) ainda traz estudos referentes a ambos os subtipos de ER, os relacionando à plasticidade sináptica e a desempenho cognitivo. A ativação de ER β por meio de agonistas seletivos para tal subtipo de ER, por exemplo, promoveu aumentos na expressão de proteínas sinápticas como sinaptofisina, e a subunidade GluR1 do receptor AMPA no hipocampo de camundongos. Além disso, experimentos *in vivo* com neurônios hipocampais mostram que a ativação de ER β foi hábil em aumentar potenciação de longa duração em secções hipocampais e em induzir mudanças morfológicas, tais como aumento na ramificação dendrítica e densidade de espinhos dendríticos, nestas células (ÖSTERLUND, 2009). Desta forma, acredita-se que ER α e ER β também estejam envolvidos no processamento emocional e na cognição (SHERWIN, 2005).

1.2 MEMÓRIA

1.2.1 Definição

A memória pode ser definida como a capacidade que o homem e os animais têm de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Dentro desta ampla capacidade, são vários os processos de memória. O primeiro deles é o processo de aquisição de informações (aprendizagem), seguido da retenção, a qual pode durar por tempos curtos ou ainda pode ser transformada em retenção de longa duração pelo processo de consolidação da memória. Em ambos os casos, entretanto, pode haver o processo de evocação (lembrança) ou esquecimento das informações memorizadas (LENT, 2001) (FIGURA 3). O curso do tempo de consolidação da memória parece variar

amplamente dependendo dos parâmetros das tarefas de aprendizado e das estruturas encefálicas envolvidas (MEDINA *et al.*, 2008).



São vários também os tipos e subtipos de memória, definidos com relação a tempo e natureza (TABELA 1). Levando em conta o tempo de retenção, pode-se qualificar a memória ultra-rápida (que dura por um curtíssimo período de tempo), a memória de curta duração e a de longa duração. Já quanto à natureza podemos classificar as memórias em implícita (não-declarativa), explícita (declarativa) e operacional. A memória implícita é a memória dos hábitos, procedimentos e regras, a memória de representação perceptual, a aprendizagem associativa e não-associativa; formas de memória que não podem ser descritas facilmente com palavras. Ao contrário, a memória explícita pode ser descrita com palavras, e consiste em um subtipo chamado episódico (a memória dos fatos que ocorrem ao longo do tempo), um chamado semântico (a memória dos conceitos atemporais) e um subtipo espacial (a memória das informações espaciais). A memória espacial envolve a habilidade de lembrar o arranjo espacial de um ambiente por meio da formação de um mapa espacial no encéfalo. Assim, a memória espacial permite saber a localização de objetos, de si mesmo, além de utilizar-se destas informações para possibilitar o movimento de um lugar para outro. Finalmente, a memória

operacional é a que nos serve para utilização rápida no raciocínio e no planejamento do comportamento (LENT, 2001; BIRZNIECE *et al.*, 2006).

TABELA 1 – TIPOS DE MEMÓRIA, DEFINIDOS COM RELAÇÃO A TEMPO DE RETENÇÃO E NATUREZA, ADAPTADO DE LENT, 2001.

Tempo de Retenção	Natureza
Ultra-rápida	Explícita / Declarativa
Curta duração	Episódica
Longa duração	Semântica
	Espacial
	Implícita / Não-declarativa
	Representação perceptual
	Procedimento
	Associativa
	Não-associativa
	Operacional

A memória é uma das funções incluídas no termo “cognição”, o qual representa a totalidade de processamento de informações. A cognição, então, é multidimensional e compreende, além da memória, outras funções como atenção, padrão de reconhecimento, aprendizado, processamento de linguagem, resolução de problemas, pensamento abstrato, e ainda funcionamento intelectual mais complexo, bem como habilidades psicomotoras. A memória, em seus tipos e subtipos, é considerada um aspecto crítico da cognição, e é caracterizada por numerosos processos em diferentes regiões encefálicas (SHERWIN; HENRY, 2008).

1.2.2 Neurobiologia da memória

Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos, e atualmente postula-se que não exista um único centro de memória (MEDINA *et al.*, 2008). Considera-se que as informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais, de acordo com a sua função: memórias motoras no córtex motor, memórias visuais no córtex visual, e assim por diante. Dessas regiões, elas podem ser mobilizadas como memória operacional pelas áreas pré-frontais, em

ligação com áreas do córtex parietal e occipitotemporal. Além disso, as memórias explícitas podem ser consolidadas pelo hipocampo e áreas corticais adjacentes do lobo temporal medial, em conexão com núcleos do tálamo e do hipotálamo. Estudos mostram que, em hipocampo de ratos, células piramidais respondem quando o rato está em um local particular no ambiente. Células hipocámpais de primatas parecem representar campos visuais espaciais, onde neurônios respondem seletivamente conforme o animal vê uma determinada região do meio. Assim, cogita-se o envolvimento do hipocampo com a memória das informações espaciais (BIRZNIECE *et al.*, 2006). Por fim, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, especialmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdalóide do lobo temporal (LENT, 2001). O sistema límbico do encéfalo (hipocampo, amígdala, septo, córtex entorrinal, entre outros) está fortemente envolvido na percepção de emoções e análise, sugerindo, portanto, uma poderosa relação entre situações emocionais e memórias mais duradouras (BIRZNIECE *et al.*, 2006).

Dado que diferentes regiões do encéfalo estão envolvidas no processamento de memória, provavelmente lidando com diferentes tipos de informação do novo material aprendido, acredita-se não haver razão para se visualizar a consolidação de memórias como um único evento dependendo de uma determinada região cerebral. Portanto, para um melhor entendimento do armazenamento de memória, é preciso avaliar separadamente as contribuições temporais das diferentes regiões cerebrais envolvidas no processamento de uma experiência aprendida (MEDINA *et al.*, 2008).

A consolidação da memória não é um processo único, e um grande número de evidências demonstra que grupos de células trabalham juntos para representar a informação no encéfalo (MEDINA *et al.*, 2008). Vários mecanismos celulares e moleculares foram propostos como bases biológicas da memória: são os mecanismos da plasticidade sináptica e outros fenômenos de modificação dinâmica da função e da forma do sistema nervoso, em resposta às alterações do ambiente (LENT, 2001). A consolidação sináptica envolve diferentes eventos moleculares, incluindo a ativação de várias cascatas de sinalização em específicas regiões cerebrais. Atenção tem sido focada em estruturas do lobo medial temporal, especialmente em algumas subregiões do hipocampo. Tipicamente, ativação destas cascatas no hipocampo é iniciada por ativação de receptores ionotrópicos, incluindo AMPA e NMDA, receptores metabotrópicos, e particularmente receptores de BDNF e

para monoaminas. O acionamento destas cascatas é seguido pelo recrutamento de sistemas de segundos mensageiros e ativação de diferentes proteínas quinases e fosfatases (IZQUIERDO *et al.*, 2006). Isto, por sua vez, leva à ativação de transcrição e tradução e, em última instância, à síntese de proteínas necessárias para mudanças funcionais e estruturais (MEDINA *et al.*, 2008). Sendo assim, durante a formação da memória, acredita-se que a síntese protéica seja necessária para transformar a informação recentemente aprendida em modificações sinápticas estáveis.

1.3 DEPRESSÃO

1.3.1 Definição

Dentre os distúrbios de humor, a depressão é atualmente considerada como a mais prevalente (LLEDO, 2009). Formas severas de depressão afetam 2%–5% da população dos Estados Unidos, e até 20% da população deste país sofre de formas mais leves da doença (NESTLER *et al.*, 2002). No Brasil, os números oficiais ainda são escassos. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que, em 2003, quase 30% da população brasileira reportou ser portadora de pelo menos uma doença crônica, dentre elas a depressão.

Desde os anos 60, a depressão tem sido diagnosticada como Transtorno Depressivo Maior (TDM) com base em critérios sintomáticos descritos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-IV*, 2002) (TABELA 2). A partir destes critérios, pode-se evidenciar que o diagnóstico da depressão não é feito com base em testes diagnósticos objetivos, mas sim através de um conjunto de sintomas altamente variável. Portanto, muitos pesquisadores alegam que a depressão deveria ser vista como uma síndrome heterogênea composta por numerosas fisiopatologias e doenças de causas distintas (NESTLER *et al.*, 2002). A depressão pode alterar severamente a vida do indivíduo por afetar o apetite, o sono, o trabalho e as relações sociais do mesmo (LLEDO, 2009). Além disso, o TDM é recorrente,

ameaça à vida devido ao risco de suicídio, e é considerado uma das principais causas de morbidade (GARNER *et al.*, 2009).

Muitos autores sugerem que o TDM possa estar relacionado a múltiplas variações neuroquímicas, as quais por sua vez podem atuar, ou não, independentemente uma das outras. Enquanto alguns destes distúrbios neuroquímicos representam alterações em série, como a indução de cascatas neuronais, por exemplo, outros podem revelar processos paralelos possivelmente originados de instigadores comuns (e.g., estressores, ou experiências anteriores). Com relação a estes possíveis gatilhos, estudos indicam que tais eventos estressantes podem favorecer o desenvolvimento de distúrbios neuroquímicos que conseqüentemente promovam o surgimento ou a exacerbação de sintomas depressivos (ANISMAN *et al.*, 2008a).

TABELA 2 – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR, ADAPTADO DE DSM-IV, 2002.
Humor deprimido
Irritabilidade
Baixa auto-estima
Sentimentos de desamparo, culpa e falta de valor
Diminuída habilidade de concentração e cognitiva
Apetite diminuído ou aumentado
Ganho ou perda de peso
Insônia ou excesso de sono
Pouca energia, fadiga, ou agitação aumentada
Diminuído interesse em estímulos prazerosos (e.g. alimentação, interações sociais, sexo)
Pensamentos recorrentes de morte e/ou suicídio
Um diagnóstico de Transtorno Depressivo Maior é feito quando certo número dos sintomas acima é reportado por mais de duas semanas, e quando os sintomas influenciam a vida social e profissional do indivíduo.

1.3.2 Teoria monoaminérgica da depressão

A hipótese clássica postulada por muitos autores para se explicar a origem da depressão é a da deficiência de monoaminas, a qual afirma que a depressão seria causada por uma disfunção da função serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica (ÖSTERLUND, 2009). As monoaminas serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DOP) facilitam a transmissão em vias neurais que

se originam nos núcleos do tronco encefálico, e têm projeções descendentes para o sistema nervoso autônomo e amplas projeções ascendentes para o sistema límbico e córtex. Tais vias controlam vários aspectos da função comportamental, incluindo humor e respostas à ansiedade (NASH; NUTT, 2007), e estas regiões cerebrais límbicas, cujas principais estruturas incluem o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal, entre outras, estão altamente interconectadas e estão envolvidas em aspectos chave de comportamentos relevantes à depressão tais como humor, cognição e ansiedade (ÖSTERLUND, 2009; SIERKSMA *et al.*, 2010).

Muita atenção tem sido dada especialmente ao sistema serotoninérgico na pesquisa da depressão. O neurotransmissor 5-HT é sintetizado a partir do aminoácido essencial L-triptofano nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, localizados no tronco encefálico. Dali, 5-HT é transportada por todo o cérebro, com as mais altas densidades de fibras no hipocampo, hipotálamo e amígdala (SIERKSMA *et al.*, 2010). Em humanos, os receptores para 5-HT são divididos em sete famílias distintas (5-HT₁₋₇) e, exceto pelo canal de íon 5-HT₃ ligante dependente, todos são receptores acoplados a proteína G. Estes receptores afetam uma ampla variedade de processos fisiológicos e psicopatológicos tais como distúrbios de humor, sono, controle de temperatura, apetite, comportamento sexual, movimento, percepção de dor, e motilidade gastrointestinal (ÖSTERLUND, 2009). Os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} são os receptores mais estudados em relação a distúrbios afetivos (ÖSTERLUND, 2009), e pesquisas antidepressivas acreditam que eles estejam diretamente envolvidos na depressão, ansiedade e processos cognitivos (SIERKSMA *et al.*, 2010). Como muitas pesquisas indicam uma alta concentração de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ no hipocampo, estudos em mamíferos com ênfase nestes receptores sugerem que tanto 5-HT_{1A} como 5-HT₇ mediem cascatas moleculares e intracelulares durante os processos de formação e/ou consolidação de memória dependente do hipocampo (PEREZ-GARCIA; MENESES, 2009; SARKYSIAN; HEDLUND, 2009).

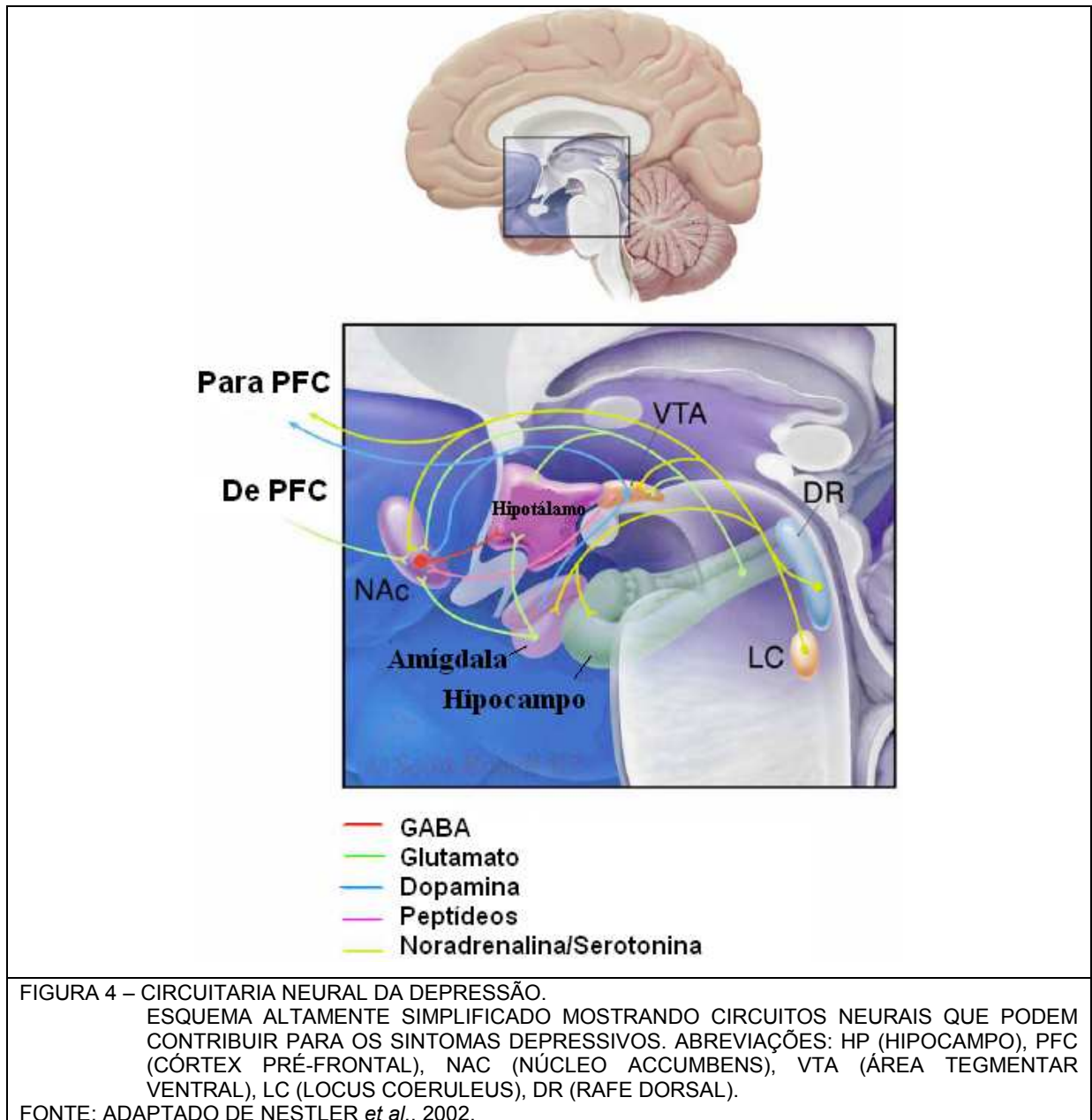
1.3.3 Circuitaria neural da depressão

Enquanto muitas regiões cerebrais estão sabidamente implicadas na regulação de emoções, ainda tem-se um entendimento muito rudimentar sobre a circuitaria neural subjacente tanto ao humor quanto às anormalidades de humor, o ponto chave da depressão (NESTLER *et al.*, 2002). É provável que várias regiões cerebrais mediem os diversos sintomas da depressão, o que vem sendo corroborado por estudos de neuroimagem que demonstram mudanças no fluxo sanguíneo, ou medidas relacionadas, em várias áreas cerebrais incluindo regiões do córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, amígdala e tálamo. Da mesma forma, estudos anatômicos dos cérebros de pacientes diagnosticados com TDM obtidos após autópsia têm reportado anormalidades em muitas destas mesmas regiões cerebrais (NESTLER *et al.*, 2002).

O conhecimento do funcionamento destas regiões cerebrais sob condições normais auxilia a traçar uma correlação entre as mesmas e os aspectos da depressão aos quais elas podem contribuir. Neocórtex e hipocampo podem, por exemplo, mediar aspectos cognitivos da depressão, tais como déficits de memória, e sentimentos de desamparo, baixa auto-estima, culpa, condenação e tendências suicidas. O estriado e a amígdala, e áreas cerebrais relacionadas, são importantes na memória emocional, e poderiam como resultado mediar anedonia (diminuição de motivação e recompensa por atividades prazerosas), ansiedade, e reduzida motivação que predominam em muitos pacientes. Um papel para o hipotálamo também tem sido cogitado, dada a proeminência dos chamados sintomas neurovegetativos da depressão, incluindo muito ou pouco sono, apetite e energia, bem como a perda de interesse em sexo e em outras atividades prazerosas. Estas várias regiões cerebrais claramente operam em uma série de circuitos paralelos altamente interativos, o que talvez permita a formulação de uma hipótese para a circuitaria neural envolvida na depressão, esquematizada na Figura 4 (NESTLER *et al.*, 2002).

Conforme exposto por Anisman e colaboradores em uma revisão de 2008 (a), a circuitaria neural da depressão está relacionada a múltiplas alterações neuroquímicas por vezes oriundas de instigadores comuns, os quais favorecem o desenvolvimento de distúrbios neuroquímicos que incitam o desenvolvimento ou a

exacerbação de sintomas depressivos. Eventos estressantes podem elicitar a liberação de NA, DOP e 5-HT em várias regiões cerebrais, variando de acordo com o organismo (e.g., idade, linhagem) e fatores experienciais do mesmo. As variações de NA e 5-HT são notáveis em específicos núcleos hipotalâmicos (e.g., núcleo paraventricular), no hipocampo, na amígdala e no córtex pré-frontal (FIGURA 4).

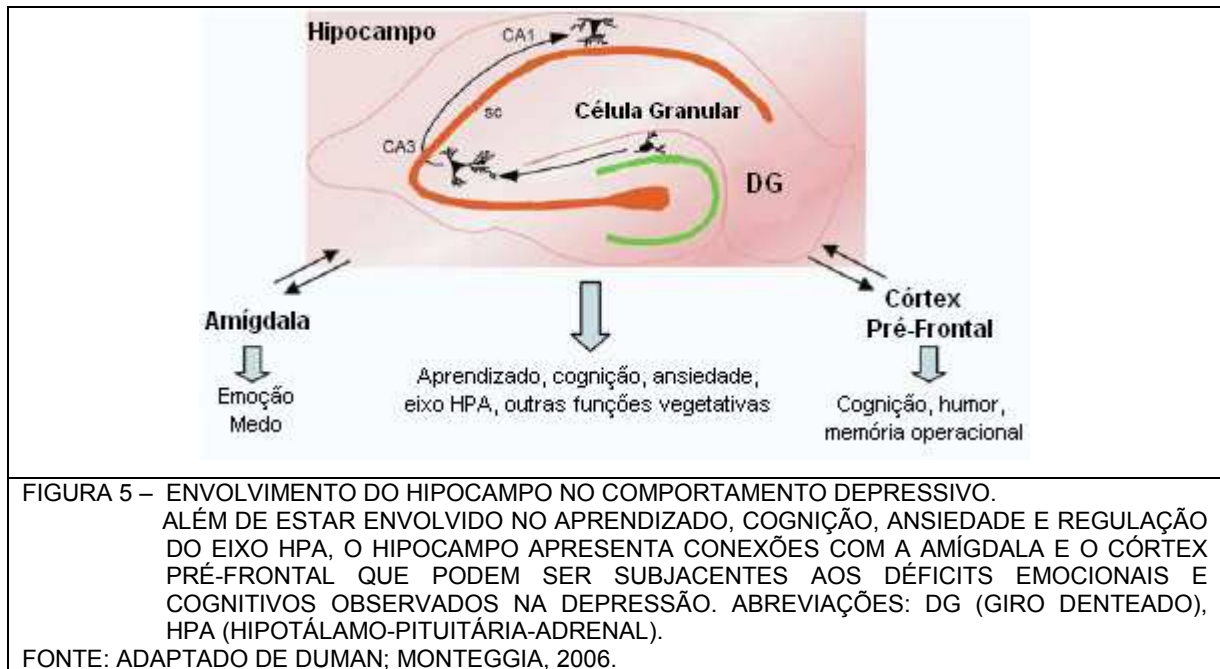


Da mesma forma, o estresse ativa uma específica via neuroendócrina conhecida como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA). Estímulos estressantes ativam o hipotálamo a sintetizar e secretar o hormônio liberador de

corticotrofina (*corticotropin releasing hormone*-CRH), o qual promove a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação pela glândula pituitária. O ACTH, então, estimula a produção e a liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores) do córtex da adrenal. Os glicocorticóides são hormônios esteróides que prontamente cruzam a barreira hematoencefálica e se ligam a receptores, exercendo um feedback negativo para o hipotálamo e pituitária por diminuírem a secreção de CRH e ACTH. O hipocampo também tem um efeito inibitório sobre o eixo HPA, regulando atividade metabólica celular normal, e influenciando várias funções do SNC, tais como aprendizado e memória (DE KLOET *et al.*, 2005; SIERKSMA *et al.*, 2010).

Uma quantidade substancial de evidências tem mostrado que o eixo HPA está desregulado no TDM. De fato, múltiplos estudos clínicos indicam que pacientes com TDM mostram níveis basais de cortisol mais altos no plasma, soro, líquido cerebrospinal e na urina (SIERKSMA *et al.*, 2010). Estes altos níveis de cortisol, por sua vez, poderiam ser altos o suficiente para serem tóxicos aos neurônios do hipocampo, e um prejudicado funcionamento desta região poderia contribuir para algumas das anormalidades cognitivas da depressão (NESTLER *et al.*, 2002). A liberação do CRH em regiões hipo- e extrahipotalâmicas pode agir ainda sobre o funcionamento de receptores para ácido gama-aminobutírico tipo A (*gamma-aminobutyric acid type A* – GABA_A) e serotonina em regiões como córtex pré-frontal e hipocampo, desta forma influenciando distúrbios de humor (ANISMAN *et al.*, 2008a).

Além das variações neuroquímicas, eventos estressores podem ainda levar a atrofia e morte neuronal (DUMAN; MONTEGGIA, 2006), afetar processos relacionados à neurogênese e à sobrevivência celular (possivelmente envolvendo fatores de crescimento tais como BDNF), culminando em depressão (ANISMAN *et al.*, 2008a). Como afirmado anteriormente, o hipocampo é uma das várias estruturas límbicas que têm sido implicadas nos distúrbios de humor (FIGURA 5). O controle de aprendizagem e memória e a regulação do eixo HPA fazem parte das funções da circuitaria hipocampal, ambos os quais se encontram alterados na depressão. Adicionalmente, o hipocampo ainda apresenta ligação com a amígdala e com o córtex pré-frontal, regiões mais diretamente envolvidas na emoção e na cognição, e, portanto, contribuem para outros sintomas da depressão como as características alterações de humor e déficits cognitivos (DUMAN; MONTEGGIA, 2006).



De acordo com uma teoria recente, a base fundamental biológica e celular do TDM seria caracterizada pela diminuição da neurogênese hipocampal adulta (SAHAY; HEN, 2007). Estes níveis reduzidos de neurogênese levam a um comportamento menos adaptativo, o qual se manifesta através de estados depressivos marcados por uma predisposição ao desamparo. Pessoas diagnosticadas com TDM presumivelmente apresentam um déficit de neurogênese, já que exibem déficits de memória característicos de dano hipocampal, acompanhados de uma redução no volume hipocampal que se correlaciona com a duração total da doença (MACQUEEN *et al.*, 2005). Como revisto por Österlund (2009), estudos em humanos e em animais indicam que a depressão está associada à atrofia neuronal e reorganização dendrítica no hipocampo e, apoiando estas observações, vários trabalhos pesquisando tratamento crônico com antidepressivos sugerem que estes induzam vias de sinalização neurotrófica. Portanto, a função ainda não esclarecida dos neurônios gerados na fase adulta poderia ser a peça que falta nesta teoria (LLEDO, 2009).

1.3.4 Tratamento da depressão

O tratamento da depressão foi revolucionado cerca de 50 anos atrás, quando duas classes de agentes foram aleatoriamente descobertas como eficientes antidepressivos: os antidepressivos tricíclicos, que surgiram a partir de pesquisas com anti-histamínicos, e os inibidores de monoamina oxidase (MAO), derivados de trabalhos sobre drogas para o tratamento da tuberculose (NESTLER *et al.*, 2002). Os antidepressivos tricíclicos agem por inibição de transportadores de recaptção de 5-HT ou NA; já os inibidores de MAO, como o próprio nome diz, agem inibindo esta importante enzima catabólica para neurotransmissores monoaminas (FRAZER, 1997; ÖSTERLUND, 2009).

A descoberta do mecanismo de ação destas duas classes de antidepressivos, por sua vez, levou ao desenvolvimento de numerosos medicamentos de segunda geração, como os inibidores de recaptção seletiva de serotonina (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors* – SSRIs), mais comumente prescritos para os distúrbios de humor, e os inibidores de recaptção seletiva de noradrenalina (*Selective Noradrenaline Reuptake Inhibitors* – SNRIs), (NESTLER *et al.*, 2002; LLEDO, 2009). Conforme Nestler e colaboradores expõem em sua revisão de 2002, grande parte das pesquisas sobre depressão ao longo da última metade do século passado foi baseada na idéia de que, ao se entender como estes tratamentos funcionam, isto revelaria novas percepções sobre as causas da depressão. Atualmente, sabe-se que o tratamento antidepressivo pode reverter mudanças celulares associadas à depressão e melhorar os aspectos emocionais, cognitivos e vegetativos deste distúrbio potencialmente através de efeitos mediados em parte pelo hipocampo (DUMAN; MONTEGGIA, 2006).

O progresso em desenvolver medicamentos novos e mais aprimorados, entretanto, tem sido relativamente limitado. Os SSRIs, por exemplo, apresentam menos efeitos colaterais para alguns pacientes, e são mais fáceis de serem prescritos quando comparados com os agentes mais velhos. Contudo, os SSRIs têm essencialmente o mesmo mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos mais antigos, e, como resultado, os tratamentos de hoje permanecem ainda sub-ótimos, com somente cerca de 50% de todos os pacientes demonstrando remissão completa, mesmo embora muitos mais (até 80%) mostrem respostas parciais

(NESTLER *et al.*, 2002). Além disso, alguns trabalhos indicam que a resposta ao tratamento com SSRIs é negativamente afetada em pacientes que estão em um estado crônico hipoestrogênico tal como os experienciados na menopausa (PINTO-MEZA *et al.*, 2006; PAE *et al.*, 2009). Dados de Parry e Newton (2001) sugerem que a terapia de reposição estrogênica em mulheres na pós-menopausa aumente a eficácia dos SSRIs por alterar a ritmicidade circadiana, sincronizando os componentes do sistema circadiano e re-estabelecendo a fase e a amplitude dos ritmos biológicos. Assim, a combinação de SSRIs com uma terapia estrogênica poderia trazer efeitos benéficos, especialmente em pacientes com baixos níveis endógenos de estradiol (ÖSTERLUND, 2009).

1.4 INTERAÇÕES ENTRE ESTRÓGENO, MEMÓRIA E DEPRESSÃO

1.4.1 Estrógeno e memória

Evidências clínicas e experimentais comprovam que o estrógeno não apenas tem impacto sobre a função cognitiva, mas também que diferentes sistemas de aprendizagem e memória são distintamente regulados pela presença do estrógeno (QUINLAN *et al.*, 2008). Estudos de Talboom e pesquisadores (2008) mostram que níveis mais altos de estradiol circulante se correlacionam com a atuação em tarefas de labirinto de animais ovariectomizados jovens e de meia-idade. Estes resultados são compatíveis com os obtidos em um trabalho desenvolvido por Bimonte-Nelson e colaboradores (2006), que sugerem que a reposição com estradiol melhore o desempenho de ratas ovariectomizadas de meia-idade frente a uma tarefa de memória de referência espacial. Muitos dos efeitos do estrógeno na formação hipocampal podem justificar os efeitos de melhora deste hormônio sobre aprendizado e memória hipocampais. O estradiol rapidamente ativa vias de sinalização levando à tradução e à modificação de proteínas sinápticas, remodelação de actina, e formação de espinhos dendríticos e sinapses. O estrógeno também influencia a expressão de múltiplos ligantes e seus receptores no hipocampo, incluindo neurotrofinas e peptídeos opióides endógenos. Finalmente, o

estrógeno pode ativar diretamente vias de sinalização, sistemas de neurotrofinas e neurotransmissores no prosencéfalo basal, o qual envia projeções colinérgicas para o hipocampo para indiretamente impactar a função hipocampal. Esta representação complexa das ações do estrógeno no hipocampo emergiu de extensos trabalhos *in vitro* em paralelo com estudos *in vivo*, mas numerosas questões permanecem. Por exemplo, poucos estudos tentaram integrar os efeitos do estrógeno em vias de sinalização, sistemas de neurotransmissores e neurotrofinas em um modelo sintético do impacto do estrógeno na função hipocampal. Adicionalmente, ainda não está claro como o estrógeno ativa vias de sinalização e a expressão de específicas proteínas em neurônios (SPENCER *et al.*, 2008).

Embora a maioria dos estudos animais avaliando os efeitos do estrógeno sobre o aprendizado e a memória seja realizada em roedores, existem numerosos estudos mostrando declínio cognitivo após perda de hormônio ovariano, e melhora após reposição com estrógeno, em mulheres na menopausa. Entretanto, vários estudos recentes, incluindo o estudo do Women's Health Initiative (WHI), têm demonstrado que certos regimes de tratamento hormonal podem ter efeito algum ou mesmo agravante sobre a cognição e sobre o risco de demência em mulheres (ESPELAND *et al.*, 2004; SHUMAKER *et al.*, 2004). Muitas críticas foram feitas a este estudo (BRANN *et al.*, 2007), uma delas sendo o fato de as mulheres participantes do estudo terem 65 anos de idade ou mais, o que pode ter desempenhado um papel crítico na ausência de eficácia do tratamento com estrógeno, uma vez a idade ter impacto sobre a responsividade ao tratamento. Além disso, enquanto tem havido um aumento recente no número de estudos avaliando os efeitos do estrógeno em roedores fêmeas de meia-idade ou mais, existem somente trabalhos limitados comparando os efeitos da reposição de estrógeno em animais ovariectomizados em diferentes idades no mesmo estudo. Conseqüentemente, ainda é uma dúvida se a idade altera a resposta à reposição hormonal ovariana. Isto é uma questão clinicamente importante, já que algumas mulheres iniciam a terapia hormonal em idade mais jovem enquanto outras começam mais tarde (TALBOOM *et al.*, 2008).

1.4.2 Estrógeno e depressão

Evidências de numerosos estudos epidemiológicos e clínicos em grande escala sugerem um possível papel para os hormônios reprodutivos no desenvolvimento da depressão, aproximadamente duas vezes mais prevalente em mulheres do que em homens, uma diferença que se torna evidente após a puberdade e continua pela fase adulta. Entretanto, após o período de tempo associado com a transição da menopausa, ou perimenopausa, a incidência de depressão em mulheres é semelhante à da em homens. Somados, estes achados sugerem que a aumentada vulnerabilidade à depressão reportada em mulheres durante a fase de vida reprodutiva até a transição para a menopausa está associada com a regulação dos hormônios ovarianos (DEECHER *et al.*, 2008; ÖSTERLUND, 2009).

Embora fatores genéticos, psicosociais e ambientais contribuam fortemente para o risco individual de depressão, dados experimentais substanciais apóiam um papel independente de influências hormonais na expressão de sintomas depressivos. O estrógeno é um potente neuromodulador e sabidamente altera a atividade de múltiplos sistemas de neurotransmissores incluindo aqueles envolvidos no TDM. Diferentemente dos homens, os neurônios do encéfalo feminino devem ser capazes de responder prontamente aos efeitos de rápidos aumentos e diminuições nos níveis estrogênicos que ocorrem durante o ciclo menstrual. Sendo assim, o funcionamento neuronal é fluido e dinâmico, e é programado para responder a alterações previsíveis dos hormônios ovarianos durante o período reprodutivo. No entanto, evidências preliminares sugerem que mudanças no funcionamento endócrino, resultantes destes altos e baixos hormonais, podem predispor as mulheres a sintomas depressivos (DEECHER *et al.*, 2008).

Seguindo esta linha, vários estudos sobre os efeitos da terapia de reposição hormonal sobre distúrbios de humor têm sido conduzidos tanto em animais como em seres humanos. Apesar de indicarem resultados variados, a grande maioria dos estudos mostra respostas positivas a este tipo de tratamento. Mudanças nos níveis de hormônios ovarianos induzidas por ovariectomia e/ou reposição com estradiol, por exemplo, têm mostrado modular a ansiedade e o comportamento depressivo em várias pesquisas com roedores. Injeções de estradiol administradas a ratos

ovariectomizados levaram a efeitos ansiolíticos e antidepressivos, e camundongos fêmeas nocaute para aromatase (as quais são deficientes em estradiol) demonstraram comportamento depressivo no teste da natação forçada quando comparadas com camundongos selvagens (ver ÖSTERLUND, 2009, para revisão).

Em humanos, uma possível melhora da terapia antidepressiva convencional quando combinada com terapia de estrógeno tem sido examinada por muitos estudos. Apesar de alguns trabalhos trazerem resultados conflitantes mostrando nenhuma diferença de resposta entre pacientes sob terapia de reposição hormonal e pacientes não tratados, a grande maioria das pesquisas indica efeitos benéficos da associação entre terapia estrogênica e antidepressiva. Efeitos positivos têm sido mostrados durante a perimenopausa, onde aumento estrogênico de baixa dose associado à medicação antidepressiva foi acompanhado por melhora de humor em mulheres diagnosticadas com TDM em remissão parcial quando comparadas com o grupo placebo. Da mesma forma, mulheres na pós-menopausa também responderam melhor ao tratamento antidepressivo com SSRIs quando este foi combinado com terapia hormonal ou de reposição de estrógeno em relação a controles placebo (ver ÖSTERLUND, 2009, para revisão).

Uma das hipóteses para estes resultados positivos se baseia no fato da distribuição anatômica dos receptores de estrógeno ser altamente coincidente com áreas implicadas em distúrbios afetivos. Estudos indicam que ER β está expresso em níveis muito mais altos do que ER α nos núcleos da rafe dorsal e mediano de primatas e de roedores da família Murinae, onde a maioria dos corpos celulares serotoninérgicos está localizada. Além disso, uma alta porcentagem das células expressoras de ER β nesta região é serotoninérgica. Portanto, ER β tem o potencial de regular diretamente os genes envolvidos na síntese, secreção e *turnover* de serotonina nas células pré-sinápticas (ÖSTERLUND, 2009). Interessantemente, 17 β -estradiol é capaz de aumentar o disparo de neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe dorsal dentro de aproximadamente uma semana, ou até menos. Assim, o estrógeno pode ter um início de ação mais rápido para efeito terapêutico quando comparado com antidepressivos clássicos, que requerem pelo menos três semanas de tratamento para provocar seus efeitos (ÖSTERLUND, 2009).

Mesmo embora a NA também modular a resposta ao estresse, e a depleção de noradrenalina precipitar sintomas depressivos, informações com relação a efeitos estrogênicos sobre o sistema noradrenérgico são um tanto quanto limitadas quando

em comparação com o sistema serotoninérgico. O estrógeno, porém, foi hábil em modular os sistemas noradrenérgicos do hipotálamo, levando a um aumentado *turnover* de NA e melhorada liberação deste neurotransmissor no hipotálamo (ETGEN; KARKANIAS, 1994). Já em se tratando da DOP, tanto o estrógeno quanto agonistas seletivos para ER β têm sugerido modular os sistemas dopaminérgicos cerebrais, apesar da grande maioria dos resultados reportados se referirem apenas ao estriado. Por fim, aproximadamente metade dos indivíduos diagnosticados com depressão tem ativação excessiva anormal do eixo HPA como resposta a eventos estressantes, a qual é normalizada com tratamento antidepressivo. Em humanos, tratamento com estradiol tem sido mostrado reduzir a resposta ao estresse através da mensuração dos níveis de ACTH, cortisol e NA. Os efeitos estrogênicos sobre o eixo HPA, porém, parecem ser complexos e diferentes papéis para ER α e ER β são propostos. Além disso, parece existir uma diferença espécie-específica com relação aos resultados encontrados na literatura (ver ÖSTERLUND, 2009, para revisão).

1.4.3 Memória e depressão

Além das já bem conhecidas alterações afetivas vistas em pacientes com TDM, muitos deles também exibem uma ampla variedade de disfunções cognitivas. Déficits neuropsicológicos em pacientes diagnosticados com TDM podem ser detectados com relação à atenção, à velocidade do processamento mental, à memória e a funções executivas. Outros estudos recentes sugerem que o TDM possa causar processamento de informações distorcido e dependente de humor, bem como alterações na tomada de decisões. Déficits de memória comuns incluem danos em tarefa de aprendizado de lista, memória verbal e visual, assim como alterações nas funções de memória episódica e memória operacional (ver HERRERA-GUZMÁN *et al.*, 2009 e SIERKSMA *et al.*, 2010 para revisão). Alguns estudos recentes sugerem que alterações na memória episódica em pacientes com TDM sejam uma consequência direta de mudanças estruturais no hipocampo, já que muitas vezes tem se observado perda de volume hipocampal em tais pacientes. Além disso, vários estudos têm demonstrado uma melhora na memória episódica,

visual e episódica verbal após tratamento com antidepressivos (HERRERA-GUZMÁN *et al.*, 2009).

Sabe-se que o TDM está associado a uma disfunção do eixo HPA e da transmissão serotoninérgica, o que investe contra a integridade do sistema límbico. Como consequência, a chamada capacidade de reservas do cérebro pode se tornar comprometida, e isto se manifestaria através de distúrbios cognitivos e afetivos. Esta falta de reservas tornaria o cérebro menos capaz de lidar com uma subsequente neurodegeneração relacionada à DA, com a formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares. Portanto, alguns autores postulam que o declínio cognitivo visto em pacientes com TDM pode, pelo menos parcialmente, ser explicado por alterações no eixo HPA e sistema serotoninérgico. Por tornar o cérebro mais vulnerável a subsequente neurodegeneração e contribuir com a formação das específicas marcas características da DA, o TDM pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da DA (SIERKSMA *et al.*, 2010).

Por fim, a presença de alterações neuropsicológicas prejudica consideravelmente a recuperação funcional de pacientes com TDM, e disfunções motoras e de memória podem ainda prognosticar uma má recuperação no funcionamento da vida destes pacientes (JAEGER *et al.*, 2006). Sendo assim, a existência de comorbidades tem um impacto não apenas sobre o aspecto funcional da vida do paciente, mas também sobre o desenvolvimento e a recuperação destes distúrbios comórbidos. Evidências epidemiológicas e neurobiológicas de fato apóiam que o TDM esteja associado a um aumentado risco de desenvolvimento de disfunção cognitiva e eventualmente demência, em particular DA. A depressão pode ocorrer em 30–40% dos pacientes com DA e afeta a evolução clínica desta doença. Pacientes com DA diagnosticados com TDM mostram um dano cognitivo maior e mais rápido em relação a pacientes não deprimidos. Interessantemente, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares, as duas características mais importantes do cérebro da DA, são mais pronunciados no hipocampo de pacientes com DA com depressão comórbida quando comparados com pacientes com DA sem depressão (CARACI *et al.*, 2010). Logo, estudos que relacionem déficits cognitivos e TDM se mostram de extrema importância para se entender os mecanismos comuns destes distúrbios, para trazer luz a possíveis alternativas terapêuticas e deste modo melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

Um recente estudo em grande escala, realizado pelo WHI, causou surpresa no meio científico ao indicar que certos regimes de tratamento hormonal podem ter efeito nulo sobre a cognição e demência em mulheres. Somando-se a este fato, o número relativamente limitado de trabalhos comparando a reposição estrogênica em diferentes idades levanta a suspeita de a idade alterar a resposta ao tratamento hormonal. Esta é uma dúvida clínica extremamente importante, uma vez algumas mulheres iniciarem o tratamento hormonal em idade mais recente, enquanto que outras o fazem em idade mais avançada (TALBOOM *et al.*, 2008).

Um emergente vínculo entre algumas doenças neurológicas e depressão tem estimulado a necessidade de estudos que se visem este aspecto (KALUEFF *et al.*, 2007) especialmente em se tratando de mulheres, que apresentam maior risco para a depressão em relação aos homens. As bases neurobiológicas para este risco aumentado, porém, ainda são desconhecidas (NESTLER *et al.*, 2002). Além disso, a fisiopatologia subjacente da depressão e a resposta a terapêuticos podem ser diferentes em mulheres na pós-menopausa comparadas com aquelas na pré-menopausa (PINTO-MEZA *et al.*, 2006). Sendo assim, controvérsias com relação ao emprego de tratamento hormonal e possíveis correlações deste com outros distúrbios de ordem neurológica, além da possibilidade de respostas distintas ao declínio hormonal e à conseqüente reposição dependerem da idade e da duração do tratamento, enfatizam a necessidade de novos estudos sobre o assunto (BRANN *et al.*, 2007; TALBOOM *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o efeito do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória e sobre o comportamento depressivo de ratas *Wistar* jovens, adultas e de meia-idade ovariectomizadas, bem como controle não-ovariectomizadas.

Objetivos específicos:

- Analisar os prováveis efeitos do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória de referência espacial dos sujeitos de pesquisa.
- Avaliar possíveis implicações comportamentais do citado tratamento sobre a resposta emocional dos animais experimentais.
- Considerar ações do tratamento com 17β -estradiol sobre o comportamento depressivo dos sujeitos de pesquisa.
- Examinar potenciais efeitos do tratamento mencionado sobre os neurotransmissores serotonina e noradrenalina, associando-os aos resultados dos testes comportamentais.
- Cogitar presumíveis vínculos entre efeitos do tratamento mencionado com diferentes faixas etárias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para este trabalho, foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas obtidas no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em biotério climatizado ($22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) sob ciclo claro/escuro de 12/12 horas (07:00 – 19:00hs). As ratas foram acomodadas em caixas (60X25X15cm) com ração (ração NuvilabCR₁ – Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e água à vontade, e tiveram sepilho trocado em dias alternados.

O projeto desta dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob o número 321. Todos os experimentos deste estudo seguiram as normas preconizadas por este mesmo comitê, e foram tomados os necessários cuidados para se evitar possíveis desconfortos aos animais ao longo dos experimentos. Além disso, houve ainda a preocupação de minimizar o número de animais utilizados sem, no entanto, comprometer a análise estatística dos resultados, refletindo desta forma atuais práticas bioéticas de experimentação animal.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O proposto trabalho foi composto por um total de nove grupos experimentais. Primeiramente, as ratas foram divididas em três grandes grupos de acordo com a idade: Grupo Ratas Jovens (J): composto por ratos *Wistar* fêmeas com 3 meses de idade; Grupo Ratas Adultas (AD): composto por ratos *Wistar* fêmeas com 7 a 8 meses de idade, e ainda Grupo Ratas de Meia-Idade (MI): composto por ratos *Wistar* fêmeas com 12 a 13 meses de idade. Estes três grupos foram então subdivididos aleatoriamente de acordo com o tratamento, a saber:

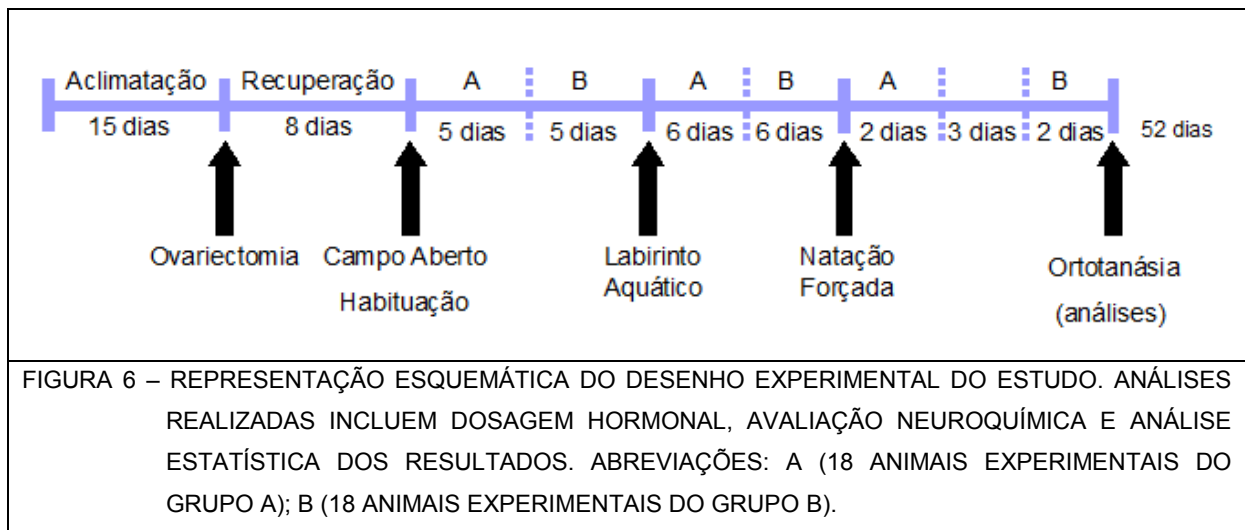
- Ovariectomizado com estrógeno (OVX-E) (n=12): animais que passaram por cirurgia de retirada de ovários, seguida de implantação de cápsula de estrógeno (descrição a seguir);
- Ovariectomizado sem estrógeno (OVX-O) (n=12): animais que sofreram cirurgia de retirada de ovários, seguida de implantação de cápsula de óleo de milho;
- Ovário intacto sham (C) (n=12): animais controle falsamente ovariectomizados, sem implantação de cápsulas.

4.3 OVARIECTOMIA E TRATAMENTO HORMONAL

Para a realização da cirurgia de ovariectomia, as ratas foram anestesiadas com éter etílico, receberam 0,1ml de Benzilpenicilina Potássica (5.000.000 U diluído em 5ml, i.m.) na pata traseira direita. Em seguida, foram feitas incisões laterais de aproximadamente 1cm, através das quais os ovários foram expostos e retirados após a ligadura entre eles e o útero. No momento da ovariectomia, duas cápsulas de Silastic, cada uma contendo 400µg/8µl de 17β-estradiol (Sigma, St. Louis, USA) diluído em óleo de milho, foram implantadas subcutaneamente na região dorso-lateral dos animais dos grupos destinados ao tratamento hormonal. Estas cápsulas promoveram a liberação do hormônio de forma gradual e constante ao longo de 60 dias (FREEMAN, 2006) reproduzindo, na concentração mencionada, níveis fisiológicos da fase de pró-estro (± 40 pg/mL) (WALF *et al.*, 2009). Os grupos sem tratamento de estrógeno receberam cápsulas contendo apenas veículo (óleo de milho), enquanto que os animais falsamente ovariectomizados sofreram apenas as incisões laterais. Após o procedimento cirúrgico, os animais tiveram as incisões suturadas e foram mantidos em caixas coletivas, com no máximo quatro animais por caixa, por sete dias para plena recuperação, até serem submetidos aos testes comportamentais.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados no período das 12 às 17 horas. Um intervalo de cinco dias entre os testes foi mantido de modo a minimizar possíveis interferências entre os mesmos (FIGURA 6).



4.4.1 Campo Aberto

Testes comportamentais realizados em arenas permitem observar como animais comportam-se frente a ambientes amplos. O pressuposto básico envolvido nestes estudos é o de que, com a finalidade de explorar este novo ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento do animal passa a ser um indicador de sua atividade exploratória. Entretanto, um animal pode estar se movimentando em um ambiente desconhecido por outras razões, como por exemplo numa tentativa de encontrar uma via de escape. Para se evitar este tipo de interferência na análise de comportamento, outros parâmetros de respostas emocionais são juntamente avaliados, como a atividade exploratória (comportamento de levantar-se nas patas traseiras) e a autolimpeza, medidas do nível de excitabilidade do animal, além da imobilização, uma conduta caracterizada

pela ausência de atividade exploratória e iniciada por medo ou mesmo outro fator emocional (NAHAS, 1999; NESTLER *et al.*, 2002; KALUEFF *et al.*, 2007).

O aparato do teste do campo aberto é composto por uma arena circular com 1m de diâmetro limitada por uma parede circular de 40cm de altura, sendo esta arena iluminada por quatro lâmpadas de 60 Watts. O piso encontra-se marcado por dezenove quadrantes de tamanho aproximadamente correspondente ao comprimento do animal adulto, estando os quadrantes separados por marcas de duas áreas circulares e linhas dividindo estes círculos. A arena é circundada por uma cortina, numa tentativa de se evitar que o animal veja o experimentador, o que poderia causar alterações no comportamento em andamento (NAHAS, 1999).

O teste consiste na mensuração dos comportamentos eliciados pela colocação do animal em um espaço novo e aberto do qual a fuga é prevenida por uma parede circundante. Para a realização do teste, os animais foram individualmente colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente durante cinco minutos. Durante este período, mensurou-se a taxa de ambulação do animal, a partir do número de secções transpassadas pelo animal (quadrantes), o comportamento de levantar-se nas patas traseiras, assim como o comportamento de imobilidade e de autolimpeza (NAHAS, 1999; CARRIÉ *et al.*, 2000). Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10%.

4.4.2 Habituação

O teste da habituação foi realizado no mesmo aparelho do teste de campo aberto, mantendo-se as mesmas condições e características previamente descritas. O uso de um número maior de tentativas apresenta ao animal uma experiência prévia com a situação de teste, e desta forma pode trazer vantagens relacionadas à possibilidade de investigar habituação e aprendizagem, além de oferecer a oportunidade de uma análise temporal (NAHAS, 1999). Sendo assim, durante cinco minutos, por quatro dias consecutivos, os animais foram individualmente colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente. Durante este período de teste foram avaliados apenas comportamentos que levam a uma ampliação das

informações obtidas pelo animal acerca do novo ambiente. A atividade locomotora foi mensurada através da contagem do número de quadrantes transpassados pelos animais e a atividade exploratória foi quantificada através do comportamento de levantar (NAHAS, 1999; CARRIÉ *et al.*, 2000). Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10%. Um período de 24 horas entre testes foi mantido por conveniência e por evitar complicações em relação ao sistema de temporização do animal, que também exerce grande influência sobre os comportamentos mensurados (NAHAS, 1999).

4.4.3 Labirinto aquático de Morris

Labirintos são amplamente utilizados em estudos de memória e aprendizagem animal, e normalmente pressupõem que animais aprendam determinada localização que lhes ofereça algum benefício. Essas informações sobre diferentes locais de um labirinto devem ser aprendidas e armazenadas por períodos variáveis de tempo. A aprendizagem sobre locais pode envolver estratégias distintas, e uma das vantagens do labirinto aquático de Morris é que, a partir deste, pode-se examinar diferentes sistemas de memória de acordo com o protocolo a ser utilizado. Mais especificamente, o teste do labirinto aquático de Morris vem sendo intensamente utilizado em pesquisas sobre a capacidade de orientação espacial em roedores, sobre a retenção dessas informações no sistema nervoso por períodos variáveis de tempo, bem como na investigação dos mecanismos neurais subjacentes a essas capacidades (DOS SANTOS, 1999; NESTLER *et al.*, 2002).

O labirinto aquático de Morris é o teste mais favorável para o estudo de aprendizado e memória espacial dependente de hipocampo em ratos (BIRZNIECE *et al.*, 2006). Para se avaliar a memória espacial de referência (FRYE; WALF, 2008), o teste foi executado em uma piscina circular de cor preta (1,68m de diâmetro e 0,5m de altura), com água a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ a 0,32m de profundidade, a qual se encontrava em uma sala com temperatura controlada. Cartazes com figuras geométricas estavam fixados às paredes da sala e puderam ser usados como dicas visuais distais pelos animais quando colocados dentro do labirinto, que puderam valer-se destas pistas como referências para sua orientação. Quatro diferentes posições de

partida (leste (L), oeste (O), norte (N) e sul (S)) foram estabelecidas a partir da borda da piscina; a partir destas, quatro quadrantes foram imaginariamente demarcados (DOS SANTOS, 1999; SONG *et al.*, 2006).

O treinamento diário consistiu em oito provas, divididas em dois blocos de quatro tentativas, com um intervalo entre tentativas de 30 minutos, ao longo de cinco dias. Em cada prova, o animal foi colocado no labirinto semi-aleatoriamente em uma das quatro posições de largada (N, S, L e O), com o focinho voltado para a parede do labirinto, de forma que, em cada bloco de quatro tentativas, um ponto de largada fosse usado somente uma vez e nunca consecutivamente. O animal teve 60 segundos para localizar uma plataforma de acrílico transparente (11x14x30cm) submersa a 2cm da superfície da água, a qual permaneceu fixa sempre no centro do mesmo quadrante randomicamente determinado (quadrante sudoeste). Como as relações espaciais entre os objetos da sala e a posição da plataforma permaneceram constantes ao longo de todo o experimento, o animal pôde valer-se das informações adquiridas a cada dia para encontrar a plataforma em dias subseqüentes. Após 15 segundos na plataforma, o animal era removido do labirinto; caso o animal não encontrasse a plataforma durante o tempo da prova, ele era levado até a mesma e permanecia nesta por 30 segundos, sendo em seguida acondicionado em sua caixa de retenção. O desempenho dos animais nesta fase foi avaliado pela medida de latência (*i. e.*, intervalo de tempo para completar a tarefa) desde sua liberação até o momento em que estes encontraram a plataforma, utilizando-se para tanto um cronômetro.

No sexto dia, cada animal foi submetido a um teste composto por quatro provas sem a plataforma, por 60 segundos, de modo a examinar o quadrante predominante de natação. O tempo de natação gasto no quadrante onde previamente estava localizada a plataforma foi registrado, e a porcentagem de natação neste quadrante foi calculada como medida de memória de referência espacial (MOLTENI *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2006; FRYE; WALF, 2008; TALBOOM *et al.*, 2008). O desempenho do animal neste teste depende de vários mecanismos, incluindo atenção, aprendizado, memória, visão e coordenação motora. Durante a natação, o estabelecimento de um mapa espacial é um processo rápido e envolve o hipocampo. Entretanto, o aprendizado das rotas é um processo relativamente mais lento que envolve o núcleo caudado (BIRZNIECE *et al.*, 2006).

4.4.4 Natação forçada modificada

O teste da natação forçada tem sido amplamente utilizado como um modelo animal em estudos que avaliam a eficácia de drogas antidepressivas em ratos e camundongos. Logo, tal teste pode detectar efeitos antidepressivos, enquanto que pode ainda se tornar um modelo ao levar a um comportamento depressivo após testes repetidos (NESTLER *et al.*, 2002; KALUEFF *et al.*, 2007). Neste paradigma, os animais são expostos a um cilindro cheio de água e, sem a possibilidade de escapar, se vêem compelidos a nadar por relativo longo período, eventualmente adotando uma postura de flutuação e fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Este comportamento refletiria um estado de desespero, e a duração deste comportamento de imobilidade tem sido usada como um índice de desespero comportamental (CONSONI *et al.*, 2006; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; DEECHER *et al.*, 2008).

Aprimoramentos deste método incluem aspectos comportamentais durante a realização da tarefa além da simples duração da imobilidade. Tal modificação do procedimento originalmente descrito por Porsolt *et al.* (1978) permite a discriminação entre agentes que atuam primariamente através de vias serotoninérgicas e aqueles que agem primariamente através de vias de noradrenalina pela diferenciação dos comportamentos de natação, o qual é sensível a drogas antidepressivas serotoninérgicas, e de escalada, que é sensível a drogas antidepressivas catecolaminérgicas. Estes refinamentos dão maior sensibilidade ao teste da natação forçada, e como alterações bioquímicas agudas podem ser mais bem avaliadas, pode-se chegar a um melhor entendimento das vias comuns na fisiopatologia da depressão (CONSONI *et al.*, 2006; DEECHER *et al.*, 2008).

O procedimento adotado neste estudo foi o modificado do método de Porsolt *et al.* (1978), desenvolvido por Detke *et al.* (1995), Lucki (1997), Page *et al.* (1999) e Cryan *et al.* (2002). Os animais foram colocados em um cilindro plástico opaco com 20cm de diâmetro e 50cm de altura, contendo 30cm de água a $24^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. No primeiro dia, os animais foram cuidadosamente colocados no cilindro com água e deixados no compartimento por 15min. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais passaram pela sessão de teste, e permaneceram 5min sob as mesmas condições do dia anterior. A sessão de teste foi gravada através de uma câmera (Sony, modelo: SSC-

M388CE) posicionada acima do cilindro para posterior análise por avaliador cego às condições de tratamento. Em intervalos de 5seg durante os 5min da sessão de teste, o avaliador registrou o comportamento predominante: (1) imobilidade (ausência de movimento do animal, com exceção dos movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água), (2) escalada (vigorosos movimentos das patas dianteiras para cima, normalmente em contato com a parede do cilindro) ou (3) natação (movimentos por todo o cilindro). Após cada animal testado, a água foi trocada e o cilindro lavado com água limpa de modo a evitar a influência de substâncias presentes na água sobre o comportamento dos animais (CONSONI *et al.*, 2006; BUDDENBERG *et al.*, 2009). Ao término das sessões de treino e de teste, os animais foram secados e mantidos em ambiente de temperatura controlada.

4.5 DOSAGEM HORMONAL

Logo após o término dos testes comportamentais, um número de animais de cada grupo (n=6) foi ortotansiado por decapitação e amostras de sangue foram coletadas do tronco destes animais em microtubos contendo heparina. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos, a 4°C. O plasma foi então coletado e armazenado a uma temperatura de -80°C até ser submetido à dosagem hormonal. A concentração de 17 β -estradiol no plasma foi determinada por radioimunoensaio (RIA) com duplo anticorpo por meio de kit MAIA (BiochemImmunosystems – Bologna, Itália). O limite mais baixo para detecção foi de 5 pg/ml. De modo a prevenir variações entre os ensaios, todas as amostras foram analisadas no mesmo RIA. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4.3%.

4.6 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA

Para a realização da avaliação de neurotransmissores, os animais foram ortotansiadados por decapitação, e seus hipocampos dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados e congelados em freezer à -80°C, até o momento de terem

os níveis de NA, 5-HT e do principal metabólito da 5-HT, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) avaliados através do método de cromatografia líquida de alta precisão com detecção eletroquímica (HPLC-ED).

Estas estruturas foram homogeneizadas em 800 μ L de solução contendo 0,2M de ácido perclórico, 0,1mM de EDTA (Merck) e 0,45 μ M de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) como padrão interno. As mesmas foram então centrifugadas por 20 minutos a 12,000 g, e o sobrenadante foi filtrado com filtro 0,22 μ m (Millex, Millipore). Deste filtrado, 10 μ L de cada amostra foi injetada em auto-injetor (SIL-10 Advp; Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada por coluna de fase reversa C18 (250x4,6mm) (Shim-pack VP-ODS, 5 μ m; Shimadzu), precedida de uma coluna de proteção C18 (10x4,6mm) (Shim-pack GVP-ODS, 5 μ m; Shimadzu). A fase móvel foi preparada com água Milli-Q, 100mM de fosfato de sódio dihidrogenado, 10mM de cloreto de sódio, 0,1mM de EDTA, 0,40mM de ácido sódio-1-octanosulfônico (Sigma) e 20% metanol. O pH foi ajustado em 3,5 com ácido fosfórico. O fluxo estimado foi de 0,9mL/min, bombeado por um pistão duplo (LC-10 Advp; Shimadzu). O detector potencial foi 0,65V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Holanda). Os dados da cromatografia foram plotados usando software Class-VP (Shimadzu). Os neurotransmissores NA, 5-HT e o metabólito 5-HIAA foram identificados baseados no tempo de pico de retenção. A quantificação foi realizada por um método de padrão interno (DHBA como padrão interno) baseado na área abaixo do pico. As concentrações de NA, 5-HT e 5-HIAA foram calculadas e expressas como pg/ μ g de proteína e a atividade do sistema serotoninérgico (*turnover*) foi expressa pela razão entre 5-HIAA e 5-HT.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando indicado, de pós-teste de Duncan. Resultados não paramétricos estão representados como mediana e intervalos inter-quartis (Q25/Q75) e foram

submetidos a Kruskal-Wallis ANOVA. Diferenças entre os grupos são consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM HORMONAL

A tabela 3 mostra a média da concentração plasmática de 17β -estradiol dos animais dos grupos controle, tratados com óleo de milho ou com estrógeno. Nas três faixas etárias do experimento, os animais do grupo tratado com cápsulas de estrógeno apresentaram maior concentração plasmática de 17β -estradiol quando comparados com os animais dos grupos óleo de milho e controle (ANOVA de uma via, $F(8,53)=34.15$, $p\leq 0.0001$).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE 17β -ESTRADIOL NO PLASMA DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO

	Controle	Óleo de Milho	Estrógeno
Jovens	32,89±2,24 ^a (n=7)	13,50±0,56 ^b (n=8)	48,07±3,13 ^c (n=6)
Adultos	19,12±0,31 (n=7)	11,53±1,01 (n=6)	40,53±1,86 ^d (n=6)
Meia-Idade	15,90±1,37 (n=7)	11,91±1,05 (n=7)	41,78±5,10 ^e (n=8)

DADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. ^a $p\leq 0.01$ QUANDO COMPARADO COM O GRUPO ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO; ^b $p\leq 0.01$ QUANDO COMPARADO COM O GRUPO CONTROLE E ESTRÓGENO; ^c $p\leq 0.01$ QUANDO COMPARADO COM O GRUPO CONTROLE E ÓLEO DE MILHO. ^d $p\leq 0.01$ QUANDO COMPARADO COM O GRUPO CONTROLE E ÓLEO DE MILHO; ^e $p\leq 0.01$ QUANDO COMPARADO COM O GRUPO CONTROLE E ÓLEO DE MILHO. COMPARAÇÕES FEITAS DENTRO DA MESMA FAIXA ETÁRIA.

Com relação aos grupos experimentais, os animais jovens do grupo controle apresentaram maior concentração de 17β -estradiol no plasma quando comparados com os animais do mesmo grupo experimental, porém de faixas etárias distintas (ANOVA de uma via, $F(2,17)=37.18$, $p\leq 0.0001$). Tal diferença entre faixas etárias não foi observada dentre os animais do grupo óleo de milho (ANOVA, $F(2,18)=1.49$, $p=0.25$) e do grupo tratado com estrógeno (ANOVA, $F(2,18)=1.01$, $p=0.38$) (FIGURA 7).

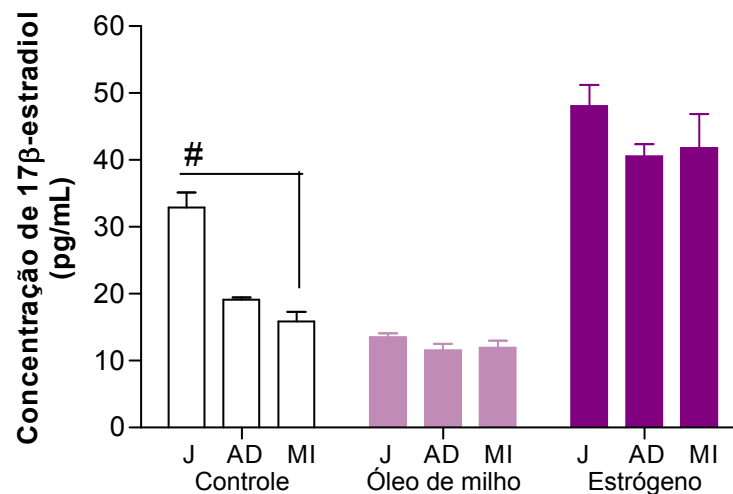


FIGURA 7. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE 17β-ESTRADIOL DOS ANIMAIS JOVENS (J), ADULTOS (AD) E DE MEIA-IDADE (MI) DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO. DADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM PARA 7 ANIMAIS/FAIXA ETÁRIA NO GRUPO CONTROLE; 8(J), 6(AD) E 7(MI) ANIMAIS NO GRUPO ÓLEO DE MILHO; E 6(J), 6(AD) E 8(MI) ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. # $p \leq 0.0001$.

5.2 CAMPO ABERTO

A tabela 4 apresenta o comportamento dos animais controle e dos tratados com óleo de milho ou estrógeno frente ao teste de campo aberto. A atividade locomotora dos animais jovens não foi significativamente diferente entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,33)=0.14$; $p=0.86$), bem como os comportamentos de levantar (ANOVA de uma via, $F(2,33)=1.25$; $p=0.3$), auto-limpeza (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,36)=5.63$; $p=0.60$) e imobilidade (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,36)=0.50$; $p=0.77$).

Semelhantemente entre os animais adultos, a atividade locomotora não foi expressivamente distinta entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,31)=0.93$; $p=0.40$), assim como a atividade exploratória (ANOVA de uma via, $F(2,31)=0.76$; $p=0.47$), o comportamento de imobilidade (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,34)=0.07$; $p=0.93$) e o de auto-limpeza (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,34)=2.19$; $p=0.23$) (TABELA 4).

Da mesma forma, a locomoção dos animais de meia-idade não divergiu entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,30)=0.84$; $p=0.44$), bem como a atividade

exploratória (ANOVA de uma via, $F(2,30)=0.66$; $p=0.52$), o comportamento de imobilidade (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,33)=1.33$; $p=0.51$) e o de auto-limpeza (ANOVA Kruskal-Wallis, $H(2,33)=3.45$; $p=0.18$) (TABELA 4).

TABELA 4 - COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO QUANDO EXPOSTOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO.

	GRUPO	FREQÜÊNCIA DE LOCOMOÇÃO	FREQÜÊNCIA DE LEVANTAR	FREQÜÊNCIA DE AUTO-LIMPEZA	FREQÜÊNCIA DE IMOBILIDADE
JOVENS	Controle	65,33±4,31	17,33±2,59	4,5(0/9,5)	32,5(13,5/82)
	Óleo de Milho	66,83±7,84	16,75±2,41	8,5(7/17)	43,5(17/111,5)
	Estrógeno	70,67±8,764	12,16±2,56	0,5(0/9)	57,5(21/98)
ADULTOS	Controle	57.91± 8.18	13,36±2,59	18(2/28)	70(29/90)
	Óleo de Milho	56.55± 6.52	17,90±3,20	13(1/17)	67(42/97)
	Estrógeno	68.41± 5.70	13,91±2,59	9(2/15)	62(17,5/101,5)
MEIA	Controle	66,63±7,41	13,90±2,90	0(0/10)	92(40/159)
	Óleo de Milho	63,40±9,93	16,80±3,24	1,5(0/10)	56,5(28/94)
	Estrógeno	54,25±3,88	12,50±1,86	3,5(0/6,5)	34,5(36/92)

DADOS DE FREQÜÊNCIA DE LOCOMOÇÃO E DE LEVANTAR EXPRESSOS COMO MÉDIA±EPM E ANALISADOS POR ANOVA DE UMA VIA. DADOS DE FREQÜÊNCIA DE AUTO-LIMPEZA E DE IMOBILIDADE REPRESENTADOS NA FORMA DE MEDIANA E INTERVALOS INTER-QUARTIS (Q25/Q75) E ANALISADOS POR ANOVA KRUSKAL-WALLIS. OS RESULTADOS COMPREENDEM 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (JOVENS); 11 ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE E ÓLEO DE MILHO, E 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO (ADULTOS); 11 ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE, 10 NO ÓLEO DE MILHO E 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO (MEIA-IDADE).

5.3 HABITUAÇÃO

5.3.1 Atividade locomotora

A atividade locomotora dos animais do grupo controle e dos tratados com óleo de milho ou estrógeno no teste de habituação está representada na figura 7. Os animais jovens não apresentaram diferença significativa entre os grupos ao longo dos quatro dias de teste: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,33)=0.14$; $p=0.86$), dia 2 (ANOVA $F(2,33)=0.21$; $p=0.80$), dia 3 (ANOVA $F(2,33)=0.56$; $p=0.57$) e dia 4 (ANOVA $F(2,33)=0.19$; $p=0.82$). O mesmo desempenho pode ser observado entre os animais adultos: dia 1 (ANOVA de uma via, $F(2,31)=0.93$; $p=0.40$), dia 2 (ANOVA $F(2,31)=0.90$; $p=0.41$), dia 3 (ANOVA $F(2,31)=0.34$; $p=0.71$) e dia 4 (ANOVA $F(2,31)=0.90$; $p=0.41$); e entre os animais de meia-idade: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,30)=0.84$; $p=0.44$), dia 2 (ANOVA $F(2,30)=0.16$; $p=0.85$), dia 3 (ANOVA $F(2,30)=1.80$; $p=0.18$) e dia 4 (ANOVA $F(2,30)=0.15$; $p=0.85$) (FIGURA 8).

5.3.2 Atividade exploratória

A figura 8 representa a atividade exploratória dos animais do grupo controle e dos tratados com óleo de milho ou estrógeno no teste de habituação. Neste teste, a atividade exploratória dos animais jovens não se mostrou distinta ao longo dos dias em nenhum grupo experimental: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,33)=1.25$; $p=0.29$), dia 2 (ANOVA $F(2,33)=0.76$; $p=0.48$), dia 3 (ANOVA $F(2,33)=0.25$; $p=0.78$) e dia 4 (ANOVA $F(2,33)=0.96$; $p=0.39$). A ausência de diferença significativa pode ainda ser notada entre os animais adultos: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,31)=0.77$; $p=0.47$), dia 2 (ANOVA $F(2,31)=0.36$; $p=0.70$), dia 3 (ANOVA $F(2,31)=0.91$; $p=0.41$) e dia 4 (ANOVA $F(2,31)=1.29$; $p=0.29$), e de meia-idade: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,30)=0.66$; $p=0.52$), dia 2 (ANOVA $F(2,30)=0.54$; $p=0.58$), dia 3 (ANOVA $F(2,30)=1.66$; $p=0.20$) e dia 4 (ANOVA $F(2,30)=0.58$; $p=0.56$) (FIGURA 9).

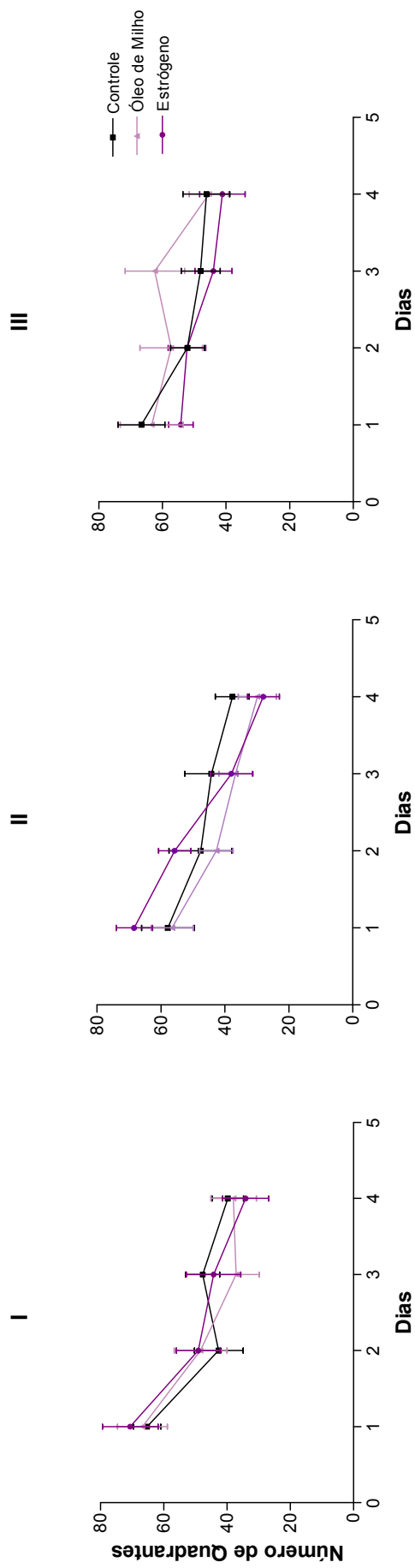


FIGURA 8. ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO OU ESTRÓGENO NO TESTE DE HABITUAÇÃO. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA \pm EPM PARA 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (I), 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO E 11 NO GRUPO ÓLEO DE MILHO E CONTROLE (II), E 11 ANIMAIS NO GRUPO CONTROLE, 10 NO DE ÓLEO DE MILHO E 12 NO GRUPO ESTRÓGENO (III), E FORAM ANALISADOS POR ANOVA DE UMA VIA.

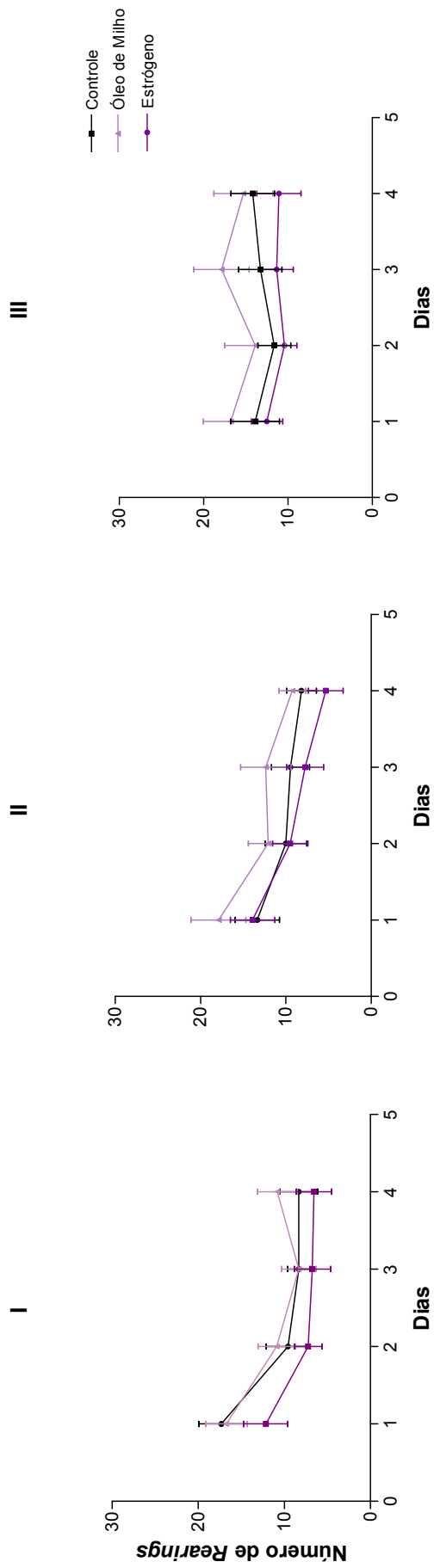


FIGURA 9. ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E TRATADOS COM ESTRÓGENO OU ÓLEO DE MILHO QUANDO SUBMETIDOS AO TESTE DE HABITUAÇÃO. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (I), 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO E 11 ANIMAIS NO GRUPO ÓLEO DE MILHO E NO CONTROLE (II), E 11 ANIMAIS NO GRUPO CONTROLE, 10 NO DE ÓLEO DE MILHO E 12 NO GRUPO ESTRÓGENO (III), E ANALISADOS POR ANOVA DE UMA VIA.

5.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

5.4.1 Memória de referência espacial

A figura 10 mostra o desempenho dos animais jovens, adultos e de meia-idade do grupo controle e dos tratados com óleo de milho ou estrógeno frente ao labirinto aquático de Morris. Na avaliação da memória de referência espacial entre os animais jovens, nenhum grupo se mostrou significativamente diferente ao longo dos cinco dias de teste: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,33)=1.25$; $p=0.26$), dia 2 (ANOVA $F(2,33)=0.01$; $p=0.99$), dia 3 (ANOVA $F(2,33)=2.33$; $p=0.11$), dia 4 (ANOVA $F(2,33)=0.5$; $p=0.61$) e dia 5 (ANOVA, $F(2,33)=0.24$; $p=0.29$).

Entre os animais adultos, nenhum grupo se mostrou significativamente diferente ao longo dos primeiros quatro dias de teste: dia 1 (ANOVA de uma via $F(2,31)=2.15$; $p=0.13$), dia 2 (ANOVA $F(2,31)=2.02$; $p=0.15$), dia 3 (ANOVA $F(2,31)=0.67$; $p=0.51$), dia 4 (ANOVA $F(2,31)=1.47$; $p=0.24$). Porém no quinto dia, os animais do grupo estrógeno tiveram melhor desempenho na tarefa quando comparados com os animais do grupo controle e óleo de milho (ANOVA, $F(2,31)=4.48$; $p=0.02$) (FIGURA 10).

Nos animais de meia-idade, os animais do grupo tratado com estrógeno tiveram melhor desempenho na tarefa que avalia o mencionado parâmetro a partir do segundo dia (ANOVA de uma via, $F(2,30)=3.50$; $p=0.04$): dia 3 (ANOVA, $F(2,30)=4.14$; $p=0.02$), dia 4 (ANOVA, $F(2,30)=4.60$; $p=0.01$) e dia 5 (ANOVA, $F(2,30)=5.47$; $p=0.01$), o que não foi evidenciado no primeiro (ANOVA, $F(2,30)=1.53$; $p=0.23$) (FIGURA 10).

5.4.2 Tempo de latência

A figura 11 mostra o tempo de latência dos animais jovens, adultos e de meia-idade do grupo controle e dos grupos tratados com óleo de milho e estrógeno quando expostos ao último dia de teste no labirinto aquático de Morris. Não houve

diferença significativa dentre os grupos experimentais com relação a este parâmetro entre os animais jovens (ANOVA $F(2,33)=0.74$; $p=0.48$). Já tanto os animais adultos como os de meia-idade do grupo estrógeno tiveram uma melhor atuação nesta tarefa quando comparados com os animais do grupo controle e os tratados com óleo de milho: adultos (ANOVA $F(2,31)=6.66$; $p=0,004$), meia-idade (ANOVA $F(2,30)=6.88$; $p=0,003$) (FIGURA 10).

5.5 NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA

A figura 12 mostra o tempo de natação, de imobilidade e de escalada dos animais frente ao teste de natação forçada modificada. Os animais do grupo jovem não apresentaram diferença com relação ao tempo de natação (ANOVA de uma via, $F(2,33)=1.70$; $p=0.19$), de imobilidade (ANOVA de uma via, $F(2,33)=1.84$; $p=0.17$) ou de escalada (ANOVA de uma via, $F(2,33)=0.94$; $p=0.39$) quanto expostos ao teste.

No grupo adulto, os animais do grupo estrógeno foram significativamente diferentes dos animais dos grupos controle e dos tratados com óleo de milho com relação ao tempo de natação (ANOVA de uma via, $F(2,31)=6.90$; $p=0.03$) e de imobilidade (ANOVA de uma via, $F(2,31)=5.38$; $p=0.01$). Entretanto, nenhum grupo foi divergente ao se analisar o tempo de escalada (ANOVA de uma via, $F(2,31)=1.62$; $p=0.21$) (FIGURA 12).

Os animais do grupo de meia-idade não apresentaram diferença com relação ao tempo de natação (ANOVA de uma via, $F(2,29)=1.60$; $p=0.21$), de imobilidade (ANOVA de uma via, $F(2,29)=1.573$; $p=0.22$) ou de escalada (ANOVA de uma via, $F(2,29)=0.16$; $p=0.85$) quanto expostos ao teste da natação forçada modificada (FIGURA 12).

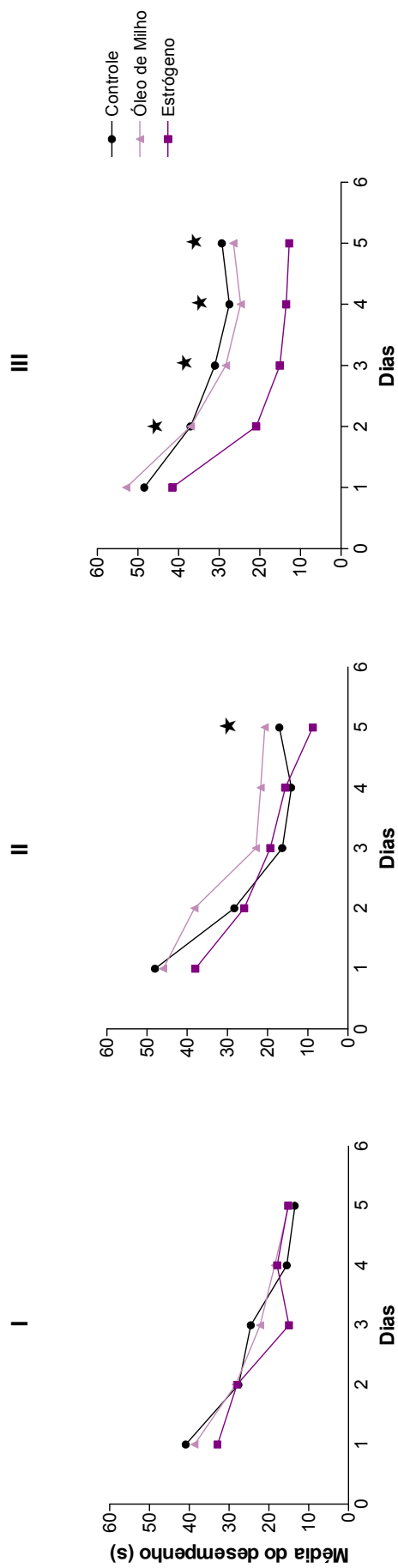


FIGURA 10. DESEMPENHO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS TRATADOS COM ESTRÓGENO OU ÓLEO DE MILHO QUANDO SUBMETIDOS AO TESTE DE MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM PARA 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (I), 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO E 11 ANIMAIS NO GRUPO ÓLEO DE MILHO E NO CONTROLE (II), E 11 ANIMAIS NO GRUPO CONTROLE, 10 NO DE ÓLEO DE MILHO E 12 NO GRUPO ESTRÓGENO (III). ANOVA DE UMA VIA, PÓS-TESTE DE DUNCAN. ★ SIGNIFICATIVO PARA $p \leq 0.05$.

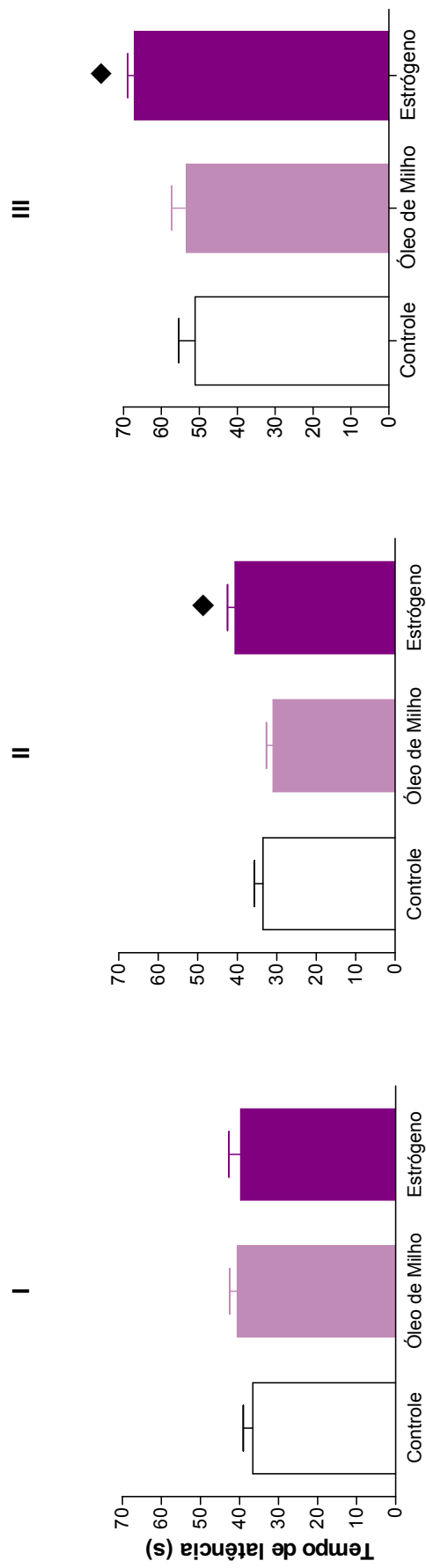


FIGURA 11. TEMPO DE LATÊNCIA DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO NO ÚLTIMO DIA DE TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (I), 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO E 11 ANIMAIS NO GRUPO ÓLEO DE MILHO E NO CONTROLE (II), E 11 ANIMAIS NO GRUPO CONTROLE, 10 NO DE ÓLEO DE MILHO E 12 NO GRUPO ESTRÓGENO (III). ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA POR PÓS-TESTE DE DUNCAN. ◆ SIGNIFICATIVO PARA $p \leq 0.05$.

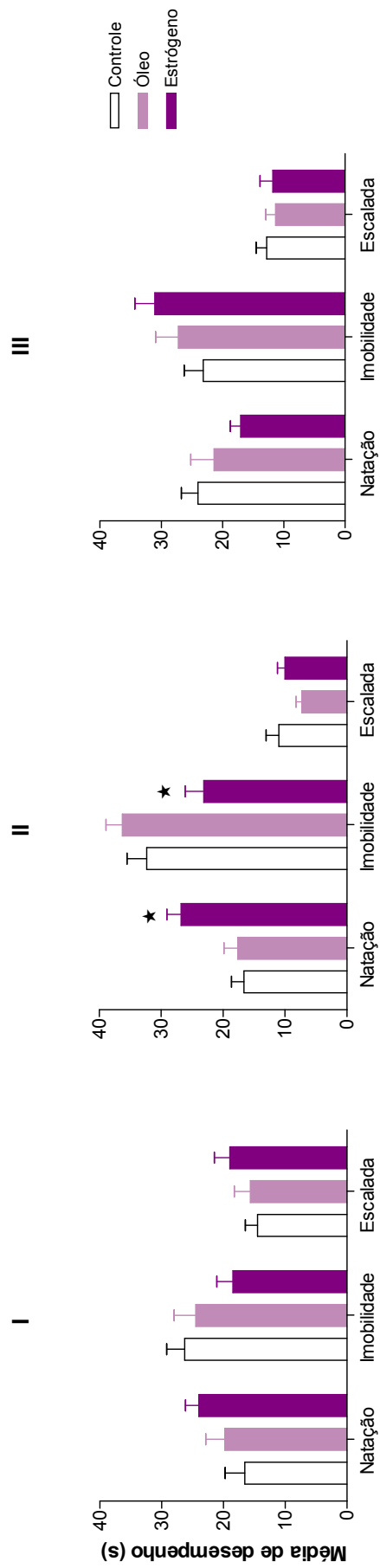


FIGURA 12. DESEMPENHO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO FRENTE AO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA COM RELAÇÃO AO TEMPO DE NATAÇÃO, DE IMOBILIDADE E DE ESCALADA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM 12 ANIMAIS EM CADA GRUPO (I), 12 ANIMAIS NO GRUPO ESTRÓGENO E 11 ANIMAIS NO GRUPO ÓLEO DE MILHO E NO CONTROLE (II), E 11 ANIMAIS NO GRUPO CONTROLE, 10 NO DE ÓLEO DE MILHO E 12 NO GRUPO ESTRÓGENO (III). ANOVA DE UMA VIA, PÓS-TESTE DE DUNCAN. * SIGNIFICATIVO PARA $p \leq 0.05$.

5.6 ANÁLISE NEUROQUÍMICA

As figuras 13-15 representam a avaliação neuroquímica do hipocampo esquerdo dos animais experimentais. Dentre os jovens, não houve diferença estatística nas concentrações de NA (ANOVA de uma via $F(2,12)=2.27$; $p=0.14$), 5-HT (ANOVA de uma via $F(2,12)=1.73$; $p=0.21$) e 5-HIAA (ANOVA de uma via $F(2,12)=3.21$; $p=0.07$) entre todos os grupos experimentais (FIGURAS 13-15).

A ausência de diferença significativa também pode ser notada entre os animais adultos quando avaliada a concentração dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina: NA (ANOVA de uma via $F(2,12)=3.10$; $p=0.08$) e 5-HT (ANOVA de uma via $F(2,12)=1.39$; $p=0.28$) (FIGURAS 13 e 14). Já com relação ao metabólito da serotonina, 5-HIAA, os animais do grupo estrógeno foram significativamente diferentes dos animais do grupo controle e do tratado com óleo de milho (ANOVA de uma via $F(2,12)=14.81$; $p=0.00005$) (FIGURA 15).

Os animais de meia-idade não apresentaram diferença significativa entre os grupos na avaliação das concentrações de NA (ANOVA de uma via $F(2,12)=3.06$; $p=0.08$), 5-HT (ANOVA de uma via $F(2,12)=0.33$; $p=0.72$) e 5-HIAA (ANOVA de uma via $F(2,12)=0.69$; $p=0.52$) (FIGURAS 13-15).

A figura 16 mostra a taxa de *turnover* da serotonina no hipocampo esquerdo dos animais. Quando analisado os dados de *turnover*, os animais jovens não apresentaram diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via $F(2,12)=2.46$; $p=0.12$). Os animais adultos do grupo estrógeno, porém, foram estatisticamente diferentes dos animais do grupo controle e dos tratados com óleo de milho (ANOVA de uma via $F(2,12)=12.32$; $p=0.001$), diferença não observada entre os grupos experimentais dos animais de meia-idade (ANOVA de uma via $F(2,12)=1.08$; $p=0.37$) (FIGURA 16).

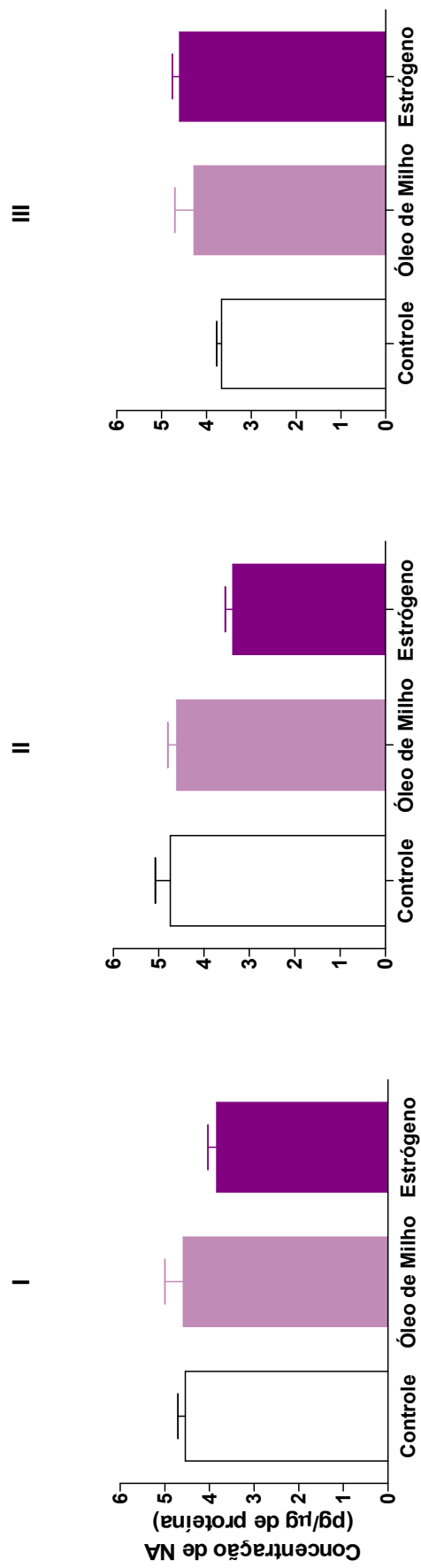


FIGURA 13. CONCENTRAÇÃO DE NORADRENALINA (NA) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM DE 5 ANIMAIS EM CADA GRUPO E FORAM ANALISADOS POR ANOVA DE UMA VIA.

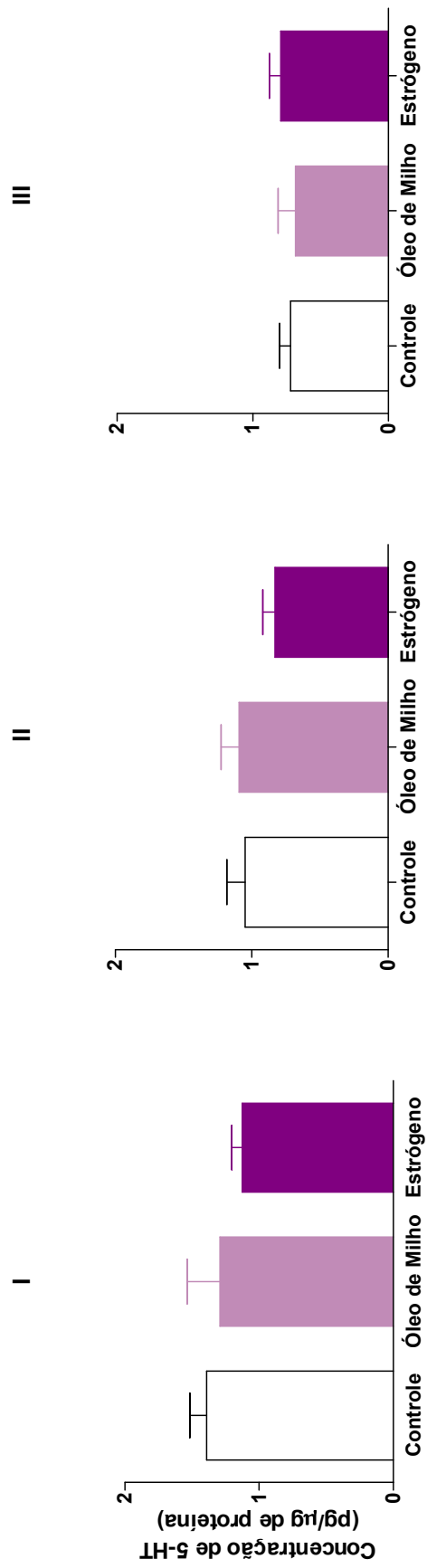


FIGURA 14. CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA (5-HT) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM PARA 5 ANIMAIS EM CADA GRUPO E FORAM ANALISADOS POR ANOVA DE UMA VIA.

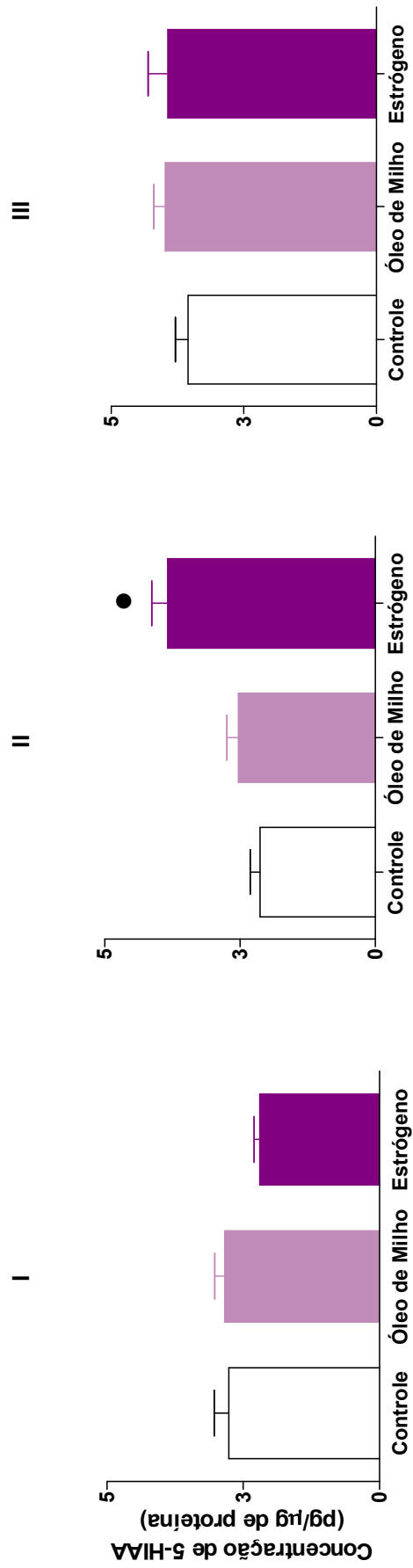


FIGURA 15. CONCENTRAÇÃO DO METABÓLITO DA SEROTONINA (5-HIAA) NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM EM 5 ANIMAIS EM CADA GRUPO. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA POR PÓS-TESTE DE DUNCAN. ● SIGNIFICATIVO PARA $p \leq 0.01$.

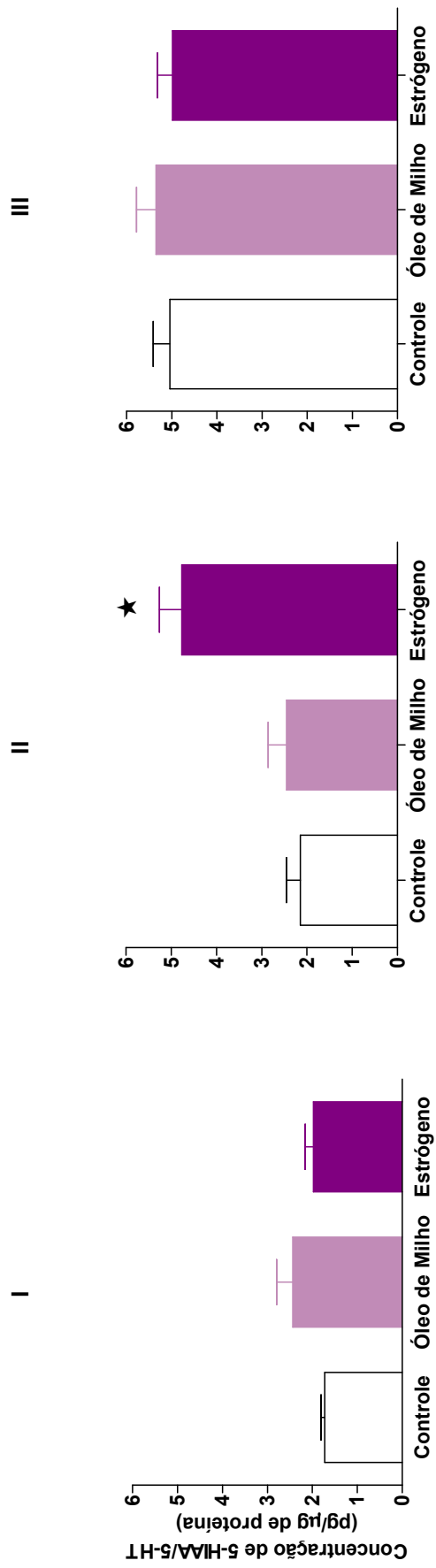


FIGURA 16. TAXA DE TURNOVER SEROTONINÉRGICO NO HIPOCAMPO ESQUERDO DOS ANIMAIS JOVENS (I), ADULTOS (II) E DE MEIA-IDADE (III) DO GRUPO CONTROLE E DOS GRUPOS TRATADOS COM ÓLEO DE MILHO E ESTRÓGENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM EM 5 ANIMAIS EM CADA GRUPO. ANOVA DE UMA VIA, PÓS-TESTE DE DUNCAN. ★SIGNIFICATIVO PARA $p \leq 0.01$.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, os efeitos do estrógeno sobre comportamentos não-reprodutivos, tais como comportamento depressivo, de ansiedade e cognitivo, têm recebido grande destaque (SPENCER *et al.*, 2008). Ainda, os efeitos de proteção do estrógeno em modelos de neurodegeneração têm implicações positivas para o papel deste esteróide no tratamento de doenças desta natureza (GREEN; SIMPKINS, 2000). O declínio fisiológico dos níveis estrogênicos durante o envelhecimento parece também estar envolvido no aumentado risco de distúrbios neurodegenerativas em mulheres na pós-menopausa (AMANTEA *et al.*, 2005). Alguns estudos, porém, não apóiam a noção de que o tratamento com estrógeno provoque efeitos benéficos sobre a cognição (ESPELAND *et al.*, 2004; SHUMAKER *et al.*, 2004; WOLF *et al.*, 2005). Tais autores sugerem que o cérebro humano deva perder sua responsividade a esteróides gonadais com o envelhecimento ou com depleção hormonal prolongada.

Os esteróides sexuais femininos variam de acordo com a fase do ciclo reprodutivo. Em roedores, o ciclo estral tem a duração de 96 horas (quatro dias), e é dividido em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro. Os picos hormonais ocorrem dentro de 24 horas do período de proestro, com um subsequente e rápido declínio hormonal durante o estro (LUINE, 2008; SPENCER *et al.*, 2008; PAWLUSKI *et al.*, 2009). Estudos que envolvem o ciclo estral devem incluir avaliações nas múltiplas fases do ciclo por causa destas mudanças e/ou flutuações hormonais (LUINE, 2008). Além disso, devido às potenciais diferenças entre os efeitos que doses farmacológicas e fisiológicas de hormônios podem causar, estudos em mamíferos intactos são necessários para corroborar a pesquisa com administração exógena de estrógeno, de modo a demonstrar a relevância fisiológica dos resultados. Igualmente, estudos que incluem ovariectomia e reposição hormonal (no caso, administração de estradiol) são necessários para legitimar os achados dos estudos em animais intactos (SPENCER *et al.*, 2008).

Muitos estudos determinam o estágio do ciclo estral pelo método de esfregaço vaginal, a partir do qual é realizada uma análise celular com o intuito de se evidenciar a fase do ciclo no momento da coleta. Porém, uma vez a prática do esfregaço vaginal e a consequente manipulação excessiva do animal podem afetar

parâmetros comportamentais (BECKER *et al.*, 2005; JANS *et al.*, 2007; LUINE, 2008), optamos por não aplicar o método de esfregaço vaginal nos animais experimentais. Somado a este fato, como o protocolo dos testes comportamentais exigir a realização dos mesmos ao longo de dois a cinco dias consecutivos, não seria possível testar os animais em somente uma fase do ciclo. Além disso, deve ser ressaltado que apesar de alguns estudos mencionarem que o desempenho cognitivo possa variar ao longo das fases do ciclo reprodutivo (AMANTEA *et al.*, 2005; FRYE *et al.*, 2007), outros estudos mostram ainda que o ciclo estral não exerce influência sobre respostas comportamentais de algumas tarefas (ver RUTZ *et al.*, 2009, para revisão). Um estudo de Sutcliffe e colaboradores (2007), por exemplo, mostrou que não houve influência do ciclo estral na tarefa de reconhecimento de um novo objeto (*novel object recognition task*) em ratos tanto na versão espacial quanto na versão não-espacial desta tarefa.

Em contraste aos vários experimentos que têm investigado os efeitos da administração aguda de estradiol, poucos trabalhos têm estudado a administração crônica deste hormônio sobre aspectos cognitivos (PAWLUSKI *et al.*, 2009). No presente estudo, a administração de 17 β -estradiol por meio de cápsulas de Silastic resultou em exposição contínua a altos níveis plasmáticos do hormônio por aproximadamente dois meses, sem, no entanto, alcançar valores suprafisiológicos (TABELA 3). Os níveis de estradiol circulante foram determinados em todos os animais com o intuito de correlacionar estes valores às três diferentes faixas etárias em estudo. Como esperado, nos animais jovens do grupo controle, a concentração plasmática de 17 β -estradiol foi significativamente mais alta do que a dos animais adultos e de meia-idade deste mesmo grupo experimental (FIGURA 7), corroborando a divisão de faixas etárias deste estudo.

Os níveis plasmáticos de estradiol foram também determinados de modo estabelecer uma conexão entre a concentração de 17 β -estradiol no plasma e os resultados dos testes comportamentais. Curiosamente, os animais jovens do grupo controle e do grupo tratado com estrógeno, apesar de terem altos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol, não apresentaram melhora de desempenho cognitivo em nenhum dos testes avaliados quando comparados aos resultados incrementais dos animais adultos e de meia-idade do grupo com cápsula de 17 β -estradiol (FIGURAS 10 a 12). Vale ressaltar que, apesar da concentração plasmática de 17 β -estradiol dos animais controle jovens ser significativamente menor do que a dos animais tratados com

estrógeno (TABELA 3,^a), o grupo controle jovem apresenta maior concentração deste hormônio quando comparado com os animais do mesmo grupo experimental (FIGURA 7). Uma possível interpretação desta desigualdade seria a diferença de responsividade do cérebro ao longo da vida frente ao tratamento hormonal. Um artigo de revisão de Pawluski e colaboradores (2009) compila vários estudos utilizando a resposta de neurônios hipocâmpais envolvidos na cognição, indicando que a idade de fato desempenha um papel significativo nos efeitos do tratamento com estradiol sobre neurogênese no giro denteado, com ratas mais velhas apresentando maior capacidade de responder ao tratamento crônico do que ao agudo, e que a aumentada neurogênese hipocâmpal em animais de meia-idade possuiria benéficos efeitos morfológicos, comportamentais e cognitivos. Isto se daria porque quando jovens, a capacidade do cérebro rapidamente desenvolver um substrato para homeostase manteria a função cerebral normal, sem, no entanto responder de modo incremental ao tratamento com estradiol. Já durante a transição para a menopausa, os ciclos irregulares e os níveis hormonais ovarianos imprevisíveis exigem uma plasticidade ainda maior da responsividade neuronal, o que por sua vez torna este período o momento ótimo para o tratamento hormonal. Após a menopausa, o cérebro, na tentativa de estabelecer um novo substrato homeostático de modo a manter a função cerebral normal, muitas vezes se vê inábil em rapidamente estabelecer esta nova base de funcionamento cerebral, o que pode levar à aumentada suscetibilidade a distúrbios de humor e a diminuídas funções cognitivas (DEECHER *et al.*, 2008).

Aspectos não-mnemônicos do desempenho de tarefas cognitivas, tais como estímulo, motivação ou função sensório-motora (HARBURGER *et al.*, 2007), podem ser afetados por determinados tratamentos, ou ainda por diferentes faixas etárias, o que levaria a uma interpretação errônea dos resultados obtidos nas tarefas testadas. Também é de extrema importância notar que diferenças basais podem ocorrer ao se comparar genótipos, sexo, idades e tratamentos (LEUSSIS; BOLÍVAR, 2006). Sendo assim, neste trabalho, a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais experimentais foram avaliados no teste do campo aberto, de modo a se evitar resultados falsamente positivos nos testes subsequentes. Ambos os parâmetros não foram influenciados pelo tratamento com 17 β -estradiol, nem divergiram de acordo com a idade dos animais testados (TABELA 4), resultados que estão em conformidade com a literatura. Um estudo de Padilla e colaboradores

(2009) com três diferentes linhagens de ratos (Holtzman, Long–Evans e Sprague–Dawley) mostrou que a reação a um ambiente novo e a atividade ambulatorial de fêmeas não foram distintas entre as linhagens avaliadas, apesar de a atividade locomotora ter sido significativamente maior em fêmeas do que em machos. Pandaranandaka e colaboradores (2009), comparando o efeito de doses crônicas de estrógeno exógeno em ratas ovariectomizadas e níveis naturalmente altos de estrógeno endógeno em ratas intactas, indicaram que a atividade locomotora de ambos os grupos não foi afetada pelo tratamento com 17β -estradiol. Um estudo de Gresack e colaboradores (2007) apontou que a atividade locomotora de camundongos jovens, de meia-idade e senescentes no campo aberto não foi diferente entre os grupos tratados com estrógeno ou não, mantidos em meio enriquecido ou padrão. O tratamento com estradiol também não provocou efeito sobre a atividade locomotora e exploratória de camundongos ovariectomizados quando comparados com animais sham-operados (XU; ZHANG, 2006). Por fim, pesquisas ainda reportam que o ciclo estral também não exerce influência sobre a atividade locomotora de ratas. Um estudo de Hiroi e Neumaier (2006) reportou que ratas em proestro não foram significativamente diferentes de ratas em outras fases do ciclo estral quando testadas com o campo aberto.

A habituação é uma forma primitiva de aprendizado não-associativo definida como a diminuição de uma resposta elicitada pela exposição repetida a um estímulo novo. Uma das formas mais comuns de habituação vistas em roedores é a diminuição do comportamento exploratório em resposta à exposição contínua e repetida a um ambiente novo, como um campo aberto. A exploração é freqüentemente mensurada como uma mudança na atividade motora, avaliada pela distância percorrida durante o teste, o número de cruzamentos ou a quantificação do comportamento exploratório (LEUSSIS; BOLÍVAR, 2006). A habituação comportamental a um ambiente novo é comumente empregada em ratos e camundongos como um paradigma para o exame de processos de aprendizado não-associativo e de memória, bem como para a averiguação de efeitos benéficos ou deletérios de determinadas substâncias sobre aprendizado e memória (LEUSSIS; BOLÍVAR, 2006). Ao se avaliar o possível impacto do tratamento com 17β -estradiol sobre a habituação dos animais jovens, adultos e de meia-idade, o tratamento com este hormônio não foi hábil em melhorar o desempenho dos animais em nenhuma das faixas etárias (FIGURAS 7 e 8), e todos os grupos apresentaram diminuição da

atividade locomotora e do comportamento exploratório ao longo dos quatro dias de teste. Apesar de a literatura sugerir que o estrógeno exerça efeitos positivos sobre a cognição, a melhora em todos os aspectos de memória e em todas as tarefas não deveria ser esperada, já que o tratamento hormonal afeta diferentemente os componentes cognitivos (LUINE, 2008). Estudos mostram que o estrógeno influencia experimentalmente o desempenho cognitivo de acordo com o tipo da tarefa utilizada (BIMONTE-NELSON *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2008) e desenvolve plasticidade hipocampal, caracterizada por respostas dinâmicas na neurogênese, morfogênese e transmissão sináptica desta região (BRINTON, 2009). Tanto a dimensão quanto a localização da plasticidade induzida pelo estrógeno presumem que o estrógeno afete preferivelmente tarefas cognitivas de maior complexidade, exigência temporal e desafio associativo. Logo, tarefas de aprendizado e de memória relativamente menos exigentes não usufruiriam da plasticidade promovida pelo tratamento hormonal (BRINTON, 2009).

O hipocampo é o principal mediador de aprendizado e memória espacial, e tarefas planejadas para testar faculdades hipocampais em roedores incluem o labirinto aquático de Morris (SPENCER *et al.*, 2008). Variações no protocolo deste paradigma permitem a avaliação da memória de referência espacial, tarefa aplicada no presente estudo. A exposição a subseqüentes tentativas de aquisição ao longo de cinco dias fornece uma medida de aprendizado espacial, enquanto que o teste realizado no sexto dia (*probe trial*) mensura a capacidade de evocar a memória, bem como sua força e precisão (RUTZ *et al.*, 2009). Nossos resultados mostram que, embora todos os animais adultos apresentem uma queda na média de desempenho ao longo dos dias, indicando resposta positiva de aprendizado espacial, os animais tratados com 17β -estradiol tiveram desempenho muito mais acentuado no último dia da fase de aquisição quando comparado ao desempenho dos animais tratados com veículo ou controle (FIGURA 10). Este efeito incremental se manteve no sexto dia de teste, sugerindo que o tratamento com 17β -estradiol tenha sido hábil em melhorar a consolidação da memória de referência espacial em ratas adultas (FIGURA 11). Dados da literatura confirmam os resultados encontrados no presente trabalho. Estudos de El-Bakri e colaboradores (2004), assim como de Feng e colaboradores (2004) apontam que a reposição com estrógeno em dose crônica provocou efeito incremental sobre o a memória de referência espacial em ratas adultas. Da mesma forma, quando estradiol foi administrado a ratas

ovariectomizadas de modo que concentrações fisiológicas fossem alcançadas durante o treinamento e a consolidação, o desempenho dos animais tratados foi melhorado sobre o produzido pela administração de veículo (revisto em FRYE *et al.*, 2007), apontando efeitos positivos do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória de referência espacial de roedores adultos.

O efeito benéfico do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória de referência espacial foi muito mais evidente, porém, em ratas de meia-idade, tanto com relação à fase de aquisição (FIGURA 10) como referente à consolidação da memória (FIGURA 11). Estes resultados confirmam e estendem os obtidos por outros pesquisadores. Animais na meia-idade não foram responsivos à remoção do hormônio ovariano, mas responderam positivamente à reposição estrogênica quando avaliados numa tarefa de memória de referência espacial (TALBOOM *et al.*, 2008), consistente com resultados prévios de Markham e colaboradores (2002). O tratamento com 17β -estradiol melhorou a memória para a localização da plataforma em ratas (FRICK *et al.*, 2002), efeito igualmente provocado pela reposição com estrógeno em dose crônica ou cíclica em ratos fêmeas de meia-idade frente a uma tarefa de memória de referência espacial (BIMONTE-NELSON *et al.*, 2006). Sendo assim, a habilidade de o estrógeno melhorar a memória de referência espacial parece aumentar conforme os animais se movem da fase adulta para a meia-idade.

Modelos animais de depressão permitem uma investigação simples, porém ordenada, de algumas mudanças fisiológicas associadas a este distúrbio. O modelo de comportamento depressivo responsivo a antidepressivos mais amplamente usado é o teste da natação forçada (BRIONES-ARANDA *et al.*, 2005). Neste paradigma, roedores alternam respostas ativas de escalada e de natação com comportamento de imobilidade após serem colocados em um recipiente com água. O tempo que o animal passa em um estado inativo ou imóvel é interpretado como medida de comportamento depressivo (PORSOLT *et al.*, 1978; DUMAN; MONTEGGIA, 2006), e este modelo também avalia comportamentos distintos especificamente associados à ativação noradrenérgica (escalada) e à serotoninérgica (natação) (DETKE *et al.*, 1995; CRYAN *et al.*, 2002).

Nossos dados indicam que o tratamento com 17β -estradiol nas ratas adultas diminuiu o tempo de imobilidade destes animais quando comparados com o tratamento veículo e os animais intactos, sugerindo um efeito positivo do tratamento hormonal sobre o comportamento depressivo nesta faixa etária (FIGURA 12). Uma

vez a atividade locomotora, mensurada pelo total de quadrantes cruzados no campo aberto, não ter sido diferente entre estes animais, concluímos que as alterações nos parâmetros de depressão obtidos no teste da natação forçada não foram devidas a alteração locomotora. Estes resultados estão em conformidade com a literatura, os quais apontam ainda que a duração da imobilidade neste teste não varia ao longo de todas as fases do ciclo estral (DEECHER *et al.*, 2008). Em ratas ovariectomizadas, 17 β -estradiol diminuiu o tempo de imobilidade no teste da natação forçada (ESTRADA-CAMARENA *et al.*, 2003). Okada e co-autores (1997) mostraram que o tratamento com estradiol restaurou o comportamento de imobilidade a níveis controle em ratas ovariectomizadas. Em um recente estudo de Walf e Frye (2007), a infusão de 17 β -estradiol no hipocampo de ratas ovariectomizadas dez minutos antes da realização dos testes comportamentais induziu comportamento antidepressivo quando comparado com administração de veículo na mesma região cerebral. No modelo de natação forçada para camundongos, um trabalho desenvolvido por Bekku e Yoshimura (2005) revelou que o estrógeno reduziu significativamente a imobilização prolongada induzida pela ovariectomia. Em um estudo com camundongos nocaute para ER β , os animais selvagens responderam ao tratamento com 17 β -estradiol por reduzir significativamente o tempo de imobilidade no teste da natação forçada, enquanto que os animais nocaute não foram afetados pelo tratamento com 17 β -estradiol (ROCHA *et al.*, 2005). Em conjunto, estes dados sugerem um papel para os hormônios ovarianos, mais especificamente o estradiol, na regulação de respostas normais a estímulos estressores, provavelmente envolvendo mecanismos mediados por ER β no hipocampo (BODO; RISSMAN, 2006; ÖSTERLUND, 2009).

Como afirmado anteriormente, o hipocampo é uma região cerebral comprovadamente envolvida em processos de memória de informações espaciais. Esta região cerebral, como parte do sistema límbico, é sensível à ação do estradiol, e tem também sido considerada alvo para os possíveis efeitos deste hormônio sobre a depressão (ÖSTERLUND, 2009). Portanto, esta região cerebral foi escolhida para a avaliação neuroquímica dos neurotransmissores NA e 5-HT. Como os dados do teste da natação forçada indicaram aumento no comportamento associado à via serotoninérgica, representado pelo elevado comportamento natatório das ratas adultas tratadas com 17 β -estradiol (FIGURA 12), e ausência de diferença significativa no comportamento associado à via noradrenérgica, representado pelo

comportamento de escalada (FIGURA 12), as concentrações hipocâmpais do metabólito da 5-HT, 5-HIAA, foram adicionalmente investigadas. Em concordância com os resultados comportamentais, o tratamento com 17 β -estradiol não surtiu efeitos sobre a concentração de NA no hipocampo dos animais experimentais em nenhuma das faixas etárias estudadas (FIGURA 13). Apesar de alguns estudos indicarem que tanto o sistema serotoninérgico quanto o noradrenérgico respondam às mudanças previsíveis no ambiente hormonal (revisado por DEECHER *et al.*, 2008), nossos resultados não foram significativos com relação às concentrações hipocâmpais de NA. Isto pode ser justificado pelo fato dos níveis de NA serem mais responsivos a alterações de hormônio luteinizante, ao invés de estradiol ou progesterona (MOHANKUMAR *et al.*, 1994), e de o sistema noradrenérgico perder sua responsividade frente a um meio hormonal flutuante (refletido pelos animais controle) ou estático (representado pelos animais ovariectomizados e pelos sob reposição hormonal) (DEECHER *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico estão dinamicamente interligados, com neurônios serotoninérgicos projetando para neurônios noradrenérgicos e vice-versa. A interdependência destes dois sistemas também age de modo a modulá-los, e estudos sugerem que neurônios serotoninérgicos possuam um efeito inibitório sobre a excitação noradrenérgica (BLIER, 2001). Portanto, a ausência de valores significativos para NA no nosso estudo poderia ser explicada pela aumentada atividade serotoninérgica, discutida a seguir.

A 5-HT é um neurotransmissor rapidamente captado e metabolizado, sobretudo intracelularmente, em 5-HIAA. Como consequência, níveis aumentados ou diminuídos deste metabólito são indicativos de aumentada ou diminuída atividade serotoninérgica. A razão 5-HIAA/5-HT representa, então, um índice da atividade das células que integram a liberação, recaptação e/ou metabolismo da 5-HT (CORNIL *et al.*, 2006). Seguindo esta correlação, apesar da concentração hipocâmpal de 5-HT não ter sido significativamente diferente entre os animais de todos os grupos experimentais em todas as idades (FIGURA 14), o estradiol elevou os níveis hipocâmpais de 5-HIAA nos animais adultos (FIGURA 15), o que, consequentemente, provocou o aumento da razão 5-HIAA/5-HT (FIGURA 16) nestes animais, sugerindo que a relativa baixa concentração de 5-HT deva estar associada a um maior uso deste neurotransmissor (ABDELNABI; OTTINGER, 2003). Desta forma, uma maior atividade serotoninérgica e um metabolismo de 5-HT acelerado

punderam ser evidenciados nos animais adultos tratados com 17β -estradiol, o que concilia os dados neuroquímicos e comportamentais. A análise destes dados se torna interessante ao relacioná-la a um estudo de Drossopoulou e colaboradores (2004) com roedores fêmeas e machos. Ratas intactas, quando expostas ao teste da natação forçada, apresentaram queda na atividade serotoninérgica hipocampal, níveis diminuídos de 5-HIAA, bem como diminuída razão 5-HIAA/5-HT nesta região cerebral, refletindo diminuído metabolismo e menos liberação de 5-HT hipocampal em comparação aos machos (DROSSOPOULOU *et al.*, 2004). Estes resultados estão de acordo com o conhecimento de que insultos agudos e inescapáveis, como os impostos pelo teste da natação forçada, provocam reduções de níveis de monoaminas, especialmente de 5-HT no hipocampo (ANISMAN *et al.*, 2008b). Em nosso estudo, as fêmeas adultas não tratadas com 17β -estradiol também apresentaram menor atividade serotoninérgica contra os animais tratados. Logo, o tratamento com 17β -estradiol foi capaz de atuar sobre este sistema neurotransmissor nas fêmeas desta idade. Tal ação foi igualmente descrita por Pandaranandaka *et al.* (2009), que encontraram aumentada razão 5-HIAA/5-HT no hipocampo e núcleo accumbens de ratas adultas ovariectomizadas tratadas com estradiol comparado com ratas ovariectomizadas sem tratamento e ratas falsamente operadas. Sendo assim, nossos dados corroboram a noção de que estrógeno e sistema serotoninérgico estejam interligados (CORNIL *et al.*, 2006; DEECHER *et al.*, 2008) e que o aumento da síntese, secreção e/ou *turnover* de 5-HT seja um mecanismo pelo qual o estradiol possa exercer seu efeito sobre os distúrbios de humor, incluindo a depressão (BODO; RISSMAN, 2006).

É importante notar que poucos estudos correlacionam as concentrações de 5-HT no hipocampo com o desempenho de ratos frente ao labirinto aquático de Morris, apesar deste neurotransmissor ter sido demonstrado alterar plasticidade sináptica nesta estrutura (ZHONG *et al.*, 2008; ABE *et al.*, 2009). Ratos senescentes com déficits de aprendizado exibiram níveis reduzidos de 5-HT (STEMMELIN *et al.*, 2000), logo, cogitou-se que perturbações da neurotransmissão de 5-HT pudessem afetar vários fenômenos fisiológicos e patofisiológicos, como formação e/ou consolidação da memória, depressão, distúrbio obsessivo-compulsivo e distúrbios do sono (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004). Nosso estudo, porém, mostra que mesmo embora os animais adultos apresentem melhora na consolidação da memória de referência espacial (FIGURA 11) bem como aumentada atividade serotoninérgica no

hipocampo (FIGURA 16), a melhora de desempenho frente ao labirinto aquático de Morris nos animais de meia-idade (FIGURA 11) não foi acompanhada de alteração serotoninérgica hipocampal (FIGURA 16). Apesar de o hipocampo apresentar alta densidade de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇, a literatura traz resultados conflitantes com relação a estes receptores e diversas tarefas cognitivas (PEREZ-GARCIA; MENESES, 2009). Nossos dados sugerem que o sistema serotoninérgico aparentemente não está implicado no aprendizado, consolidação da memória e evocação da memória de referência espacial. Esta hipótese é apoiada por um estudo de Sarkysian e Hedlund (2009) com camundongos nocaute para 5-HT₇, o qual mostrou que a proliferação celular no giro denteado não foi alterada pela inativação do receptor 5-HT₇, e que este receptor é importante apenas para memória espacial allocêntrica, na qual a posição de objetos ou estímulos independe do observador. Ainda, o receptor 5-HT₇ não está envolvido na memória espacial egocêntrica, aquela que está em correlação com o observador. Como a versão do labirinto aquático de Morris utilizada neste estudo avaliou a memória de referência espacial dos animais, uma tarefa que envolve memória espacial egocêntrica, a ausência de relação entre o melhorado desempenho cognitivo dos animais de meia-idade e as respectivas baixas concentrações hipocampais de 5-HT e 5-HIAA, bem como a taxa de *turnover*, se faz justificada.

Existe uma discussão contínua sobre a existência de uma janela temporal crítica no tratamento hormonal, a qual permita o surgimento de efeitos positivos do tratamento com estrógeno sobre funções cognitivas (SHERWIN, 2005; 2006; 2007). A hipótese do “período crítico” sugere que o sistema de envelhecimento seja mais responsivo ao tratamento com estradiol se este for iniciado juntamente com, e não após, o declínio ovariano (WALF *et al.*, 2009), quando os neurônios ainda se encontram em um estado saudável (AMANTEA *et al.*, 2005). Nossos dados de fato acompanham a literatura, ao indicarem que os animais adultos e de meia-idade foram responsivos ao tratamento com 17 β -estradiol após a ovariectomia quando avaliados em uma tarefa de memória de referência espacial. Tal janela de oportunidade para terapia de reposição hormonal tem sido igualmente proposta com relação ao TDM (DEECHER *et al.*, 2008), e evidências clínicas sugerem que a perimenopausa é o período de maior risco para o desenvolvimento da depressão (ÖSTERLUND, 2009), enquanto que a pós-menopausa é o período de menor incidência de depressão (DEECHER *et al.*, 2008). Seguindo esta linha, nosso

trabalho revelou efeito antidepressivo do tratamento com 17β -estradiol apenas em animais adultos, e não em animais de meia-idade, o que corrobora a noção de que exista um período de tempo no qual o funcionamento cerebral deva se recompor frente às flutuações hormonais instáveis da perimenopausa e se ajustar ao estado hipoestrogênico após a menopausa, processo chamado de adaptação cerebral (DEECHER *et al.*, 2008).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos do tratamento crônico com 17β -estradiol sobre funções cognitivas e comportamento depressivo de ratas *Wistar* ovariectomizadas jovens, adultas e de meia-idade, e a relação destes a alterações nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico. Com base nos resultados expostos e discutidos, pode-se concluir que:

- o tratamento com 17β -estradiol foi capaz de melhorar o desempenho da memória de referência espacial de ratas *Wistar* ovariectomizadas adultas e de meia-idade, sendo que os animais de meia-idade demonstraram mais rápida responsividade ao tratamento estrogênico;
- a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais experimentais não foram influenciados pelo tratamento com 17β -estradiol em nenhuma faixa etária;
- o tratamento com 17β -estradiol teve efeito antidepressivo sobre o comportamento depressivo de ratas *Wistar* ovariectomizadas adultas, as quais apresentaram diminuído tempo de imobilidade frente ao teste da natação forçada;
- o tratamento com 17β -estradiol foi capaz de aumentar a taxa de *turnover* de serotonina hipocampal em ratas *Wistar* ovariectomizadas adultas, que apresentaram aumentado comportamento de natação no teste da natação forçada;
- os efeitos benéficos do tratamento com 17β -estradiol sobre a memória de referência espacial e o comportamento depressivo de roedores parecem depender de uma janela temporal ótima para serem evidenciados.

Ao analisar possíveis respostas distintas ao tratamento hormonal ao longo de três faixas etárias relevantes para processos cognitivos e emocionais, este trabalho se mostra relevante por debater questões relacionadas ao tratamento estrogênico e possíveis correlações deste com outros distúrbios de ordem neurológica em períodos distintos. Entretanto, futuros mais aprofundados são necessários para se identificar os mecanismos subjacentes a estas respostas, o que poderia também ser de grande ajuda no desenvolvimento de estratégias de tratamento mais eficientes.

8 REFERÊNCIAS

ABE, K.; FUJIMOTO, T.; AKAISHI, T.; MISAWA, M.. Stimulation of basolateral amygdaloid serotonin 5-HT_{2C} receptors promotes the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. **Neuroscience Letter**, v1, p.65-68, 2009.

ABDELNABI, M.A.; OTTINGER, M.A.. Hypothalamic indolamines during embryonic development and effects of steroid exposure. **General and Comparative Endocrinology**, v.130, p.13-19, 2003.

AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BAGETTA, G.; CORASANITI, M. T.. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. **Pharmacological Research**, v.52, p.119-132, 2005.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-IV-TR – Texto Revisado**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ANISMAN, H.; MERALI, Z.; STEAD, J.D.H.. Experiential and genetic contributions to depressive- and anxiety-like disorders: Clinical and experimental studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.32, p.1185-1206, 2008a.

ANISMAN, H.; MERALI, Z ; HAYLEY, S.. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: Comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v.85, p.1-74, 2008b.

BAULIEU, E.E. Neurosteroids: a new function in the brain. **Biology of the Cell**, v.71, p.3-10, 1991.

BECKER, J.B.; ARNOLD, A.P.; BERKLEY, K.J.; BLAUSTEIN, J.D.; ECKEL, L.A.; HAMPSON, E.; HERMAN, J.P.; MARTS, S.; SADEE, W.; STEINER, M.; TAYLOR, J.; YOUNG, E.. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. **Endocrinology**, v.146, p.1650-1673, 2005.

BEKKU, N.; YOSHIMURA, H.. Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. **Psychopharmacology**, v.183, p.300-307, 2005.

BIMONTE-NELSON, H. A.; FRANCIS, K. R.; UMPHLET, C. D.; GRANHOLM, A-C.. Progesterone reverses the spatial memory enhancements initiated by tonic and cyclic oestrogen therapy in middle-aged ovariectomized female rats. **European Journal of Neuroscience**, v.24, p.229-242, 2006.

BIRZNIECE, V.; BÄCKSTRÖM, T.; JOHANSSON, I.-M.; LINDBLAD, C.; LUNDGREN, P.; LÖFGREN, M.; OLSSON, T.; RAGAGNIN, G.; TAUBE, M.; TURKMEN, S.; WAHLSTRÖM,

G.; WANG, M.-D.; WIHLBÄCK, A.-C.; ZHU, D.. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. **Brain Research Reviews**, v.51, p.212-239, 2006.

BLIER, P.. Crosstalk between the norepinephrine and serotonin systems and its role in the antidepressant response. **Journal of Psychiatry Neuroscience**, v.26 (Supl.), p.S3–S10, 2001.

BODO, C.; RISSMAN, E.F.. New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.27, p.217-232, 2006.

BRANN, D. W.; DHANDAPANI, K.; WAKADE, C.; MAHESH, V. B.; KHAN, M. M.. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**, v.7, n.2, p.381-405, 2007.

BRINTON, R.D.. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, n.4, p. 212-222, 2009.

BRIONES-ARANDA, A.; ROCHA, L.; PICAZO, O.. Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.29, p.275-281, 2005.

BUDDENBERG, T.E. ; KOMOROWSKI, M. ; RUOCCO, L.A. ; DE SOUZA SILVA, M.A. TOPIC, B.. Attenuating effects of testosterone on depressive-like behavior in the forced swim test in healthy male rats. **Brain Research Bulletin**, v.79, p.182-186, 2009.

CARACI, F.; COPANI, A.; NICOLETTI, F.; DRAGO, F.. Depression and Alzheimer's disease: Neurobiological links and common pharmacological targets. **European Journal of Pharmacology**, v.626, p.64-71, 2010.

CARRIÉ, I.; CLÉMENT, M.; DE JAVEL, D.; FRANCES, H.; BOURRE, J.M.. Phospholipid supplementation reverses behavioural and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency in mice. **Journal of Lipid Research**, v.41, p.473-480, 2000.

CENTER FOR BIOENVIRONMENTAL RESEARCH AT TULANE AND XAVIER UNIVERSITIES. New Orleans, EUA. Disponível em: <<http://e.hormone.tulane.edu/learning/estrogens.html>>. Acesso em: 08/03/2008.

CONSONI, F.T.; VITAL, M.A.B.F; ANDREATINI, R.. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v.16, p.451-458, 2006.

CORNIL, C.A.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; BAILLIEN, M.; BALTHAZART, J.. Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. **Behavioural Brain Research**, v.166, p.110-123, 2006

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I.. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, p.238-245, 2002.

DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F.. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Natural Reviews**, v.6, p.463-475, 2005.

DEECHER, D.; ANDREE, T.H.; SLOAN, D.; SCHECHTER, L.E.. From menarche to menopause: Exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. **Psychoneuroendocrinology** v.33, p. 3-17, 2008.

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.

DROSSOPOULOU, G.; ANTONIOU, K.; KITRAKI, E.; PAPATHANASIOU, G.; PAPALEXI, E.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. **Neuroscience**, v.126, p.849-857, 2004.

DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M.. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v.59, p.1116-1127, 2006.

EL-BAKRI, N.K.; ISLAM, A.; ZHU, S.; ELHASSAN, A.; MOHAMMED, A.; WINBLAD, B.; ADEM, A.. Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, p.537-544, 2004.

ESPELAND, M. A.; RAPP, S. R.; SHUMAKER, S. A.; BRUNNER, R.; MANSON, J. E.; SHERWIN, B. B.; HSIA, J.; MARGOLIS, K. L.; HOGAN, P. E.; WALLACE, R.; DAILEY, M.; FREEMAN, R.; HAYS, J.. Conjugated Equine Estrogens and Global Cognitive Function in Postmenopausal Women: Women's Health Initiative Memory Study. **Journal of the American Medical Association**, v.291, n.24, p.2959-2968, 2004.

ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNANDEZ-GUASTI, A.; LOPEZ-RUBALCAVA, C.. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p.830-838, 2003.

ETGEN, A.M.; KARKANIAS, G.B.. Estrogen regulation of noradrenergic signaling in the hypothalamus. **Psychoneuroendocrinology**, v.19, p.603-610, 1994.

FENG, Z., CHENG, Y.; ZHANG, J.T.. Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired ovariectomized adult rats. **Journal of Pineal Research**, v.37, p.198-206, 2004.

FRAZER, A. Pharmacology of antidepressants. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.17, supl.1, p.2S-18S, 1997.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: NEILL, J.D.. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Philadelphia: Elsevier, 2006.

FRICK, K. M.; FERNANDEZ, S. M.; BULINSKI, S. C.. Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. **Neuroscience**, v.115, n.2, p.547-558, 2002.

FRYE, C.A.; DUFFY, C.K.; WALF, A.A.. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p.208-216, 2007.

FRYE, C. A.; WALF, A. A.. Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks. **Neuroscience Letters**, v. 437, n.2, p.116-120, 2008.

GARNER, M.; MÖHLER, H.; STEIN, D.J.; MUEGGLER, T.; BALDWIN, D.S.. Research in anxiety disorders: From the bench to the bedside. **European Neuropsychopharmacology**, v.19, p.381-390, 2009.

GREEN, P.S.; SIMPKINS, J.W.. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p.347-358, 2000.

GRESACK, J.E.; KERR, K.M.; FRICK, K.M.. Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p.393-408, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.. **Textbook of Medical Physiology**. New York: Elsevier Health Sciences, 2005. p.929-941.

HARBURGER, L.L.; BENNETT, J.C.; FRICK, K.M.. Effects of estrogen and progesterone on spatial memory consolidation in aged females. **Neurobiology of Aging**, v.28, p.602-610, 2007.

HEDLUND P, SUTCLIFFE G. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. **Trends in Pharmacological Science**, v.9, p.481-486, 2004.

HERRERA-GUZMÁN, I.; GUDAYOL-FERRÉ, E.; HERRERA-GUZMÁN, D.; GUÀRDIA-OLMOS, J.; HINOJOSA-CALVO, E.; HERRERA-ABARCA, J.E.. Effects of selective serotonin reuptake and dual serotonergic–noradrenergic reuptake treatments on memory and mental processing speed in patients with major depressive disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v.43, p. 855–863, 2009.

HIROI, R.; NEUMAIER, J.F.. Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field. **Neuroscience**, v.158, pp.456-464, 2006.
HOJO, Y., MURAKAMI, G., MUKAI, H., HIGO, S., HATANAKA, Y., OGIUE-IKEDA, M., ISHII, H., KIMOTO, T., KAWATO, S.. Estrogen Synthesis in the Brain – Role in Synaptic Plasticity and Memory. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.290, p.31-43, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil – 2009**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. p.84-85. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indicsaude.pdf>. Acesso em: 09/12/2009.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M.. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v.29, n.9, p.496-505, 2006.

JAEGER, J.; BERNS, S.; UZELAC, S.; DAVIS-CONWAY, S.. Neurocognitive deficits and disability in major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v.145, p.39-48, 2006.

JANS, L.A.W.; LIEBEN, C.K.J.; BLOKLAND, A.. Influence of sex and estrous cycle on the effects of acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture in adult wistar rats. **Neuroscience**, v.147, p.304-317, 2007.

KALUEFF, A.V.; WHEATON, M.; MURPHY, D.L.. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v.179, p.1-18, 2007.

LENT, R.. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2001, p.587-617.

LEUSSIS, M.P.; BOLÍVAR, V.J.. Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.30, p.1045-1064, 2006.

LLEDO, P-M.. Dissecting the Pathophysiology of Depression with a Swiss Army Knife. **Neuron**, v.62, p. 453-455, 2009.

LORD, C.; BUSS, C.; LUPIEN, S.J; PRUESSNER, J.C. Hippocampal volumes are larger in postmenopausal women using estrogen therapy compared to past users, never users and men: A possible window of opportunity effect. **Neurobiology of Aging**, v.29, p.95-101, 2008.

LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biological Psychiatry**, v.44, p.151-162, 1997.

LUINE, V. N.. Sex Steroids and Cognitive Function. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, p. 866-872, 2008.

MACQUEEN, G.M.; CAMPBELL, S.; MCEWEN, B.S.; MACDONALD, K.; AMANO, S.; JOFFE, R.T.; NAHMIAS, C.; YOUNG, L.T... Course of Illness, Hippocampal Function, and Hippocampal Volume in Major Depression. **Focus**, v.3, p.146-155, 2005.

MARKHAM, J.A.; PYCH, J.C.; JURASKA, J.M.. Ovarian Hormone Replacement to Aged Ovariectomized Female Rats Benefits Acquisition of the Morris Water Maze. **Hormones and Behavior**, v.42, p.284-293, 2002.

MEDINA, J. H.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural Brain Research**, v.192, p.61-69, 2008.

MELCANGI, R. C.; PANZICA, G. C.. Neuroactive steroids: Old players in a new game. **Neuroscience**, v.138, p.733-739, 2006.

MICEVYCH, P., SINCHAK, K.. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.290, p. 44-50, 2008.

MICEVYCH, P.; SOMA, K. K.; SINCHAK, K.. Neuroprogesterone: Key to estrogen positive feedback? **Brain Research Reviews**, v.57, p.470-480, 2008.

MOHANKUMAR, P.S.; THYAGARAJAN, S.; QUADRI, S.K.; Correlations of catecholamine release in the medial preoptic area with proestrous surges of luteinizing hormone and prolactin: effects of aging. **Endocrinology**, v.135, p.119-126, 1994.

MOLTENI, R.; BARNARD, R. J.; YING, Z.; ROBERTS, C. K.; GOMEZ-PINILLA, F.. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity and learning. **Neuroscience**, v.112, n.4, p.803-814, 2002.

MORISSETTE, M.; LE SAUX, M.; D'ASTOUS, M.; JOURDAIN, S.; AL SWEIDI, S.; MORIN, N.; ESTRADA-CAMARENA, E.; MENDEZ, P.; GARCIA-SEGURA, L.M.; DI PAOLO, T.. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.108, p.327-338, 2008.

NAHAS, T. R.. O teste do campo aberto. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

NASH, J.; NUTT, D.. Antidepressants. **Psychiatry**, v.6, p.289-294, 2007.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M.. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, p.13–25, 2002.

OKADA, M.; HAYASHI, N.; KOMETANI, M.; NAKAO, K.; INUKAI, T.. Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17 β -estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.73, p.93-96, 1997.

ÖSTERLUND, M.K.. Underlying mechanisms mediating the antidepressant effects of estrogens. **Biochimica et Biophysica Acta** (2009), doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.001.

PADILLA, E.; BARRETT, D.; SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F.. Strain, sex, and open-field behavior: Factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. **Behavioural Brain Research**, v.201, p.257-264, 2009.

PAE, C.-U.; MANDELLI, L.; KIM, T.-S.; HAN, C.; MASAND, P.S.; MARKS, D.M. ; PATKAR, A .A. ; STEFFENS, D.C. ; DE RONCHI, D. ; SERRETTI, A.. Effectiveness of antidepressant treatments in pre-menopausal versus post-menopausal women: A pilot study on differential effects of sex hormones on antidepressant effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.63, p.228-235, 2009.

PAGE, M.E.; DETKE, M.J.; DALVI, A.; KIRBY, L.G.; LUCKI, I.. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, v.147, p.162-167, 1999.

PANDARANANDAKA, J. ; POONYACHOTI, S. ; KALANDAKANOND-THONGSONG, S.. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. **Behavioural Brain Research**, v.198, p.142-148, 2009.

PARRY, B.L., NEWTON, R.P.. Chronobiological basis of female-specific mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v.25, suppl.1, p.S102-S108, 2001.

PAWLUSKI, J.L.; BRUMMELTE, S.; BARHA, C.K.; CROZIER, T.M.; GALEA, L.A.M.. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.30, p.343-357, 2009.

PEREZ-GARCIA, G.; MENESES, A.. Memory time-course: mRNA 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. **Behavioural Brain Research**, v.202, p.102-113, 2009.

PINTO-MEZA, A.; USALL, J.; SERRANO-BLANCO, A.; SUÁREZ, D.; HARO, J.P.. Gender differences in response to antidepressant treatment prescribed in primary care. Does menopause make a difference? **Journal of Affective Disorders**, v.93, p.53-60, 2006.

PORSOLT, R.D. ; ANTON, G. ; BLAVET, N ; JALFRE, M.. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, Feb 15, 47(4), p.379-391, 1978.

PROKAI, L.; SIMPKINS, J. W.. Structure–nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v.114, p.1-12, 2007.

QUINLAN, M. G.; HUSSAIN, D.; BRAKE, W. G.. Use of cognitive strategies in rats: The role of estradiol and its interaction with dopamine. **Hormones and Behavior**, v.53, p.185-191, 2008.

ROCHA, B.A.; FLEISCHER, R.; SCHAEFFER, J.M.; ROHRER, S.P.; HICKEY, G.J.. 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. **Psychopharmacology**, v.179, n.3, p.637-643, 2005.

RUNE, G. M.; FROTSCHER, M.. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity. **Neuroscience**, v.136, p.833-842, 2005.

RUTZ, S.; MAJCHRZAK, M.; SIEDSCHLAG, V.; BARBELIVIEN, A.; HARATI, H.; ROTHMAIER, A.K.; FEUERSTEIN, T.J.; JACKISCH, R.; CASSEL, J-C.. The modulation of striatal dopamine release correlates with water-maze performance in aged rats. **Neurobiology of Aging**, v.30, p.957-972, 2009.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v.10, n.9, p.1110-1115, 2007.

SANTOS, A.M.G dos. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

SARKISYAN, G.; HEDLUND, P.B.. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. **Behavioural Brain Research**, v.202, p.26-31, 2009.

SCHUMACHER, M.; WEILL-ENGERER, S.; LIERE, P.; ROBERT, F.; FRANKLIN, R. J. M.; GARCIA-SEGURA, L. M.; LAMBERT, J. J.; MAYO, W.; MELCANGI, R. C.; PARDUCZ, A.; SUTER, U.; CARELLI, C.; BAULIEU, E.E.; AKWA, Y.. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.71, p.3-29, 2003.

SHERWIN, B. B.. Estrogen and memory in women: how can we reconcile the findings? **Hormones and Behavior**, v.47, p.371-375, 2005.

_____. Estrogen and cognitive aging in women. **Neuroscience**, v.138, p.1021-1026, 2006.

_____. The clinical relevance of the relationship between estrogen and cognition in women. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.106, p.151-156, 2007.

SHERWIN, B.B.; HENRY, J.F.. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: A critical review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.29, p.88-113, 2008.

SHUMAKER, S. A.; LEGAULT, C.; KULLER, L.; RAPP, S.R. ; THAL, L.; LANE, D. S.; FILLIT, H.; STEFANICK, M. L.; HENDRIX, S. L.; LEWIS, C. E.; MASAKI, K.; COKER, L. H.. Conjugated Equine Estrogens and Incidence of Probable Dementia and Mild Cognitive Impairment in Postmenopausal Women: Women's Health Initiative Memory Study. **Journal of the American Medical Association**, v.291, n.24, p.2947-2958, 2004.

SIERKSMA, A.S.R.; VAN DEN HOVE, D.L.A.; STEINBUSCH, H.W.M.; PRICKAERTS, J.. Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: Is there a link? **European Journal of Pharmacology**, v.626, p.72-82, 2010.

SONG, L.; CHE, W.; M.-W., WANG; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K.. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.83, p.186-193, 2006.

SPENCER, J. L.; WATERS, E. M.; ROMEO, R. D.; WOOD, G. E.; MILNER, T. A.; MCEWEN, B. S.. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.29, p.219-237, 2008.

STEMMELIN, J.; LAZARUS, C.; CASSEL, S.; KELCHE, C.; CASSEL, J.-C.. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. **Neuroscience**, v.96, p.275-289, 2000.

SUTCLIFFE, J.S.; MARSHALL, K.M.; NEILL, J.C. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. **Behavioural Brain Research**, v.177, p.117-125, 2007.

TALBOOM, J. S.; WILLIAMS, B. J.; BAXLEY, E. R.; WEST, S. G.; BIMONTE-NELSON, H. A.. Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.90, n.1, p.155-163, 2008.

XU, X.; ZHANG, Z.. Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. **Life Sciences**, v.79, p.1553-1560, 2006.

ZHAO, L.; BRINTON, R. D.. Estrogen receptor α and β differentially regulate intracellular Ca^{2+} dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. **Brain Research**, v.1172, p. 48-59, 2007.

ZHONG, P.; LIU, W.; GU, Z.; YAN, Z.. Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. **Journal of Physiology**, v.18, p.4465-79, 2008.

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

WALF, A.A.; PARIS, J.J.; FRYE, C.A.. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. **Psychoneuroendocrinology**, v.34, p.909-916, 2009.

WOLF, O.T.; HEINRICH, A.B.; HANSTEIN, B.; KIRSCHBAUM, C.. Estradiol or estradiol/progesterone treatment in older women: no strong effects on cognition. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p.1029-1033, 2005.