

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

**EFEITO DO 17 β ESTRADIOL NA AMIGDALA CENTRAL NAS
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS
AO ESTRESSE EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Aluno: Msc. Luís Henrique Santos Fortes
Orientador: Prof.Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes
Coorientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Junior

Ouro Preto, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

**EFEITO DO 17 β ESTRADIOL NA AMIGDALA CENTRAL NAS
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS
AO ESTRESSE EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Luís Henrique Santos Fortes

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Coorientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Junior

Ouro Preto, 2017

F775e Fortes, Luís Henrique Santos.
Efeito do estradiol na amígdala central nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse em ratas ovariectomizadas [manuscrito] / Luís Henrique Santos Fortes. - 2017.
123f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.
Coorientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr..

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Ovariectomia. 2. Menopausa. 3. Stress (Fisiologia). 4. Estradiol. I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. II. Chianca Jr., Deoclécio Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 618.11-089.87

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Efeito do 17 β estradiol na amígdala central nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse em ratas ovariectomizadas "

Aos vinte e um dias do mês de agosto de 2017, às 09 horas, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno Luis Henrique dos Santos Fortes. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

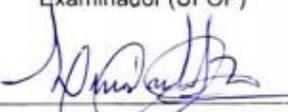
Membros da Banca Examinadora:



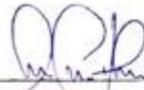
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Examinador (UFOP)



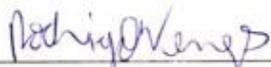
Prof. Dr. Lisandra Brandino de Oliveira
Examinadora (UFOP)



Prof. Dr. Luis Carlos Reis
Examinador (UFRRJ)



Prof. Dr. Andréa Siqueira Haibara
Examinadora (UFMG)



Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (UFOP)

DATA DA DEFESA: 21/08/2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da CAPES, CNPQ e UFOP.

DEDICATÓRIA

Não poderia deixar de dedicar esse trabalho às pessoas que acreditaram que eu poderia conduzi-lo até o final. À família e principalmente, minha querida mãe Isabel Santos Fortes, por estar comigo no momento mais difícil. À Alessandra de Abreu, por me incentivar a continuar quando pensei em desistir. Por fim, à Suziane Brito Fonseca, que surgiu em minha vida ao final dessa empreitada, mas me deu novas forças para conclusão de tudo.

AGRADECIMENTOS

Tenho o dom da vida me concedido no momento em que nasci, com o livre arbítrio de me tornar aquilo que eu desejo ser, em todos os sentidos. Já nascemos com todas as ferramentas necessárias para nos tornarmos o que desejamos. Agradeço a Deus por esse dom e através dele ser capaz de decidir o que é melhor para mim.

Agradeço à minha mãe **Isabel Santos Fortes** por sempre acreditar em mim, por me ouvir ao telefone em todos os momentos, por largar tudo para estar ao meu lado comigo no momento mais difícil, pois com a distância é difícil se fazer presente.

Agradeço ao meu pai **Eustáquio Omar Fortes**, mesmo distante, com poucas palavras, sempre foi um exemplo ao qual eu sempre segui.

Ao meu irmão **Marcelo Santos Fortes** e minha “Irmãããã” **Isabela Santos Fortes**, que sempre foi minha melhor amiga e sempre esteve presente para me ajudar em qualquer momento que fosse.

À toda minha família que de alguma maneira sempre acreditou em mim e se dispôs a me ajudar em pequenas coisas.

Um agradecimento muito especial à **Alessandra Rezende de Abreu**, pois, se não fosse ela eu não estaria aqui, concluindo este trabalho. Obrigado por me escutar, por me ensinar, por ser a pessoa que soube entender todos meus problemas e ainda sim ficou ao meu lado. Obrigado por me convencer a ficar e decidir levar ao final aquilo que um dia eu comecei a fazer.

À **Suziane Brito Fonseca**, por ser meu porto seguro, por dedicar dias longe de sua família para poder estar aqui, perto de mim para poder ajudar. Obrigado pelo grande apoio e compreensão nos momentos em que estamos distantes, por ser parte de minha família e por me permitir ser parte da dela. Obrigado por ter sido minha assistente, mesmo não sabendo nada, vigiava os animais enquanto eu fazia 3,4 até 5 animais em um único dia. Obrigado por todo esse carinho, dedicação e amor. És mais que especial em minha vida. Amo você!

Agradeço muito ao Professor **Deoclécio Alves Chianca Jr.** pôr a 10 anos a abrir as portas de seu laboratório, para que eu pudesse aprender. Obrigado por sempre me incentivar a

seguir em frente e buscar o melhor e, quando eu pensei em desistir, abandonando o programa de pós-graduação; não deixou e permitiu que eu me afastasse até estar melhor.

Ao meu orientador **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, por sempre confiar em mim e me aceitar como seu aluno de pós-graduação e acreditar que eu poderia chegar ao fim. Junto com o Prof. Deo, não permitiu que eu me desligasse do programa e também consentiu que eu me afastasse por um tempo. Muito obrigado por me dar o tempo necessário para que eu chegasse aqui.

À **Fernanda Silva** “Baju”, por todos esses anos que amizade, incentivo que temos vivido enquanto fazemos parte da família LFC.

À **Aline Rezende**, por sempre se disponibilizar a me ajudar a concluir este estudo, seja nos experimentos, nas análises estatísticas ou correções.

Ao meu primo **Victor Luz** pela força todas as vezes que o notebook resolvia dar problema, sempre em horas cruciais.

Ao Sr. **Miltinho e Marli** colegas de trabalho, por estarem ali no LFC sempre disponíveis para uma boa conversa e cuidarem com carinho dos animais de pesquisa.

Aos amigos do LFC, **Glenda Viggiano e Sylvana Noronha**, por estarem sempre dispostas a me ensinar e ajudar quando necessário cada uma sabe o quanto me ajudou nessa batalha, e por “Buzioxx”, inesquecível. À **Thayane Reis, Mariana, Máira Talma, Thayane Cotta** e outros tantos alunos que passaram e já terminaram seus trabalhos e sempre ajudam. Ao agregado **Henrique Fontes**, sempre presente em nossas confraternizações, agradeço sempre as boas conversas.

Aos professores colegas da pós-graduação e ICEB, pela convivência, aprendizado e conhecimento adquirido nesses anos.

Ao centro de ciência animal por garantir o fornecimento de animais para que essa pesquisa fosse realizada, em especial à **Lorena Coelho**, colega de trabalho e mestrado, se não fosse por ela, sempre fazendo uma forcinha para conseguir animais, eu não teria chegado ao final.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse levar esse trabalho até o fim, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Esvazie sua mente de modelos, formas, seja amorfo como a água. Você coloca a água em um copo, ela se torna o copo. Você coloca a água em uma garrafa, ela se torna a garrafa. Você a coloca em uma chaleira, ela se torna a chaleira. A água pode fluir, pode destruir. Seja água meu amigo.”

Bruce Lee

Sumário

1- <i>INTRODUÇÃO</i>	1
1.1- MENOPAUSA/PÓS-MENOPAUSA.....	1
1.2- ESTROGÊNIOS E RECEPTORES.....	2
1.3- DEFICIÊNCIA DE ESTRADIOL E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS	10
1.4- OVARIECTOMIA E ANSIEDADE	13
1.5- ESTRESSE	14
1.6- AMÍGDALA/ NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA (CeA)	18
2- <i>OBJETIVOS</i>	24
2.1- Objetivo Geral.....	24
2.2- Objetivos específicos	24
3- <i>MATERIAIS E METODOS</i>	25
3.1- Modelo animal	25
3.2- Drogas /soluções utilizadas.....	26
3.3- PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	28
3.3.1- Ovariectomia (OVX)	28
3.3.2- Estereotaxia	28
3.3.3- Cateterização femoral	29
3.4- Protocolo de aquisição dos sinais fisiológicos.....	30
3.6- Procedimento de estresse	32
3.7- Testes comportamentais.....	33
3.7.1- Labirinto em T elevado (LTE).....	33
3.7.2- Campo Aberto (CA).....	34
3.8.3- Histologia	36
3.9- Análises estatísticas	38
4- <i>RESULTADOS</i>	40
4.1- Efeito da OVX sobre o ganho de peso dos animais.....	40
4.2- Efeito da OVX sobre o peso uterino dos animais	41

4.3-	Efeito do tratamento bilateral com 100 nl de E ₂ (0,5 pmol) CeA no grupo Sham com 2 semanas de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e FC	42
4.4-	Efeito do tratamento bilateral com E ₂ (0,5 pmol) na CeA de ratas sob privação hormonal de 2 semanas (OVX) sobre respostas autonômicas da PAM e a FC	44
4.5-	Efeito do tratamento bilateral com agonista de receptor ER-β (DPN) na CeA de ratas sham com 2 semanas de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e FC.	48
4.6-	Efeito do tratamento bilateral com agonista de receptor ER-β (DPN) na CeA de ratas OVX sob privação hormonal de 2 semanas sobre respostas autonômicas da PAM e FC.	50
4.7-	Efeito do tratamento bilateral de E ₂ (0,5 pmol) na CeA de ratas sham com 2 meses de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e a FC.	53
4.8-	Efeito do tratamento bilateral com E ₂ (0,5 pmol) na CeA de ratas OVX com 2 meses de privação hormonal sobre respostas autonômicas da PA e FC.....	55
4.9-	Efeito do tratamento bilateral com E ₂ (0,5 pmol) na CeA em ratas Sham com 8 meses de cirurgia sobre respostas autonômicas da PAM e FC.....	58
4.10-	Efeito do tratamento bilateral com E ₂ (0,5 pmol) na CeA de ratas OVX com 8 meses de privação hormonal sobre a PAM e a FC	60
4.11-	Privação hormonal e comportamento.....	64
5-	<i>DISCUSSÃO</i>	70
6-	<i>CONCLUSÃO</i>	86
7-	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Síntese ovariana de estradiol. A produção do estradiol tem início com a síntese da pregnenolona a partir de moléculas circulantes de colesterol, catalisada pela enzima P450_{scc}. A pregnenolona é então convertida em progesterona pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β HDS) tão nas células tecais quanto da granulosa. A progesterona produzida é convertida em andrógenos pela citocromo P450 17 α -hidroxilase e 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) nas células tecais durante a fase folicular. A conversão do E₂ é catalisada pela aromatase (P450ARO) na granulosa, adaptado de (Cui e cols., 2013)..... 4
- Figura 2:** Síntese de E₂ em células do SNC. Neurônios e astrócitos expressam todas as enzimas necessárias para a síntese local de estrogênios. Porém, células da micróglia e oligodendrócitos não são capazes de produzi-lo, adaptado de (Cui e cols., 2013). 5
- Figura 3:** Via Genômica e Não-Genômica de sinalização. Estrógenos endógenos incluindo 17- β estradiol, são ativadores não seletivos de três conhecidos receptores: ER- α , ER- β e GPER. No mecanismo genômico, primeiramente o E₂ ativa RE nucleares, incluindo receptores acoplados à proteína G (GPER) (diméricos), para atuar em genes alvo. Alternativamente, RE ativados modulam a função de fatores de transcrição através de interações proteína-proteína. Subpopulações de RE ativados pelo E₂ interagem com receptores acoplados às GPER e moléculas de sinalização como tirosina cinase (c-Src) a qual medeia rápidas sinalizações via P13K-Akt e MAPK. E₂ ou agonistas seletivos como G1, reguladores seletivos, como fulvestrant ou moduladores seletivos, como tamoxifeno, também ativam GPER, o qual é localizado principalmente na membrana intracelular. A ativação de GPER estimula a liberação de c-AMP, mobilização de cálcio e c-Src o qual ativam MMPs. Os MMPs clivam o pro-HB-EGF liberando o HB-EGF que transativa o EGFR o qual, por sua vez, ativa as vias MAPK e P13K-Akt que induz efeitos adicionais rápidos (não-genômicos) regulando a transcrição. A regulação transcricional mediada por estradiol pode envolver fosforilação de RE ou através de fatores transcricionais que podem interagir diretamente com os RE ou se ligarem independentemente em RE dentro dos genes promotores alvo (E₂, 17- β estradiol; EGFR, fator de crescimento epidérmico; ER, receptor de estrogênio; GPER, proteína G acoplada a um receptor de estrogênio; MMP, metaloproteinásas de matriz; pro-HG-EGF, fator de crescimento epidérmico de Ligação à Heparina; TF, fator de transcrição. (Prossnitz & Barton, 2011b) 7
- Figura 4:** Co-localização de receptores de estradiol ER- α e ER- β no SNC a 3,14 mm do bregma (Hrabovszky e cols., 1998; Shughrue e cols., 1997). Círculo azul demonstra a região da CeA. 10
- Figura 5:** Esquema das vias neurais subjacentes ao medo condicionado. Áreas responsivas a estímulos auditivos ou somatosensoriais são ativadas no tálamo, posteriormente em regiões específicas no córtex cerebral. Em seguida projeções diretas do tálamo ganham a BLA que então se conecta com a CeA via projeções diretas e através de outros núcleos amigdalóides. Então, a CeA controla as respostas fisiológicas subsequentes atribuídas ao medo condicionado como “freezing”, respostas autonômicas e hormonais. 18

Figura 6: Figura esquemática demonstrando a localização do complexo amidaloide em uma cérebro Humano (A) e em um cérebro de rato (B), Siglas: BNST, núcleo leito da estria terminal; PAG, substância cinzenta periaquedutal; Hipp, hipotálamo, VTA, área tegmentar ventral; AOB, bulbo olfatório acessório; MOB, bulbo olfatório; NuAc, núcleo acumbens (McDonald AJ, 1992; Sokolowski & Corbin, 2012).....	20
Figura 7 : Divisões nucleares e subdivisões da amígdala de ratos. Os núcleos da amígdala são divididos em três grupos: o centromedial (laranja), profunda ou basolateral (verde), e cortical (marrom). Em cinza escuro os núcleos intercalados (IN) são indicados. CEC, núcleo central, capsular subdivisão; CEL, núcleo central, subdivisão lateral; CEM, núcleo central, subdivisão medial; COa , núcleo cortical , subdivisão anterior; COp, núcleo cortical, subdivisão posterior; BOT , núcleo do trato olfativo ; Bi , núcleo basal , subdivisão intermediário ; Bpc , núcleo basal , subdivisão parvocelular ; CMMO , núcleo basomedial, subdivisão magnocelular ; BMPC , núcleo basomedial , subdivisão parvocelular, Ld , núcleo lateral, subdivisão dorsal; LVM, núcleo lateral, subdivisão ventromedial; Lvl , núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md , núcleo medial, subdivisão dorsal; Mv, núcleo medial , subdivisão ventral ; In, núcleos intercalados ; Pir , córtex piriforme. Para simplificar o diagrama, mais rostralmente localizou a subdivisão magnocelular do núcleo basal e subdivisão rostral do núcleo medial, bem como caudalmente localizou a área amígdala-hipocampal, não demonstrado (Knapska e cols., 2007).....	21
Figura 8: Diagrama esquemático das conexões da BLA para várias estruturas alvo, e possíveis funções dessas conexões.	23
Figura 9: Imagem esquemática de um procedimento de implante de cateteres femorais (Fortes, 2010)	30
Figura 10: Figura ilustrativa de uma janela de aquisição de sinal do Labchart 7.0 . Em vermelho pressão PAM em mmHg e em verde FC em batimentos por minuto (BPM). 31	
Figura 11: Imagem representativa da metodologia adotada para coleta de secreção vaginal utilizada pra confecção dos esfregaços. (a,b,c) com auxílio de uma pipeta de 20 µl preenchida com salina (NaCL 0,9%), a qual foi injetada dentro do canal vaginal e em seguida aspirado. (d) marcação na cauda dos animais para identificação de cada um durante todo o experimento. (e) lâminas confeccionadas da secreção aspirada e analisadas em microscópio ótico na objetiva de 40x (Marcondes e cols., 2002)	32
Figura 12: Modelo esquemático: estresse por contensão e jato de ar.	33
Figura 13: LTE (Insight [®]) utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga	34
Figura 14: Exemplo das janelas de configurações do plugin Animal Tracker para; (A), tempo, (B), distância e (C), imobilidade.	35
Figura 15: Figura ilustrativa da janela de análise do programa IMAGE J (A) mapa de deslocamento do animal através do campo aberto e em (B) parâmetros analisados na janela de análise do programa.	36
Figura 16: Fotomicrografia de um corte coronal de 40 µm do encéfalo de rato, representativa dos locais típicos de microinjeção na CeA, bregma de -1,56mm.	37
Figura 17: Esquema dos cortes coronais do encéfalo de ratos adaptado do atlas de (Paxinos & Watson, 2007) ilustrando local de posicionamento da amígdala central (CeA)	

em um conte coronal do cérebro de rato a -2,64mm antero posterior do bregma e a 4,1mm latero lateral. Distâncias de -1,56mm a -3mm do bregma, foram analisadas cuidadosamente. Os números na figura indicam a distância do bregma em milímetros. 37

Figura 18: Fluxograma dos experimentos realizados nesse trabalho. 39

Figura 19: Efeito da OVX sobre o ganho de peso (g) dos animais. Valores numéricos sobre as barras mostram média ± EPM. * mostra diferença significativa entre os grupos, teste *t-Student* para $p < 0,05$, e # grupo OVX 8 meses e os demais grupos, ANOVA *one way* seguido de pós teste de *Bonferroni*. 40

Figura 20: Efeito da OVX sobre o índice uterino em animais 2 semanas, 2 meses e 8 meses. Valores sobre as barras mostram média ± EPM. * mostra diferença estatística pelo teste *t-Student* para $p < 0,05$ 41

Figura 21: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA de ratas com 2 semanas de cirurgia sobre a PAM e FC durante os três dias de experimento. (A) mostra registros da PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde registro 24h pós E₂; (B) mostra registro da FC durante os três dias de experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores são mostrados em média ± EPM. * mostra diferença estatística pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$... 43

Figura 22: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC e quarto canal, em rosa, a análise dos ciclos de pulsos pressóricos e recontagem da FC. 44

Figura 23: Efeito da microinjeção bilateral com 100 nl de E₂ (0,5 pmol) na CeA de ratas OVX com privação hormonal de 2 semanas sobre a PAM e FC durante os três dias de experimento. (A) mostra registros da PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra registro da FC durante os três dias experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores mostram média ± EPM. * mostra diferença estatística entre o dia onde se administrou salina e 24h pós E₂; # mostra diferença estatística entre o dia que se administrou E₂ e o dia que se administrou salina, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$ 45

Figura 24: Comparação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 semanas e grupo OVX 2 semanas após tratamento bilateral com E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) e decorridos 24h. Os dados são expressos em média ± EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre OVX 24h pós E₂ e os demais grupos; em (B) * mostra diferença estatística entre OVX 24h após E₂ e os demais grupos, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*; área sob a curva ANOVA *one way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p \leq 0,05$ 46

Figura 25: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab

Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC..... 47

Figura 26: Efeito da microinjeção bilateral de agonista de receptor β (DPN) (0,5 pmol/100 nl) na CeA de ratas sham. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de Veículo, linha vermelha; microinjeção de DPN e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante o experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores expressos em média \pm EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre o dia de tratamento com DPN e o dia de tratamento de veículo; e # mostra diferença estatística 24h após E₂ e o dia de tratamento com veículo; e em B * mostra diferença entre 24h após E₂ e o dia de tratamento com veículo, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$ 49

Figura 27: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de DPN (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC..... 50

Figura 28: Efeito da microinjeção bilateral com (0,5 pmol/ 100 nl) agonista de receptor ER- β (DPN) na CeA de ratas OVX. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de DPN e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante o experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores numéricos seguindo mesma coloração das linhas gráficas mostram média \pm EPM. Em A, * mostra diferença estatística entre o dia de administração de DPN e o dia de administração de veículo, e # mostra diferença estatística após 24h e o primeiro dia e em B, * mostra diferença entre 24h após E₂ e os demais dias, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$ 51

Figura 29: Comparação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 semanas e grupo OVX 2 semanas após microinjeção bilateral de DPN. Os dados são expressos em média \pm EPM. Para este grupo de estudo não foram observadas diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p \leq 0,05$.. 52

Figura 30: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de DPN (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC..... 53

Figura 31: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sham 2 meses de cirurgia sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta, microinjeção de salina; linha vermelha, microinjeção de E₂ e linha verde, registro 24h pós E₂ e (B), mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores

mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E2 e o dia de tratamento com salina e E ₂ ; pelo teste ANOVA <i>two way</i> seguido de pós teste de <i>Tukey</i> , para $p < 0,05$	54
Figura 32: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E ₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E ₂ . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.....	55
Figura 33: Efeito da microinjeção bilateral de E ₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OVX 2 meses sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PA durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E ₂ e linha verde; registro 24h pós E ₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E2 e os onde se administrou salina. Teste ANOVA <i>two way</i> seguido de pós teste de <i>Tukey</i> , para $p < 0,05$	56
Figura 34: Correlação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 meses e grupo OVX 2 meses após microinjeção bilateral de E ₂ (0,5 pmol/ 100 nl) e decorridos 24h. Os dados são expressos em média \pm EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre sham 2 meses 14h após E ₂ e sham 2 meses; OVX 2 meses: E ₂ e em (B), * mostra diferença estatística entre sham 2 meses: 24h após E ₂ e os demais grupos. ANOVA <i>two way</i> seguido de pós teste de <i>Tukey</i> , para $p \leq 0,05$	57
Figura 35: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E ₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E ₂ . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.....	58
Figura 36: Efeito da microinjeção bilateral de E ₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sham 8 meses sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PA durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E ₂ e linha verde; registro 24h pós E ₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média \pm EPM. Em (A) * mostra diferença estatística entre o dia de tratamento com E ₂ e dia de tratamento salina, # diferença entre 24h após E ₂ e salina; em (B) * mostra diferença estatística ao longo do tempo entre o dia de tratamento com E ₂ e dia de tratamento salina, # diferença ao longo do tempo, entre 24h após E ₂ e salina; Teste ANOVA <i>two way</i> seguido de pós teste de <i>Tukey</i> , para $p < 0,05$	59
Figura 37: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E ₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E ₂ . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.....	60

Figura 38: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sob OVX de 8 meses (OVX) sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média ± EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E₂ e o dia de tratamento com salina, # mostra diferença entre o dia de tratamento com E₂ e o dia de administração de salina. Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para p < 0,05. 61

Figura 39: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), A, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e B, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC..... 62

Figura 40: Comparação entre os deltas de variações de PAM (A e B) e FC (C e D) após 24h da administração de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OXX de diferentes tempos de OVX. Em (A), * mostra diferença significativa entre OVX 8 meses e os demais grupos, em (B) * mostra diferença entre OVX 8 meses e 2 semanas, e # diferença entre OVX 2 meses e OVX 2 semanas; Em (C), * mostra diferença de OVX 8 meses e os demais grupos e em (D), * mostra diferença entre OVX 2 semanas e OVC 8meses, e # mostra diferença entre OVX 2 meses e OVX 8 meses. Resultados expressos em média ± EPM. Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey* para e Anova *one way* seguida de pós teste de *Tukey* para análise da área sob a curva p < 0,05..... 63

Figura 41: Teste de esquiava inibitória no LTE. Média (± EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas sham (n= 10) e submetidas à OVX (n= 14). * Diferença estatística após teste ANOVA *one way* entre animais de mesmo grupo (OVX) e # mostra diferença significativa entre os animais OVX e sham no teste esquiava 2 pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Sidak's* para p < 0,05. 64

Figura 42: Teste de pânico no LTE. Média (± EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas sham (n= 9) e submetidas à OVX (n= 13). ANOVA *one way*, com pós-teste de *Tukey*, e ANOVA *two way*, com pós-teste de *Sidak's* (p < 0,05)..... 65

Figura 43: Teste de memória de esquiava inibitória (A) e fuga (B) no LTE após 24 horas. Valores numéricos acima das barras indicam média (± EPM) das latências (em segundos) de saída dos braços fechado (A) e aberto (B) de ratas sham (n= 11) e OVX (n= 15), após microinjeção bilateral de 100 nl de salina na amígdala central. * mostra diferença significativa no tempo de latência de saída do braço fechado entre os grupos sham e OVX. Teste *t Student* não pareado (p < 0,05). 66

Figura 44: Teste de esquiava inibitória no LTE. Valores numéricos acima das barras mostram média (± EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) sham (n= 9) e OVX (n= 14) após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl). ♦ Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo (OVX), por

ANOVA one way, com pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). * Diferença estatística entre os grupos (sham x OVX) na mesma tentativa, *ANOVA two way*, com pós-teste de *Tukey*; # mostra diferença significativa entre tentativas no mesmo grupo (sham), *ANOVA one way* com pós teste de *Bonferroni*, ($p < 0,05$). 67

Figura 45: Teste de fuga no LTE após a microinjeção de E_2 (0,5 pmol/100 nL) na CeA de ratas sham e OVX. Valores numéricos sobre as barras mostram média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de sham (n= 8) e OVX (n= 14). *ANOVA two way*, com pós-teste de *Tukey* para $p < 0,05$ 68

Figura 46: Teste de memória de esquiiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE após 24 horas. Valores numéricos acima das barras indicam Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída dos braços fechado (A) e aberto (B) de ratas sham (n= 11) e OVX (n= 15), após microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/100 nl) na CeA. * mostra diferença significativa na no tempo de latência de saída do braço fechado entre os grupos sham e ovx. Teste *t Student* não pareado ($p < 0,05$). 68

Figura 47: Teste de esquiiva inibitória no LTE. Valores numéricos acima das barras mostram média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) sham (n= 14) e OVX (n= 14) após microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/ 100 nl) . ♦ Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo (OVX E_2), por *ANOVA one way*, com pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). * Diferença estatística entre os grupos (OVX salina x OVX E_2) na mesma tentativa, *ANOVA two way*, com pós-teste de *Tukey*; # mostra diferença significativa entre tentativas no mesmo grupo (OVX salina), *ANOVA one way* com pós teste de *Bonferroni*, ($p < 0,05$). 69

Figura 48: Teste de atividade locomotora no CA a partir dos centímetros (cm) percorridos e velocidade (cm/ segundo) em cada grupo. Valores numéricos acima das barras mostram média (\pm EPM). * mostra diferença significativa entre os grupos sham salina e OVX salina. # mostra diferença significativa entre o grupo OVX salina e OVX E_2 . *ANOVA one way* com pós teste de *Tukey*. 70

Figura 49: Figura esquemática da participação do estradiol nas respostas autonômicas observadas neste estudo após microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/100 nl) na CeA . A redução da atividade GABAérgica da CeA sobre o NTS facilitaria o estímulo do NTS sobre o CVLM que atua modulando neurônios do RVLM. Dessa forma a atividade simpática é regulada. Por outro lado, o NTS livre de modulação GABAérgica pode excitar o núcleo dorsal do vago (NDV) modulando também a atividade parassimpática. 78

ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
BLA	Amígdala Basolateral
BNST	Núcleo do leito da estria terminal
Bpm	Batimentos por minuto
CeA	Amígdala central
DPN	2,3 bis (4-hidroxy-phenyl) Agonista de receptor ER- β
E₂	17 β - estradiol
eNOS	Óxido nítrico sintase
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
ER-α	Receptor de estradiol alfa
ER-β	Receptor de estradiol Beta
FC	Frequência Cardíaca
GABA	Ácido γ aminobutílico
HCl	Ácido Clorídrico
HLC	Hormônio liberador da corticotrofina
HPA	Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal
l	Litros
LTE	Labirinto em T elevado
ml	Mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
nl	Nano litros
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVX	Ovariectomia

PAM	Pressão Arterial Média
pmol	picomol
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RE	Receptor de estrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
UI	Unidades internacionais

RESUMO

Com a menopausa, a produção cíclica de estradiol e progesterona cessa. As concentrações séricas desses hormônios declinam abruptamente e apresentam potenciais de afetar processos cerebrais associados à cognição e outras desordens relacionadas com a idade, como disfunções autonômicas. Assim, os efeitos dos estrógenos sobre comportamentos como ansiedade e situações de estresse têm sido amplamente estudados, mas os mecanismos responsáveis ainda são inconclusivos. Em situações de estresse, o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos produz respostas de defesa, com alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais. Dessa maneira, o estudo de regiões cerebrais e suas vias é de fundamental importância para o entendimento desses mecanismos. A amígdala central (CeA) tem sido amplamente estudada como uma estação de integração e distribuição de estímulos essenciais para aquisição e expressão de respostas autonômicas em situações de estresse e medo. Assim, tivemos como objetivo nesse trabalho, avaliar o papel da ativação de neurônios na CeA em respostas autonômicas cardíacas, através da administração *in situ* de E₂ (0,5 pmol/100 nl) ou agonista seletivo de receptor ER-β (DPN) em ratas sob diferentes tempos de ovariectomia (OVX) (2 semanas, 2 meses e 8 meses) e submetidas a um procedimento de estresse por contensão/jato de ar. Avaliamos ainda a participação da CeA, quando estimulada por estradiol ou DPN, em comportamentos do tipo ansiedade no labirinto em T elevado e campo aberto. Ratas Wistar (190 ± 200g) de 85 dias de idade divididas em dois grupos, sham operados e OVX foram subdivididas em três novos grupos de acordo com o tempo de OVX. Após o tempo de cirurgia, cânulas guia foram implantadas bilateralmente direcionadas à CeA. Sete dias após esse procedimento, foram introduzidos cateteres nas artérias femorais para registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os experimentos foram realizados 48 horas após o último procedimento cirúrgico. Os registros cardíacos foram realizados por três dias consecutivos, onde no primeiro dia se administrou salina ou ciclodextrina (veículo para DPN); segundo dia, estradiol ou DPN, e o terceiro dia onde se procedeu ao registro sem administração de qualquer substância. Os registros foram realizados por um período aproximado de duas horas, onde os primeiros 20-30 minutos eram destinados à estabilização dos parâmetros dos animais. Após estabilização, se procedeu ao registro por 20 minutos, seguido da microinjeção, com mais 15-20 minutos para ação da substância. Realizava-se então o protocolo de estresse por 15 minutos e seguido de período final, até a estabilização dos sinais. Para os testes

comportamentais fizemos uso de um novo grupo de animais, submetidos aos mesmos protocolos cirúrgicos de castração e implante de cânulas guia destinadas à CeA. A microinjeção de estradiol na CeA produziu redução da PAM e FC basais, 24 horas após sua administração, tanto em animais sham quanto em animais OVX com 2 semanas de cirurgia. Ao passar de dois meses, as respostas hipotensoras e bradicárdicas tornaram-se reduzidas até se anularem aos oito meses. Notamos através dos deltas de variações da PAM e FC, que animais sob maiores tempos de OVX apresentam máximas respostas hipertensoras e taquicárdicas 24 horas após administração de estradiol. Observamos nos testes comportamentais que animais OVX apresentam maior grau de ansiedade com elevação do tempo de latência de saída do braço fechado e que apesar de inúmeros trabalhos mostrarem efeitos ansiolíticos do estradiol em outras regiões cerebrais, quando administrado diretamente na CeA não exibiu tais efeitos, apresentando em contrapartida certo potencial ansiogênico em animais OVX. Notamos ainda que animais OVX se locomovem menos e mais lentamente que animais sham e a microinjeção de 100 nl (0,5 pmol) de estradiol na CeA normaliza os padrões de ambulação e velocidade dos animais. Concluimos que, o estradiol atuando na CeA, exerce forte modulação em respostas autonômicas cardíacas tanto em valores basais quando em respostas a situações estressoras, provavelmente através de receptores do tipo ER- α e que também desempenha importante papel nas atividades locomotoras dos animais atuando na CeA.

ABSTRACT

With menopause, the cyclic production of estradiol and progesterone ceases. Serum concentrations of these hormones decline steeply and have the potential to affect brain processes associated with cognition and age-related disorders. Thus, the effects of estrogen on anxiety-like behaviors and stress situations have been widely studied but the mechanisms responsible are still inconclusive. In response to stress, the central nervous system of mammals produces defense responses characterized by endocrine, autonomic and behavioral changes. In this way, the study of the brain regions and their pathways is fundamental to understanding of these mechanisms. The central amygdala (CeA) has been widely studied as a station of integration and distribution of essential stimuli for the acquisition and expression of autonomic responses in situations of stress and fear. Therefore, we aimed in this study, to evaluate the role of neuron activation in the CeA in cardiac autonomic responses, through the administration *in situ* of E₂ (0,5 pmol/100 nl) or receptor selective agonist ER- β in rats under different times of ovariectomy (OVX) (2 weeks, 2 months, 8 months) and subjected to a contention-air-jet stress procedure. We also evaluated the participation of CeA, when stimulated by estradiol or DPN, in anxiety-like behaviors in the elevated T-maze (ETM) and open field (OF). Wistar female rats by 85 days old (190 ± 200 g) divided into two groups, operated sham and OVX were subdivided into three new groups according to the OVX time. After the time of surgery, guide cannulas were implanted bilaterally directed to CeA. Seven days after this procedure, catheters were inserted into the femoral arteries to record mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). The experiments were performed 48 hours after the last surgical procedure. Autonomic registries were performed for three consecutive days, where on the first day saline or cyclodextrin (vehicle for DPN) was administered; Second day, estradiol or DPN, and the third day of registration without any substance being administered. The records were performed for an approximate period of two hours, where the first 20-30 minutes were intended to stabilize the parameters of the animals. Post stabilization, the registration was done for 20 minutes, followed by microinjection, with a further 15-20 minutes for the action of the substance. The stress protocol was then carried out for 15 minutes followed by the final period until the signs stabilized. For the behavioral tests, we used a new group of animals, submitted to the same surgical protocols of castration and implantation of guide cannula for CeA. Estradiol microinjection in CeA was able to produce baseline MAP and MAP reductions 24 hours after administration in

both sham animals and OVX animals with 2 weeks of surgery. Within two months, the hypotensive and bradycardic responses became reduced until they were annulled at eight months. We observed through the deltas variations of MAP and HR, animals under longer OVX times presented maximal hypertensive and tachycardic responses 24 hours after estradiol administration. We observed in the behavioral tests that OVX animals presented a higher degree of anxiety with an increase in the latency of closed arm output, and that although several studies showed anxiolytic effects of estradiol in other brain regions, when administered directly in CeA, it did not exhibit such effects presenting in counterpart certain potential anxiogenic in animals OVX. We also note that OVX animals move less and more slowly than sham animals, and microinjection of 100 nl (0.5 pmol) of estradiol in CeA normalizes the patterns of ambulation and speed of the animals. We conclude that estradiol acting in CeA exerts strong modulation in cardiac autonomic responses both in basal values and in responses to stressful situations, probably through receptors of the ER- α type and that also plays an important role in the locomotor activities of the animals acting in CeA.

1- INTRODUÇÃO

1.1- MENOPAUSA/PÓS-MENOPAUSA

O termo climatério (do grego klimakter; escada) refere-se à fase da vida da mulher em que ocorre a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo, caracterizado por um hipoestrogenismo progressivo culminando na interrupção definitiva dos ciclos menstruais variando entre os 40 e 65 anos. Já a menopausa, etimológica e clinicamente trata-se do último ciclo menstrual espontâneo da mulher sendo reconhecida após 12 meses ininterruptos de amenorreia (Trench & Santos, 2005). Nesta fase, os ovários naturalmente deixam de funcionar e a produção de estrogênios pelas células foliculares dos ovários diminui. Consequentemente é produzido no organismo diversas mudanças fisiológicas resultantes da cessação da função ovariana (Organização Mundial da Saúde, 1996). Entretanto, a menopausa pode ser ainda resultante de ovariectomia (OVX) bilateral, realizada na mulher ainda em idade fértil (Bassan, 1999), como consequência de histerectomia profilática por agravo benigno de tumorações uterinas ou pélvicas, assim como em casos de endometriose e quimioterapias. Só nos Estados Unidos mais de 600.000 histerectomias são realizadas anualmente e mais de 300.000 dessas são acompanhadas por ooforectomia bilateral (Shoupe e cols., 2007).

Progressivamente a partir do início do século XX até os dias atuais, a maioria dos países ocidentais experimentaram melhorias na atenção básica à saúde e avanço tecnológico que traduzem um aumento da expectativa de vida. Com isso, espera-se que a mulher passe mais de um terço de sua vida na fase pós-menopausa (Botrel e cols., 2000).

Ao longo dos anos, diversos trabalhos têm mostrado existirem diferenças sexo-específicas associadas ao aparecimento de doenças cardiovasculares, déficits cognitivos, problemas de memória, humor, podendo levar a quadros de depressão, principalmente no período pós-menopausa, onde há a redução dos níveis hormonais fisiológicos (Reckelhoff, 2001; Rasia-Filho e cols., 2004; Kannel e cols., 1976; Johnston & File, 1991a). Observa-se entre as principais queixas em mulheres na pós-menopausa, as mudanças no comportamento, mais especificamente, mudanças de humor e memória, assim como as disfunções sexuais (Sherwin, 1994).

A ciência médica tem demonstrado que o cérebro é um dos principais órgãos do corpo que sofre com a redução dos níveis estrogênicos, seja por menopausa cirúrgica ou

natural e, que os danos oriundos de acidentes vasculares cerebrais ou neurodegeneração e demência, podem ser retardados por ações estrogênicas (McEwen, 2002).

Ainda que as ondas de calor (fogachos) sejam sintomas marcantes desse período, muitas mulheres mostram dificuldades em lembrar nomes e outras informações importantes para a vida diária, bem como déficits na coordenação motora fina, nos tempos de reação, sentimentos de depressão e ansiedade (McEwen & Alves, 1999). Da mesma maneira, observa-se a perda da proteção das artérias coronárias, levando mulheres pós-menopáusicas a um elevado risco de doenças cardiovasculares.

A cessação abrupta da síntese endógena de estrogênios apresenta potencial efeito sobre o cérebro associado às desordens cognitivas relacionadas a idade, como Alzheimer (DA) (Henderson e cols., 2016). As relações existentes entre os hormônios esteroides e a DA ainda não são completamente entendidas, pesquisas tanto em seres humanos como em animais experimentais indicam que tanto a depleção de estrógenos nas mulheres como andrógenos nos homens elevam a vulnerabilidade para patologia da DA (Vest & Pike, 2013).

Estudos experimentais têm mostrado, por exemplo, que os estrógenos apresentam poderosa neuroproteção reduzindo concentrações dos aminoácidos β - amiloide que são peptídeos de 36 a 43 aminoácidos, um fator crítico no início e progressão da DA observados em cérebros de pacientes com a doença (Pike e cols., 2009).

Alguns autores ainda afirmam que embora muitas funções cognitivas parecem não ser afetadas com o avanço da idade, tarefas simples envolvendo memória são fortemente afetadas (Sherwin, 1994; Sherwin, 2006; Vest & Pike, 2013).

1.2- ESTROGÊNIOS E RECEPTORES

A produção de estradiol é comumente considerada como um produto endócrino do ovário ou unidade feto- placentária durante a gestação. No entanto, existem muitos tecidos que têm a capacidade de sintetizar estrogênios a partir de andrógenos e usá-lo de forma parácrina ou intrácrina. Sabe-se, por exemplo, que o tecido adiposo pode contribuir significativamente com o pool circulante de estrogênios (Nelson & Bulun, 2001). De fato, outros tecidos como encéfalo e adrenais podem também sintetizar pequenas quantidades

de E₂. Os estrógenos apresentam-se sob três diferentes formas: estrona (E₁) mais importante após a menopausa quando é sintetizado no tecido adiposo a partir da desidroepiandrosterona (DHEA) liberada pelas adrenais, 17 β-estradiol (E₂) o esteroide mais potente sintetizado pelos ovários, e o estriol (E₃) o menos ativo deles, produzido principalmente pela placenta (Cui e cols., 2013). O E₂ é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos tanto em termos de níveis séricos absolutos como em termos de atividades estrogênicas, tendo inúmeros efeitos sobre a cognição, funções cerebrais e apresentando um importante papel cardioprotetor (Foster, 2005; Foster, 2012; Strauss JF & Barbieri RL, 2004).

O fígado é o principal órgão formador do colesterol utilizado para síntese dos esteroides, apesar de, também em pequenas quantidades, os esteroides poderem ser sintetizados a partir da acetil coenzima A. Primeiramente, através da enzima colesterol desmolase (P450 scc), o colesterol é convertido em pregnenolona. Duas vias possíveis são observadas a partir deste ponto. A Pregnenolona pode ser convertida em progesterona pela enzima 3β-Hidroxiesteroides-desidrogenase (P450 c21) ou em 17-hidroxipregnenolona pela enzima 17α-Hidroxilase (P450 c17). O estradiol pode, então, ser produzido a partir da progesterona ou 17-Hidroxipregnenolona. Ambas as vias chegando ao elemento Androstenediona através da enzima citocromo (P45017α) e (17β-hidroxieteroide desidrogenase (17β-HSD). A conversão final em E₂ é catalisada pela enzima aromatase (P450 ARO) nas células da granulosa (Cui e cols., 2013). A figura 1 mostra resumidamente a síntese ovariana de estradiol.

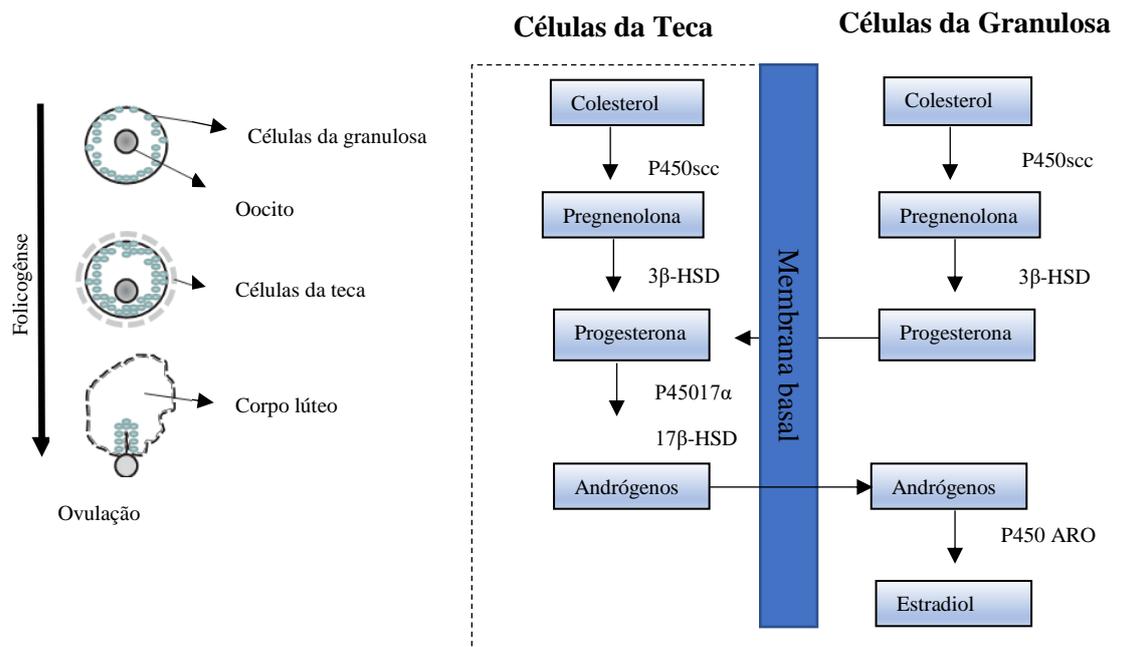


Figura 1: Síntese ovariana de estradiol. A produção do estradiol tem início com a síntese da pregnenolona a partir de moléculas circulantes de colesterol, catalisada pela enzima P450scc. A pregnenolona é então convertida em progesterona pela 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3βHDS) tão nas células tecais quanto da granulosa. A progesterona produzida é convertida em andrógenos pela citocromo P450 17α-hidroxilase e 17β-hidriesteroide desidrogenase (17β-HSD) nas células tecais durante a fase folicular. A conversão do E₂ é catalisada pela aromatase (P450ARO) na granulosa, adaptado de (Cui e cols., 2013).

No SNC, a síntese local de E₂ ocorre a partir do colesterol, sendo já verificada a presença da enzima (P450 scc), responsável pela mediação do colesterol em pregnenolona em regiões como hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral, amígdala, tálamo e algumas áreas próximas ao sistema límbico, sugerindo sua produção mesmo com concentrações séricas não detectáveis (Naftolin e cols., 1971a; Naftolin e cols., 1971b). Outra via possível de síntese local de E₂ dá-se através da ARO, fazendo a conversão local de andrógenos circulantes em E₂ (Cornil & Charlier, 2010). A enzima ARO é sintetizada em ambos os sexos, sendo encontrada em vários tipos teciduais, incluindo o cérebro. Em condições fisiológicas normais, a expressão de ARO no SNC é restrita a algumas subpopulações neuronais como área pré-óptica, hipotálamo, sistema límbico, (BNST, amígdala e hipocampo) (Roselli & Resko, 1997; Stoffel-Wagner, 2003).

Interessantemente, a ARO tem sido descrita participando da regulação neuroendócrina de comportamentos reprodutivos, e mais recentemente, a aromatização de andrógenos no SNC também envolve o controle de processos não reprodutivos como humor e cognição (Garcia-Segura, 2008).

Em condições fisiológicas, os neurônios são os maiores sítios da síntese de estradiol no cérebro. Estudos têm demonstrado aumento da expressão da ARO em regiões do hipocampo, neurônios piramidais das regiões CA1 e CA3, células granulosas do giro denteado após injúrias como crises epiléticas (Yague e cols., 2010).

Células específicas cerebrais como os neurônios e os astrócitos são capazes de produzir E₂ a partir da testosterona circulante ou colesterol, característica não observada em oligodendrócitos e células da micróglia (Cui e cols., 2013). De fato, os níveis de estrogênios cerebrais podem não ser os mesmos daqueles observados no sangue (em torno de 20 a 400 pg/ml) o qual é frequentemente usado como marcador de diagnóstico. Os níveis cerebrais de E₂ são reportados ser 0,08 a 0,19 ng/g de peso úmido, o qual pode ser significativamente diferente dos níveis circulantes devido ao sequestro pela globulina de ligação hormonal sexual, enzimas de conversão esteroidal no cérebro, neuroestereoidogênese e síntese local (Rosario e cols., 2011).

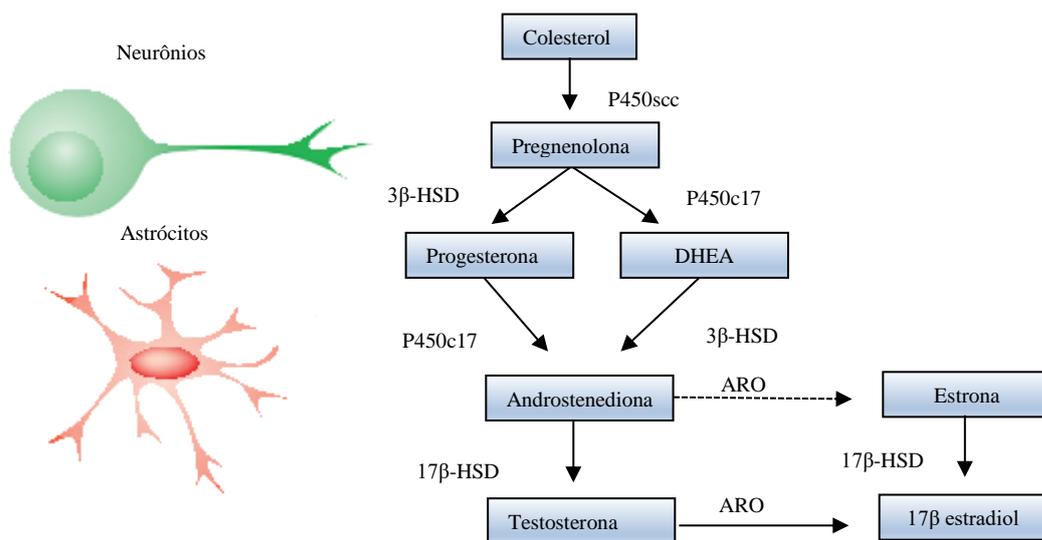


Figura 2: Síntese de E₂ em células do SNC. Neurônios e astrócitos expressam todas as enzimas necessárias para a síntese local de estrogênios. Porém, células da micróglia e oligodendrócitos não são capazes de produzi-lo, adaptado de (Cui e cols., 2013).

O E₂ é reconhecido como o hormônio sexual feminino predominante com um papel crítico no desenvolvimento do sistema reprodutor e características sexuais secundárias. Em adição às funções reprodutivas, o 17-β estradiol tem importantes ações fisiológicas sobre inúmeras outras áreas do corpo, incluindo SNC, imunológico, cardiovascular, muscular, esquelético e endócrino. Partindo disso, alterações fisiológicas ou patológicas nos níveis de E₂, ou problemas de sinalização de seus receptores poderiam culminar em múltiplas desordens como vários tipos de câncer, osteoporose, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, lúpus eritematoso, endometriose, obesidade, desordens cognitivas bem como maior incidência de DA (Deroo & Korach, 2006; Vest & Pike, 2013) .

Pesquisas realizadas em animais têm mostrado que o estradiol participa da regulação de comportamentos do tipo ansiedade, a depender da fase do ciclo estral que fêmeas de roedores se encontram. Estas mostram comportamentos do tipo ansiedade reduzidos em comparação aos machos em fases de maiores concentrações hormonais, como observado no proestro, por exemplo (Johnston & File, 1991a).

Os estrogênios exercem suas ações em células e tecidos alvos ligando-se a estruturas na membrana celular (mecanismo não-genômico) ou ativando receptores intracelulares (mecanismo genômico) (Shughrue e cols., 1997; Paech e cols., 1997). No chamado mecanismo “clássico” ou genômico, os estrogênios se difundem pela célula e ligam-se aos receptores de estrogênio (RE), que se encontram localizados no núcleo. Este complexo formado estrogênio-RE liga-se diretamente às sequências reguladoras conhecidas como “elemento de resposta ao estrogênio” (ERE) presentes nos genes alvo, regulando a transcrição destes genes, ou, indiretamente, através do recrutamento de proteínas co-reguladoras, (como co-ativadores) aumentando ou diminuindo a produção de RNA mensageiro da proteína associada, levando à resposta fisiológica. Este mecanismo ocorre tipicamente no decorrer de horas (Deroo & Korach, 2006). Em contrapartida os estrogênios podem atuar de maneira mais rápida (dentro de segundos ou minutos), via mecanismos não genômicos, através da ligação à RE localizados na membrana plasmática ou adjacentes a esta (ligação que pode requerer proteínas adaptadoras que direcionam o RE para a membrana), ou através da ligação de outras proteínas da membrana plasmática, resultando em respostas celulares como aumento de Ca⁺, óxido nítrico (NO) ou ativação de cinases, (Prossnitz & Barton, 2011a) como exemplificado na figura 3.

Atualmente tem-se conhecimento de dois subtipos de receptores encontrados em diferentes tecidos e que foram caracterizados em ambos os gêneros. São eles, ER- α (receptor de estrogênio alfa) codificado pelo gene ESR1 localizado no cromossoma 6q25.1 e ER- β (receptor de estrogênio beta) codificado pelo gene ESR2 localizado no gene 14q22-24 (McEwen, 2002; R.Misao e cols., 1999; Siddig e cols., 2008). Trabalhos realizados com medições de mRNA para ER- α e ER- β revelam distribuição corporal de maneira distinta dos dois tipos de receptores. Receptores do tipo ER- α apresentam moderada a alta expressão na glândula pituitária, rins, epidídimo e adrenal. Já receptores do tipo ER- β apresentam moderada a alta expressão na próstata, pulmões, bexiga e cérebro e há uma sobreposição na expressão de ambos os receptores nos testículos, útero e ovários (Kuiper e cols., 1998). Além disso, uma proteína G acoplada ao receptor de estrogênio (GPR30 ou GPER1) tem sido caracterizada como um modulador de uma via de segundo mensageiro. Os níveis relativos e distribuições subcelulares de ER α , ER β e GPER1 os quais são encontrados por todas as partes do sistema nervoso varia através das regiões cerebrais (Brailoiu e cols., 2007; Milner & Drake, 2001; Mitra e cols., 2003; Mitterling e cols., 2010).

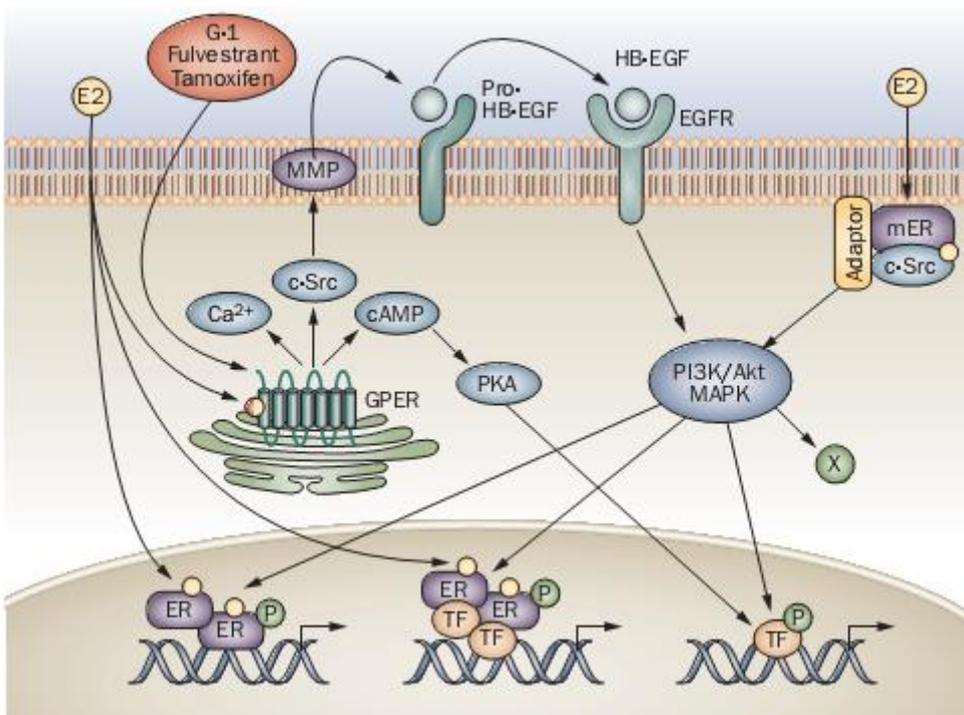


Figura 3: Via Genômica e Não-Genômica de sinalização. Estrógenos endógenos incluindo 17- β estradiol, são ativadores não seletivos de três conhecidos receptores: ER- α , ER- β e GPER. No mecanismo genômico, primeiramente o E₂ ativa RE nucleares,

incluindo receptores acoplados à proteína G (GPER) (diméricos), para atuar em genes alvo. Alternativamente, RE ativados modulam a função de fatores de transcrição através de interações proteína-proteína. Subpopulações de RE ativados pelo E₂ interagem com receptores acoplados às GPER e moléculas de sinalização como tirosina cinase (c-Src) a qual medeia rápidas sinalizações via P13K-Akt e MAPK. E₂ ou agonistas seletivos como G1, reguladores seletivos, como fulvestrant ou moduladores seletivos, como tamoxifeno, também ativam GPER, o qual é localizado principalmente na membrana intracelular. A ativação de GPER estimula a liberação de c-AMP, mobilização de cálcio e c-Src o qual ativam MMPs. Os MMPs clivam o pro-HB-EGF liberando o HB-EGF que transativa o EGFR o qual, por sua vez, ativa as vias MAPK e P13K-Akt que induz efeitos adicionais rápidos (não-genômicos) regulando a transcrição. A regulação transcricional mediada por estradiol pode envolver fosforilação de RE ou através de fatores transcricionais que podem interagir diretamente com os RE ou se ligarem independentemente em RE dentro dos genes promotores alvo (E2, 17-β estradiol; EGFR, fator de crescimento epidermal; ER, receptor de estrogênio; GPER, proteína G acoplada a um receptor de estrogênio; MMP, metaloproteinases de matriz; pro-HG-EGF, fator de crescimento epidérmico de Ligação à Heparina; TF, fator de transcrição. (Prossnitz & Barton, 2011b)

O estradiol se liga com alta e igual afinidade a ambos os receptores, a estrona se liga com mais facilidade ao ER-α e o estriol liga-se mais fracamente ao ER-β. Os dois subtipos de receptores diferem entre si de acordo com as características específicas e funcionais dos tecidos (Strauss JF & Barbieri RL, 2004).

Entretanto, trabalhos demonstraram que receptores ER-α e ER-β podem formar homodímeros ou heterodímeros, tornando bastante complexa a função individual ou combinada dos dois receptores dentro da célula (Herynk & Fuqua, 2004).

Embora no passado muitos estudos se concentrassem nas ações do estradiol sobre o hipotálamo afetando sistema reprodutor, agora, ensaios pré-clínicos com animais mostram que os estrogênios exercem muitas ações além da reprodutiva, incluindo ações em áreas importantes para a aprendizagem, memória, emoções e o estado afetivo, bem como coordenação motora e sensibilidade a dor (McEwen, 2002; McEwen & Alves, 1999). Tais efeitos refletem as ações do estrogênio num grande número de áreas cerebrais fora do hipotálamo, como neurônios do cérebro e do mesencéfalo que produzem serotonina e catecolaminas, medula espinhal, córtex, tronco cerebral e hipocampo

(McEwen, 2002). O grande problema no estudo dos receptores e ações estrogênicas nessas regiões cerebrais tem sido reconhecer quais são os tipos de receptores responsáveis por determinados padrões de respostas e os mecanismos pelos quais os estrogênios produzem esses efeitos (McEwen, 2002). Por outro lado, a desigual distribuição dos vários tipos de receptores hormonais refletem diferenças em seus mecanismos de ação (Stumpf & Sar, 1976).

No tecido nervoso cerebral a localização dos receptores ER- α está bem estabelecida, porém existe uma menor quantificação desses receptores ao redor de receptores ER- β (Stumpf & Sar, 1976)

Estudos realizados através de imunohistoquímica e mapeamentos autoradiográficos revelaram que receptores ER- α e ER- β são similares não apenas na afinidade a um número de estrogênios marcados com ^{125}E , mas também em sua habilidade em regular genes na qual a resposta ao elemento estrógeno é o sítio de ligação primário (Kuiper e cols., 1998; Paech e cols., 1997).

Atualmente, a colocalização endógena dos receptores ER- α e ER- β tem sido demonstrada através de imunohistoquímica na área pré-óptica do hipotálamo, núcleo leito da estreira terminal (BNST), e núcleo medial do corpo amigdalóide (incluindo amígdala central), núcleo do trato solitário (NTS). Provavelmente existam outras regiões cerebrais incluindo a rafe mesencefálica (Hrabovszky e cols., 1998; Shughrue e cols., 1997). A figura 4 representa esquematicamente a distribuição de receptores ER- α e ER- β na região da CeA.

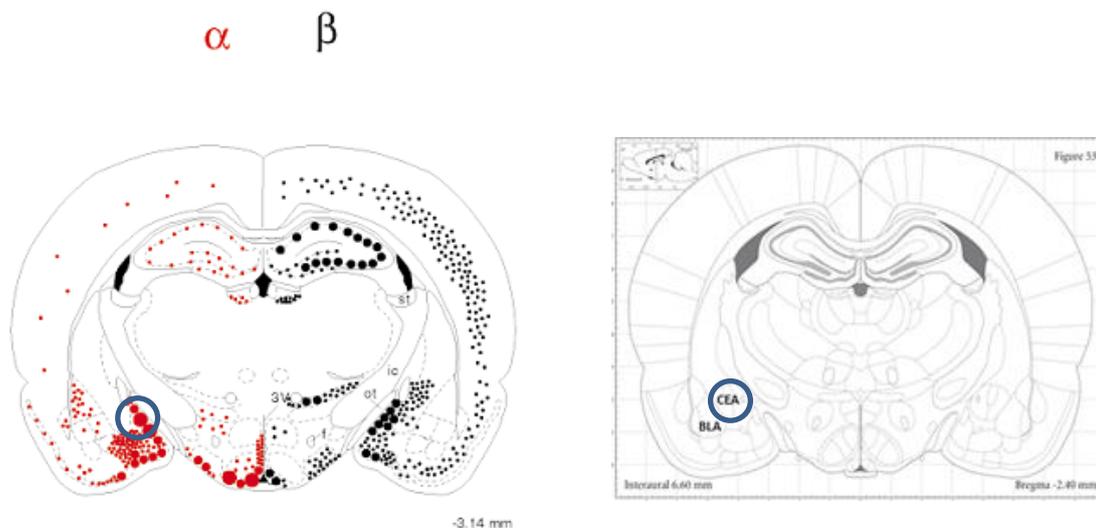


Figura 4: Co-localização de receptores de estradiol ER- α e ER- β no SNC a 3,14 mm do bregma (Hrabovszky e cols., 1998; Shughrue e cols., 1997). Círculo azul demonstra a região da CeA.

A principal diferença encontrada entre os dois principais tipos de receptores se concentra na habilidade de regular a transcrição via AP-1. A ligação de 17- β estradiol em receptores ER- α ativa transcrição via complexo AP-1 enquanto que essa transcrição não ocorre via receptores ER- β causando inibição (Kuiper e cols., 1998).

1.3- DEFICIÊNCIA DE ESTRADIOL E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS

Recentemente, com o aumento da expectativa de vida da população em geral, propiciado por diversos fatores, dentre os quais, os avanços obtidos com as pesquisas e descobertas de novos tratamentos das mais diversas patologias, houve crescimento do número de pessoas com idade acima dos 65 anos, o que, conseqüentemente, vem acompanhado de alterações fisiológicas na senescência. Entre essas alterações, podemos mencionar as doenças ditas crônicas, como diabetes mellitus, hipertensão arterial, problemas vasculares, artrites, problemas de memória, aterosclerose entre outras. Assim, espera-se que a mulher passe mais de um terço de sua vida na fase de pós-menopausa, sob deficiência de hormônios ovarianos (Botrel e cols., 2000).

Dentre as mais variadas alterações decorrentes à diminuição progressiva das funções biológicas provenientes do avanço da idade, a teoria dos radicais livres no

envelhecimento postula que a exposição contínua a agentes oxidantes (espécies reativas de oxigênio-ERO) é a força motriz para a perda da função celular (Shigenaga e cols., 1994). As EROs induzem danos celulares, tais como aumento da permeabilidade celular causado pela peroxidação lipídica. Contudo, enzimas antioxidantes endógenas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase, e sistema glutatona peroxidase/ glutatona redutase, constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante, pois eliminam os radicais livres que poderiam oxidar os substratos celulares (Yu e cols., 1994).

Estudos demonstraram que em uma situação de estresse oxidativo, pela privação de oxigênio e glicose *in vitro*, a remoção da fonte ovariana de hormônios femininos aumenta o número de morte celular, enquanto a reposição hormonal com estradiol reverte este efeito em fatias hipocâmpais (Fontes D., 2009). Este efeito neuroprotetor foi observado, também, em fatias hipocâmpais de fêmeas *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT KD), um modelo animal de hipofunção colinérgica (Fontes D., 2009).

Do ponto de vista cognitivo, mulheres na pós-menopausa reclamam de humor disfórico ou depressão, e essas mudanças parecem ser dependentes da população estudada. Muitos estudos epidemiológicos realizados em amostras populacionais dos Estados Unidos (McKinlay e cols., 1992; Neugarten & KRAINES, 1965) bem como na Suécia (Hallstrom & Samuelsson, 1985) e Inglaterra (McKinlay e cols., 1992) falharam em mostrar o aumento dos sintomas depressivos no período pós-menopausa comparado com outras idades durante a vida ativa. Contudo, outros autores em suas pesquisas obtiveram resultados diferentes, encontrando alta incidência de sintomas depressivos nas populações estudadas nos períodos peri- e pós-menopausa (Bungay e cols., 1980; Hunter e cols., 1986). Interessantemente, um estudo longitudinal com 2500 mulheres realizado em Massachussets (EUA), mostrou que aquelas submetidas à menopausa cirúrgica apresentam sintomas depressivos mais significativos que mulheres na pós-menopausa natural (Bungay e cols., 1980; Hunter e cols., 1986; McKinlay e cols., 1987).

De fato, mesmo após a menopausa, os ovários ainda persistem como órgão endócrino ativo, pois apesar da cessação da síntese folicular de E₂, o estroma ovariano continua a produzir testosterona e androstenediona, que, em outros tecidos que apresentem a expressão da ARO são convertidos em estrogênios (Overlie e cols., 1999). Dessa maneira, os níveis androgênicos se mantêm em uma faixa considerada normal

mesmo no período pós-menopausa. Corroborando com tal pensamento, um estudo realizado com mulheres ooforectomizadas mostrou haver redução de 40 à 50% nas concentrações de estrona sérica, em consequência da redução de andrógenos ovarianos, diferindo da estrona de mulheres com ovários preservados na mesma fase (Laughlin e cols., 2000).

Durante as duas décadas passadas, a combinação da disponibilidade de novas tecnologias médicas e o desenvolvimento de novas pesquisas buscaram fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos de ação dos estrogênios no SNC, que podem ser as bases de suas possíveis influências no funcionamento cognitivo. Porém, várias observações recentes mostram que estrogênios afetam positivamente a maioria dos mecanismos implicados no acelerado envelhecimento cognitivo e demência, como por exemplo, o estresse oxidativo, perda sináptica e/ou dendrítica, declínio da função neurotransmissora e apoptose (Hogervorst & Bandelow, 2010).

Com o intuito de esclarecer as dúvidas sobre as discordâncias dos achados de trabalhos em seres humanos, o uso de animais de laboratório, como roedores, tornou-se uma ferramenta de extrema valia para obtenção de respostas. A investigação de (Tang e cols., 2013) mostrou que estimulações por eletroacupuntura do hipocampo de ratas OVX poderia ser capaz de melhorar aprendizagem e a memória promovendo a expressão de óxido nítrico sintase (eNOS) através do aumento da concentração de estrogênio.

O tratamento agudo ou crônico de E₂, por exemplo, pode afetar positivamente tarefas de aprendizado e memória tanto em seres humanos como em roedores, agindo de forma estrutural, celular e funcional modulando sistemas de neurotransmissores (Pompili e cols., 2012). Em contraste, a remoção da fonte ovarina de E₂ prejudica a memória em ratas, sendo revertida pela reposição hormonal (Fonseca e cols., 2013). Estudos mostram ainda que a influência positiva sobre testes de memória observado em roedores depende principalmente a ativação de receptores ER- α (Pereira e cols., 2014).

Importante ressaltar que, a OVX bilateral em ratas é capaz de produzir um estado depressivo como àqueles observados no período pós menopausa. Porém, os fatores responsáveis por esse fenômeno ainda permanecem sob estudo (Bekku e cols., 2006). Interessantemente, as pesquisas apontam que mulheres na pós menopausa apresentam riscos 30%, a três vezes, mais elevados de desenvolver estados depressivos que mulheres na pré menopausa (Freeman, 2010). Mulheres que apresentem históricos depressivos

mostram aproximadamente cinco vezes mais chance de terem um diagnóstico de depressão na pós menopausa enquanto que aquelas sem históricos depressivos apresentam menores chances (Freeman, 2010).

1.4- OVARECTOMIA E ANSIEDADE

Como já descrito previamente, a OVX é conhecida como “menopausa cirúrgica” com redução dos níveis estrogênicos em ratas elevando riscos de efeitos adversos, incluindo prejuízos cognitivos e comportamentais (Qu e cols., 2013). Os estrógenos exercem seus efeitos através do SNC atuando basicamente sobre dois tipos de receptores ER- α e ER- β , contudo, a participação efetiva desses dois tipos de receptores sobre respostas cognitivas ainda é amplamente estudada.

Desordens do tipo ansiedade são prevalentes nas doenças psiquiátricas e muitos fatores podem ser atribuídos a suas origens incluindo os genéticos, de gênero, química cerebral e incontáveis eventos estressores (Kalandakanond-Thongsong e cols., 2012a). Notadamente, é bem documentado na literatura que mulheres, principalmente aquelas no período pós-menopausa, são mais afetadas por alterações cognitivas e distúrbios de ansiedade do que homens de mesma idade (Lim e cols., 2005; Seeman, 1997; Sherwin, 2006).

Através de pesquisas realizada em animais, Johnston e colaboradores mostraram, em 1991, haver diferenças sexo específicas em testes de ansiedade feitos em roedores (Johnston & File, 1991a). Neste trabalho, ratas demonstraram em avaliações realizadas no labirinto em T elevado, aversão reduzida ao braço aberto do aparato, quando comparadas a machos (Johnston & File, 1991a). De fato, trabalhos anteriores mostraram que fêmeas de roedores apresentam comportamento de ambulação mais elevado e menor taxa de defecação no teste de campo aberto e, que após tratamento com propionato de testosterona houve mudança no comportamento para similares àqueles encontrado em machos, indicando influência dos hormônios gonadais sobre o comportamento desses animais (Blizard e cols., 1975a).

Em 1989, Diaz-Veliz mostrou haver diferenças comportamentais durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo de ratas e, modulação após OVX (Diaz-Veliz e cols., 1989). Neste estudo, os pesquisadores encontraram aumento do tempo de esquiava

inibitória no diestro, um prejuízo no proestro e comportamento praticamente abolido no estro, bem como animais OVX apresentaram elevação do tempo de esquiva inibitória após 14 dias de castração (Diaz-Veliz e cols., 1989). Contudo, trabalhos posteriores mostraram maior exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado nas fases de maiores concentrações hormonais (proestro e estro), bem como influência da luminosidade durante os testes indicando efeitos ansiolíticos (Mora e cols., 1996). De acordo com esses resultados, em 2001, Marcondes e colaboradores também mostraram aumento no tempo de exploração do braço aberto no proestro em relação ao diestro, e que ratas no diestro tratadas com estradiol tiveram as diferenças no tempo gasto na exploração do braço aberto abolidas em comparação às ratas em proestro. Com esses resultados, foi postulado que os níveis de ansiedade são menores durante fases estrais de maiores concentrações hormonais de E₂ (Marcondes e cols., 2001a). Já em testes realizados no labirinto em T elevado, as pesquisas mais recentes mostraram que ratas OVX sob tratamento agudo com E₂ ou agonista não seletivo de receptores de estradiol tamoxifeno apresentaram tempo reduzido de esquiva inibitória e aumento do tempo de latência de fuga do braço aberto do aparato em comparação a ratas OVX, sugerindo ações ansiolíticas ao E₂ (Kalandakanond-Thongsong e cols., 2012a).

1.5- ESTRESSE

O termo “stress” foi utilizado pela primeira vez no âmbito da saúde em 1936, pelo fisiologista Austríaco Hans Selye, para designar uma resposta geral e inesperada do organismo a um estressor ou a uma situação estressante. Posteriormente, o termo passou a ser utilizado tanto para designar esta resposta do organismo como a situação que desencadeia os efeitos desta. (Margis R e cols., 2003; Margis, 2003). Selye notou que em vários de seus pacientes, antes de apresentarem sintomas característicos de uma determinada doença, mostravam um conjunto de alterações semelhantes, independentes da causa da patologia. Dessa maneira, conceituou-se estresse como uma síndrome geral de adaptação a um conjunto de reações sistêmicas que surge quando ocorre uma exposição do organismo a agentes estressores.

Estudando tal fenômeno, (Selye, 1998) observou em ratos que o organismo é gravemente danificado por agentes não específicos, como exposição ao frio, lesão cirúrgica, choque, exercício muscular e injeção subletal de diversos fármacos

(Adrenalina, Atropina, morfina, formaldeído, etc.). Esses sinais típicos aparecem independentes da natureza do agente causador ou tipo de droga utilizada. Como sintomatologia, Selye observou que os animais apresentavam diminuição do tamanho do timo, baço e nódulos linfáticos, fígado, diminuição do tecido adiposo, edema, acúmulo de transudato peritoneal e pleural, diminuição da temperatura corporal, formação de úlceras no trato gastrointestinal (principalmente no estomago), perda do tônus muscular, aumento de lacrimação e salivação. Notou ainda que os animais que pertenciam ao grupo controle e recebiam injeções de salina, também mostravam alterações semelhantes às observadas, concluindo que tais alterações estavam relacionadas à aplicações de repetidas injeções. As mesmas alterações sistêmicas foram observadas quando os animais eram expostos ao frio, patógenos, toxinas e até mesmo ao barulho (Sapolsky, 1990; Selye, 1998).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sua patofisiologia ainda permanecem desconhecidos, apesar da importância significativa do estresse e do crescente número de estudos sobre o assunto. Hormônios glicocorticoides (cortisol, corticosterona) liberados pelas glândulas adrenais são os principais responsáveis em mediar às respostas autônomas, comportamentais e endócrinas em resposta a uma situação estressora (Al-Mohaisen e cols., 2000; Raglan e cols., 2017).

Durante uma situação de estresse, o estímulo estressor chega ao sistema nervoso central (SNC) através dos órgãos dos sentidos, e a resposta a esses estímulos se faz através do hipotálamo. Por meio da liberação hormônios-liberadores de corticotropina (HLC) ativam o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), que por sua vez secretam hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise atuando sobre o córtex das glândulas suprarrenais incitando a liberação de glicocorticoides que são extremamente importantes para a adaptação ao estresse (Nemeroff, 1996; Raglan e cols., 2017).

Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição por retroalimentação negativa da secreção do ACTH pela pituitária e do HLC a partir do hipotálamo (Pariante & Miller, 2001).

De fato, do ponto de vista natural, todos esses eventos fisiológicos observados têm raízes nas reações de defesa dos animais, com a simples função de preparar o organismo

para uma situação de “luta ou fuga”, frente a uma situação de estresse. Estado esse, observado quando uma presa foge de um predador natural.

Em condições normais, os parâmetros cardiovasculares alterados pelo estresse emocional retornam rapidamente ao estado basal ao final do estímulo estressante, devido aos mecanismos fisiológicos de autorregulação (Amiragova, 1985; Dimicco e cols., 2002; Leor e cols., 1996). Levando em consideração o sistema cardiovascular, situações de estresse crônico podem desencadear diversos estados patológicos, como a hipertensão arterial sistêmica, arritmias cardíacas e infarto do miocárdio (Dimicco e cols., 2002; Leor e cols., 1996). É importante ressaltar que estudos em animais corroboram os achados em humanos, por exemplo, a ativação repetida da resposta cardiovascular induzida pelo estresse emocional em ratos, produz hipertensão arterial sustentada (Folkow, 1982).

Em 1992, a Organização Mundial da Saúde, a OMS, declarou que o estresse era a “doença do século XX”. Atualmente, o estresse afeta mais de 90% da população mundial sendo considerado uma epidemia global que não mostra sua verdadeira fisionomia (Organização Mundial da Saúde, 1999).

Observa-se que em humanos, a resposta ao estresse mental é maior em mulheres após a menopausa (Lindheim e cols., 1992; Yu e cols., 1994). Ademais, foi demonstrado que a reposição de estrógeno em mulheres pós-menopausa reduz as respostas cardiovasculares ao estresse mental (Del e cols., 1998; Sung e cols., 1999; Lindheim e cols., 1992).

O estresse agudo induz ativação neuronal de várias regiões cerebrais, incluindo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), córtex cerebral, Hipocampo dorsomedial (DMH) e amígdala (de Menezes e cols., 2008; Dimicco e cols., 2002; Organização Mundial da Saúde, 1999; Salome e cols., 2007).

Embora conhecida a participação da amígdala em situações estressoras, comportamentais e emocionais a algum tempo (WEISKRANTZ, 1956), muito do interesse do estudo dessa estrutura deriva do seu papel nas reações do medo condicionado, aprendizado emocional no qual um estímulo induz comportamentos defensivos e respostas psicológicas após terem sido associadas a um comportamento aversivo (Phelps & LeDoux, 2005).

Pesquisas sobre os sistemas neurais subjacentes às respostas de medo condicionado por estímulos de choques nas patas apresentam intrincados circuitos dentro e através na amígdala, essencial para aquisição e armazenamento da memória, experiência condicional e respostas de medo (LeDoux e cols., 1988a; LeDoux, 2000; Phelps & LeDoux, 2005).

O Núcleo lateral da amígdala (BLA) é tipicamente visto como a interface sensorial e como um sitio chave de plasticidade, enquanto a amígdala central (CeA) é entendida como uma região de saída dos estímulos que atingem o complexo amigdalóide (LeDoux e cols., 1988a; Pare e cols., 2004). Abreviadamente, a BLA recebe os estímulos oriundos de hipotálamo, estações corticais do sistema auditivo, sendo ambas envolvidas nos estímulos condicionados. A BLA faz projeções diretas ou indiretas para CeA e projeções de saída da CeA controlam a expressão de respostas de medo, incluindo comportamentos de congelamento e respostas relacionadas com o sistema nervoso autonômico como pressão arterial e frequência cardíaca, bem como respostas endócrinas (eixo HPA) (Medina e cols., 2002; Phelps & LeDoux, 2005; Pitkanen e cols., 1997). O esquema da figura 5 exemplifica simplificadamente as conexões e respostas entre BLA e CeA. Assim, a CeA é dita ser o principal centro de respostas à estímulos emocionais como medo e ansiedade que é uma, senão, a principal estrutura do sistema límbico envolvida com

regulação do comportamento aversivo como (Gray, 1993; Paredes e cols., 2000) , como ilustrado na figura 5.

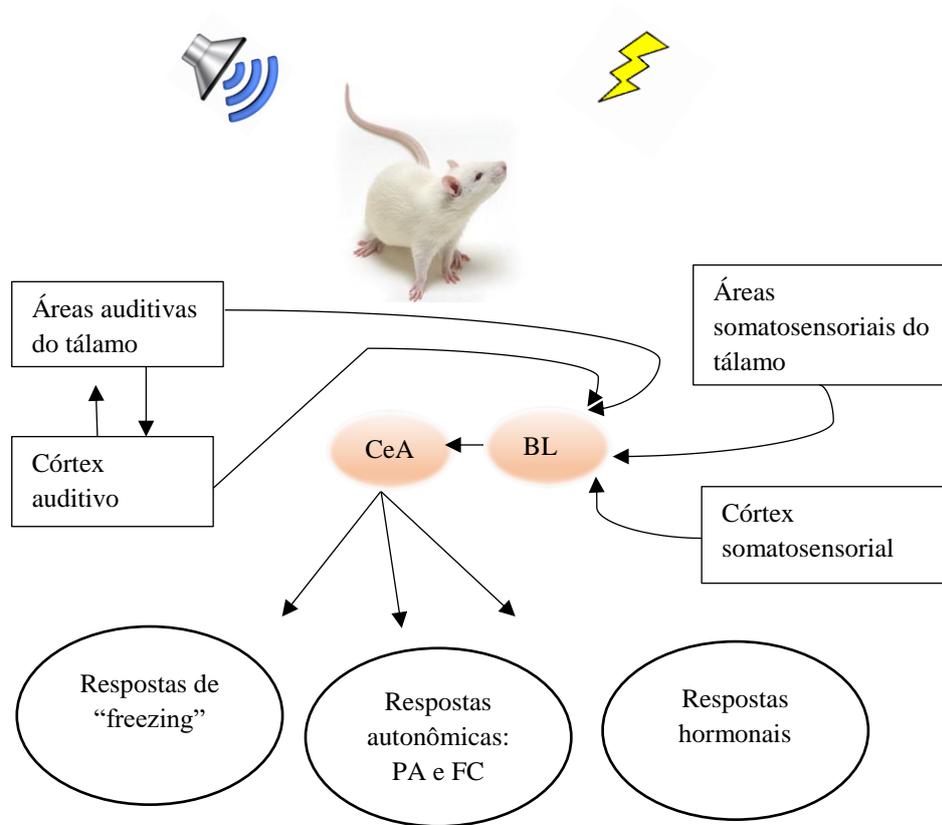


Figura 5: Esquema das vias neurais subjacentes ao medo condicionado. Áreas responsivas a estímulos auditivos ou somatosensoriais são ativadas no tálamo, posteriormente em regiões específicas no córtex cerebral. Em seguida projeções diretas do tálamo ganham a BLA que então se conecta com a CeA via projeções diretas e através de outros núcleos amigdalóides. Então, a CeA controla as respostas fisiológicas subsequentes atribuídas ao medo condicionado como “freezing”, repostas autonômicas e hormonais.

1.6- AMÍGDALA/ NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA (CeA)

O corpo amigdalóide, amígdala, complexo amigdalalar e complexo nuclear amigdalóide, segundo a Comissão Federativa da Terminologia Anatômica, são termos que se referem a uma região altamente diferenciada próximo ao polo temporal dos hemisférios cerebrais (Comissão Federativa da Terminologia Anatômica, 2001).

Burdach no início do século XIX descreveu pela primeira vez a amígdala como uma pequena estrutura cinzenta ovalada, localizada profundamente em ambos os lobos temporais, próximo à parte terminal do corno inferior. A princípio, foi descrita como sendo massa celular que, hoje em dia é denominado complexo basolateral. Consequentemente, inúmeras estruturas que circundam o complexo basolateral vêm sendo identificadas em várias espécies e forma o que se conhece atualmente como corpo amigdalóide (Brinley-Reed e cols., 1995; Knapska e cols., 2007).

Na descrição anatômica mais aceita nos dias atuais, o corpo amigdalóide é uma massa ovoide de substância cinzenta localizada na porção súpero-medial do lobo temporal, parcialmente acima do ápice do corno inferior do ventrículo lateral. Ocupa a parte superior do segmento anterior do úncus e envolve parcialmente a cabeça do hipocampo, sendo separado dessa estrutura pelo recesso uncal do corno inferior do ventrículo lateral (Duvernoy HM., 1988). Nos últimos anos, a amígdala tem emergido como a estrutura prosencefálica chave, mediando respostas emocionais, inata e adquirida, bem como vários aspectos de processamento, interpretação e integração da informação biológica e/ou emocional (Knapska e cols., 2007). Em ratos, é formada por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está relacionada na modulação de diversos comportamentos e ajustes vegetativos. A figura 6 ilustra a localização do corpo amigdalóide em seres humanos e roedores.

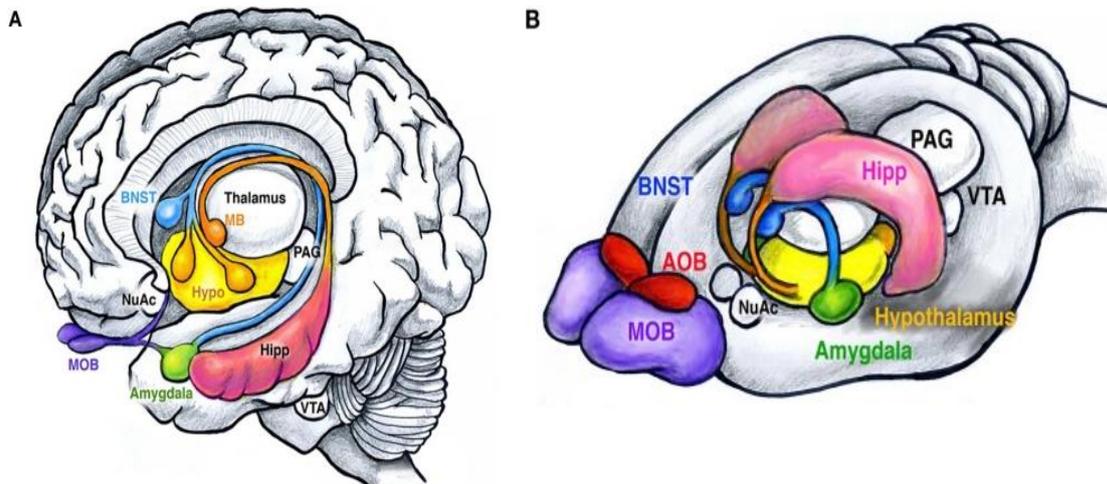


Figura 6: Figura esquemática demonstrando a localização do complexo amigdaloide em uma cérebro Humano (A) e em um cérebro de rato (B), Siglas: BNST, núcleo leito da estria terminal; PAG, substância cinzenta periaquedutal; Hipp, hipotálamo, VTA, área tegmentar ventral; AOB, bulbo olfatório acessório; MOB, bulbo olfatório; NuAc, núcleo acumbens (McDonald AJ, 1992; Sokolowski & Corbin, 2012).

O corpo amigdalóide abrange diversos núcleos com amplas conexões inter e intranucleares. Basicamente, esses núcleos podem ser divididos em três grupos: 1) o grupo profundo ou basolateral, que abrange o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo lateral secundário; 2) o grupo superficial que contém os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; 3) o grupo centro-medial, composto dos núcleos medial e central. Além disso, há um grupo de núcleos separados que não podem ser classificados em nenhum desses três grupos e que envolve as massas celulares intercaladas e a área amigdaló-hipocampal (McDonald AJ, 1992). A figura 7 traz um exemplo esquemático dos núcleos que compõem a amígdala.

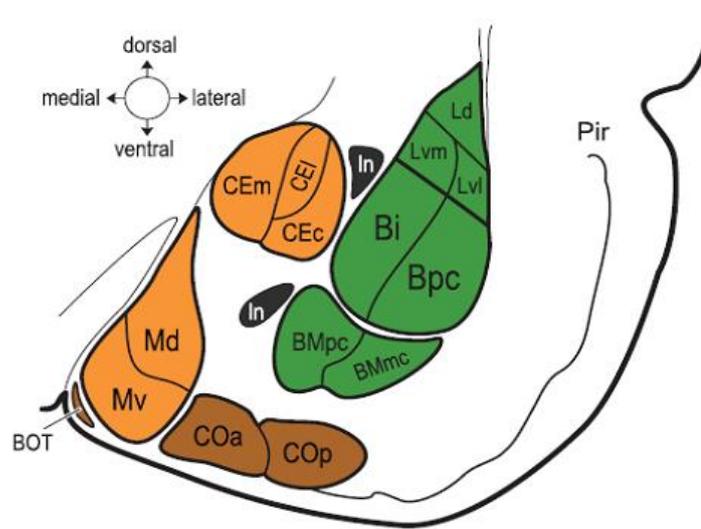


Figura 7 : Divisões nucleares e subdivisões da amígdala de ratos. Os núcleos da amígdala são divididos em três grupos: o centromedial (laranja), profunda ou basolateral (verde), e cortical (marrom). Em cinza escuro os núcleos intercalados (IN) são indicados. CEC, núcleo central, capsular subdivisão; CEL, núcleo central, subdivisão lateral; CEM, núcleo central, subdivisão medial; COa , núcleo cortical , subdivisão anterior; COp, núcleo cortical, subdivisão posterior; BOT , núcleo do trato olfativo ; Bi , núcleo basal , subdivisão intermediário ; Bpc , núcleo basal , subdivisão parvocelular ; CMMO , núcleo basomedial, subdivisão magnocelular ; BMPC , núcleo basomedial , subdivisão parvocelular, Ld , núcleo lateral, subdivisão dorsal; LVM, núcleo lateral, subdivisão ventromedial; Lvl , núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md , núcleo medial, subdivisão dorsal; Mv, núcleo medial , subdivisão ventral ; In, núcleos intercalados ; Pir , córtex piriforme. Para simplificar o diagrama, mais rostralmente localizou a subdivisão magnocelular do núcleo basal e subdivisão rostral do núcleo medial, bem como caudalmente localizou a área amígdala-hipocampal, não demonstrado (Knapska e cols., 2007)

Para fins didáticos, e melhor compreensão e localização do leitor, adotaremos duas subdivisões da amígdala: uma envolvendo a amígdala central (CeA) (núcleo central) e a outra, a amígdala basolateral (BLA) (lateral, basal e núcleos basais acessórios).

A amígdala é considerada uma importante estrutura na mediação das emoções, tais como ansiedade e o estresse. Ablação bilateral das amígdalas em primatas promove embotamento emocional (WEISKRANTZ, 1956). Em humanos, lesões das amígdalas

provocam efeitos calmantes enquanto que estímulos elétricos são capazes de evocar respostas de medo e confusão mental (FEINDEL & GLOOR, 1954; NARABAYASHI e cols., 1963).

A BLA é identificada como um sítio onde mecanismos GABAérgicos desempenham um papel importante na função da regulação cardiovascular e comportamental. Ademais, estudos sugerem a BLA sendo um importante centro de integração da informação sensorial de da memória, em resposta à ansiedade, e que a neurotransmissão de glutamato é crítica na regulação das respostas (Campeau & Davis, 1995).

Sendo assim, a amígdala está intimamente relacionada com a integração das respostas fisiológicas ao estresse, possuindo papel fundamental no controle da ansiedade (Paredes e cols., 2000).

Está bastante claro que a BLA está envolvida em emoções negativas e positivas, bem como aprendizado espacial e motor. A BLA recebe informações oriundas do tálamo, hipocampo e córtex, e então ativa ou modula transmissão sináptica em áreas alvo apropriadas, para um sinal de reforço com a qual a informação sensorial foi associada (Davis & Whalen, 2001). Lesões da BLA tem mostrado efeitos ansiolíticos em testes de conflito em modelos animais de ansiedade (Shibata e cols., 1989). Em adição, ações anti-conflito foram produzidas de maneira dose dependente após administração de benzodiazepínicos e barbitúricos (Shibata e cols., 1989). Microinjeções de mucimol, agonista do ácido γ -aminobutílico (GABA) também apresentam efeitos anti-conflitos, reduzindo aumento de frequência cardíaca (FC) e Pressão arterial média (PAM) em situações de estresse (Kubo e cols., 2004; Petersen e cols., 1985; Salome e cols., 2007). Em seres humanos a estimulação elétrica dessa região amigdalóide evoca sentimentos de medo e estágios de confusão mental (FEINDEL & PENFIELD, 1954).

Somando-se às citações anteriores, o bloqueio de receptores GABA na BLA em ratos acordados, promove elevação da FC e PAM, o que pode ser associado à uma situação de defesa (Sanders & Shekhar, 1995b; Sanders e cols., 1995; Sanders & Shekhar, 1995a). Observa-se, ainda, imediata estimulação cardiovascular após microinjeção de antagonista GABA bicuculina na BLA (Sanders & Shekhar, 1991). A figura 8 exemplifica as conexões da BLA resumindo algumas estruturas alvo e suas funções.

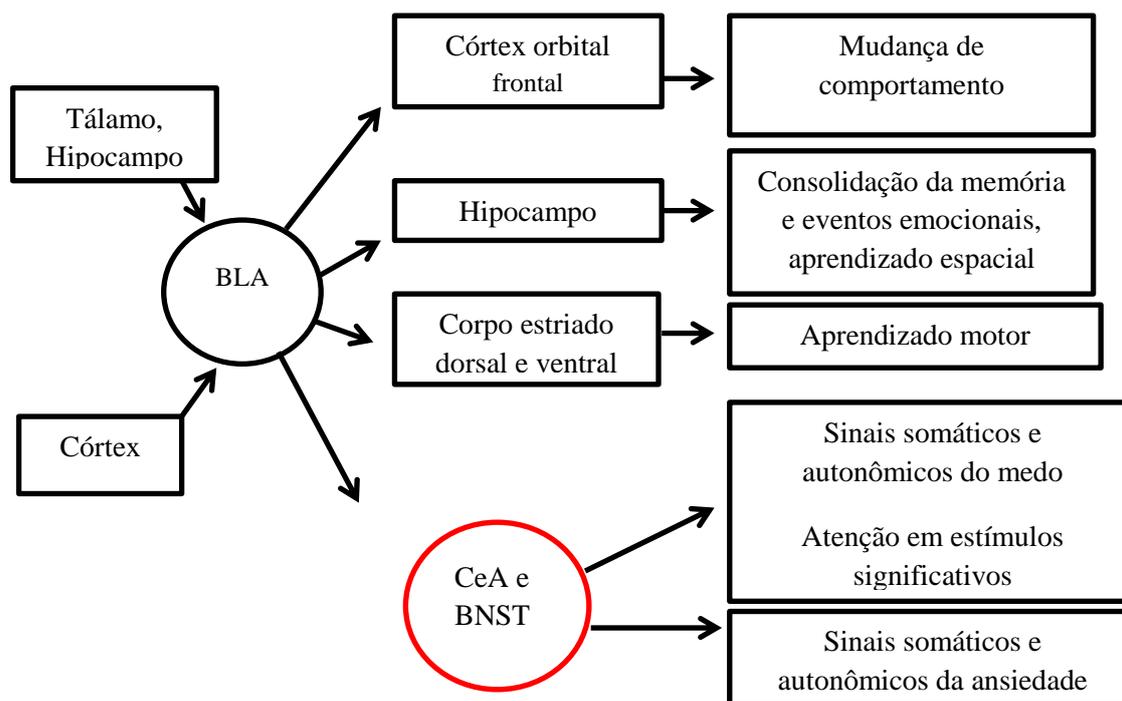


Figura 8: Diagrama esquemático das conexões da BLA para várias estruturas alvo, e possíveis funções dessas conexões.

Grande parte da literatura, sobre a amígdala envolve análise do papel da CeA usando várias medidas de medo, principalmente em roedores. As técnicas têm incluído lesões mecânicas quanto químicas, eletroestimulações e infusões de várias substâncias (Davis & Whalen, 2001).

Anatomicamente, a CeA e também o BNST estão situados para mediar vários componentes da resposta ao medo. Ambas as estruturas apresentam projeções neuronais para áreas como Hipotálamo, o qual está envolvido na ativação do sistema nervoso simpático durante situações de medo e ansiedade (Davis & Whalen, 2001; LeDoux e cols., 1988b). Projeções diretas do núcleo dorsal do vago, núcleo do trato solitário e porção ventrolateral da medula podem estar envolvidas no complexo da amígdala lateral estendida que engloba CeA e BNST modulando a PAM e FC.

É descrito na literatura que eletroestimulações, produziram um gradual aumento da PAM e frequência respiratória (FR), bem como produzem respostas comportamentais afetivas. A administração *in situ* na CeA de antagonista GABA, também induz forte redução da PAM e FC. Já a lesão eletrolítica da CeA, induz aumento consistente da PAM

através de ciclo claro/escuro mostrando que a CeA exerce papel bidirecional sobre o controle cardiovascular. (Yamanaka e cols., 2017a).

Assim, tomados em conjunto, esses achados apontam para a relevância em compreender a participação da CeA, dos estrogênios e seus receptores, haja vista que a literatura atribuí diferentes participações dos dois subtipos de receptores $Er-\alpha$ e $ER-\beta$, na modulação de estados de ansiedade e estresse, tornando justificável o estudo de quais mecanismos e vias estão associados à função neuroprotetora estrogênica em situações de estresse, integradas a distúrbios autonômicos cardiovasculares. Além disso, por tratar-se de uma das regiões integradoras das respostas produzidas durante diversas situações de estresse e considerando sua importância em processar informações de origem emocionais e aversivas (Hamann e cols., 1999), decidimos investigar a importância da CeA em situações de estresse por contenção/jato de ar em ratas *Wistar* castradas e não castradas em diferentes idades bem como a participação do estradiol mediando essas alterações.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Investigar a influência exercida pelo E_2 na CeA nas respostas autonômicas cardíacas em Ratas *Wistar* de diferentes idades submetidas a um protocolo de estresse por contenção/jato de ar.

2.2- Objetivos específicos

2.2.1- Avaliar o efeito da ativação dos receptores de estrógeno, localizados na CeA, sobre as respostas autonômicas cardíacas produzidas durante o estresse por contenção/jato de ar em ratas ovariectomizadas (OVX) em diferentes tempos após castração: 2 semanas; 2 meses e 8 meses.

2.2.2- Avaliar o efeito da microinjeção do agonista de receptor $ER-\beta$, localizados na CeA, sobre as respostas autonômicas cardíacas produzidas durante o estresse por contenção/jato de ar em ratas após 2 semanas de OVX.

2.2.3- Avaliar o efeito da ativação bilateral de receptores de estrógeno, através da microinjeção de E₂, na CeA, sobre testes comportamentais de labirinto em T elevado e campo aberto de ratas após duas semanas de OVX.

2.2.4- Avaliar o efeito da ativação bilateral de receptores de estrógeno, através da microinjeção de E₂, na CeA, sobre a atividade locomotora de ratas após duas semanas de OVX.

3- MATERIAIS E METODOS

3.1- Modelo animal

Ratas *Wistar* com idade aproximada de 80 dias, pesando entre 190 e 200 g, cedidas pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA. Os animais retirados do CCA foram levados para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Antes de iniciar os experimentos, os animais permaneceram dois dias no biotério de experimentação para ambientação, em gaiolas coletivas com dimensões de 41x34x17cm (5 animais/gaiola).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), através do protocolo número 2012/11 e posteriormente protocolo 2015/56. Todas as normas estabelecidas por esta comissão foram respeitadas, de forma a minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos. Além disso, o número de animais (n) de cada grupo foi reduzido ao máximo, sem comprometer a confiabilidade das análises estatísticas. Para tanto, sempre que possível cada rato foi utilizado como controle dele mesmo.

Os animais foram primeiramente divididos em três grupos experimentais: animais com 2 semanas; 2 meses e 8 após cirurgia de OVX.

Dentro de cada grupo estudado, houve a subdivisão em dois novos grupos; animais sham, com cirurgia fictícia que não sofreriam remoção ovariana e animais OVX, de acordo com o tempo de seu grupo.

Por fim, para os testes comportamentais mais dois grupos foram criados, OVX e sham, com duas semanas de OVX ou sham.

3.2- Drogas /soluções utilizadas

PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2): Solução preparada através da diluição de 8,18g de NaCl P.A., 1,98 g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,26 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH Brasil) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000,0 mL. O pH da solução foi ajustado para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação 120°C e 1,0 Kg/cm² durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Paraformaldeído 0,1M a 4%: Utilizado para perfusão transcardíaca e obtenção de material biológico para histologia. Em 450 ml de Água destilada aquecida num becker à 80°C acrescentou-se 40g de paraformaldeído em pó (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH Brasil), mantendo sob agitação e aquecimento constante. Acrescentou-se 2 ou 3 gotas de NaOH 1M, agitando, até obtenção de transparência na solução. Esta mistura foi adicionada à 500 ml de PB 0,1M, em uma proveta de 1000ml. O volume restante foi ajustado com água destilada.

Anestésico Inalatório: Isoflurano 100% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira São Paulo). Utilizado para indução e manutenção de anestesia geral. Utilizado durante a cateterização em uma taxa de 2-2,5% associado a 2l/min de O₂.

Anestésico Local – Cloridrato de Lidocaína 2%: Utilizado para realização da incisão ao longo da linha mediana do crânio para estereotaxia. Administrado através de injeção subcutânea de 0,4ml de cloridrato de lidocaína 2% (Rhobifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia-São Paulo) 19 associado à epinefrina, agente vasoconstrictor, evitando sangramentos e facilitar a exposição do crânio do animal.

Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina) *: dose (ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; i.m.). Solução preparada pela adição de 3 ml de Xilazina (Dopaser – Solução Injetável, Produto Importado: Laboratórios Caller AS Barcelona Espanha) 3% (p/v) a 10 mL de Cetamina (Cloridrato de Cetamina 10% - Proprietário: Syntec do Brasil Ltda, Fabricante: Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda, Hortolândia São Paulo) 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (Cetamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; IP.).

Estradiol (0,5pmol) no volume de 100 nL, (Gingerich & Krukoff, 2006).

2,3-bis (4-hydroxy-phenyl) 100 nL (0,5 pmol) propionitrile, agonista seletivo de receptores RE- β .

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário)*: (Fortecilin Pequeno Porte, Penicilinas + Estreptomicina-Laboratório Bio-Vet S/A) Utilizado no tratamento pós-operatório dos animais na prevenção de infecções, na seguinte dose: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; i.m)

Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]*: (Ketoflex 1%, Antiinflamatório à base de Cetoprofeno - Mundo Animal Veterinário Ltda.) Utilizado no tratamento pós-operatório dos animais, com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado da seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; s.c).

Sacarose 20%: Para crioproteção dos cérebros e posterior processamento no criostato, foi preparada uma solução de sacarose 20%. Colocou-se 20g de sacarose em uma proveta de 100 ml; o volume foi completado com PBS 0,1M e, em seguida, manteve-se a agitação da solução, até a completa dissolução da sacarose. A solução foi armazenada em geladeira a 4°C.

Salina Heparinizada: Administrada após cateterização femoral objetivando inibir formação de trombos no interior do cateter e regiões vasculares próximas. Para isso, foi utilizada a preparação 25ml de PBS 0,9% filtrado e 0,625ml de heparina pura 500UI (Parinex, Heparina sódica uso intravenoso – Hipolabor). A Heparina foi colocada em um balão volumétrico e completou-se o volume para 25 ml com o PBS; a solução foi distribuída em vidros e armazenada em geladeira.

Solução de gelatina: Todas as lâminas utilizadas na histologia foram pré-lavadas e gelatinizadas. Para isso foi preparada uma solução contendo 500 ml de água destilada e 2,5g de gelatina de pele bovina tipo B (SIGMA-ALDRICH, Referência do produto: G9382-500, Número de lote: 097K0108). Para o preparo, a água destilada foi aquecida a

70°C e agitada no Biomixer 78HW-1, e a gelatina foi adicionada aos poucos. Após completa dissolução, a mesma foi mantida na geladeira a 4°C.

3.3- PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1- Ovariectomia (OVX)

Ratas com aproximadamente 80 dias de vida e entre 190 a 200g, foram anestesiadas com Ketamina [0,1ml/100g de peso, via intraperitoneal (i.p.), (Vetbrands, São Paulo, Brasil)] e Xilazina [0,02ml/100g de peso, via (i.p.) (Agener União, São Paulo, Brasil)] na concentração (Ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg). Os flancos direito e esquerdo foram tricotomizados e assepsiados. Com o animal em decúbito lateral, fez-se uma pequena incisão (1-2 cm) através da pele e musculatura lateral do abdome, entre o bordo superior da coxa e a última costela, possibilitando acesso à cavidade abdominal. Através dessa incisão, o ovário foi identificado e exteriorizado e um ponto de ligadura das tubas uterinas e artérias ováricas foram feitos, com objetivo evitar sangramentos excessivos. Em seguida efetuou-se remoção dos ovários. As tubas uterinas foram reposicionadas dentro do abdome e realizamos as suturas da camada muscular, tela subcutânea e pele. Para os animais sham, os ovários foram apenas identificados e exteriorizados e em seguida reposicionados. Os animais foram transferidos para uma gaiola individual sobre uma manta térmica para minimizar os efeitos hipotérmicos provocados pelo anestésico.

Após o procedimento cirúrgico os animais permaneceram em gaiolas individuais até completa recuperação. Recuperadas, estas foram novamente reagrupadas em caixas coletivas.

3.3.2- Estereotaxia

Ratas sob anestesia (80 mg/Kg de Ketamina e 7mg/Kg de Xilazina i.p.), foram posicionadas em um estereotáxico para realização dos implantes de cânulas guia (15 mm), direcionadas à amígdala central (CeA) usando coordenadas estereotáxicas de acordo com o Atlas de Paxinos (Fontes D., 2009; PAXINOS & WATSON, 1986).

Após tricotomia e assepsia local, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente três centímetros (3 cm) na pele sobre o vértice craniano, expondo o crânio do animal, de maneira que pudesse ser facilmente identificada as suturas (suturas sagital e coronal) e o ponto de mensuração utilizado como parâmetro (bregma).

Para a realização do implante foram seguidas as seguintes coordenadas segundo (PAXINOS & WATSON, 1986):

- Barra dental: 3,3 mm abaixo da linha interaural
- Antero-posterior: 2,4 – 2,6 mm (ajustes de acordo com a idade e tamanho do animal)
- Dorso-ventral: 7,1 mm
- Latero-lateral: 4,1mm

Estabelecidas as medidas estereotáxicas, com um lápis grafite, procedemos a marcação no crânio do animal dos pontos a serem trepanados para passagem das cânulas guias direcionadas à CeA e parafusos para contenção do acrílico, utilizado para confecção do capacete responsável por manter as cânulas imóveis.

3.3.3- Cateterização femoral

Nas preparações dos cateteres destinados ao implante femoral foram utilizados tubos de Polietileno PE-50 (Clai Adams, Parsipanny, NJ, EUA), soldados a tubos de polietileno PE-10 (mesmo fabricante), com dimensões ajustadas de acordo com o tamanho do animal. Antes do procedimento de implante, as cânulas foram lavadas com solução de salina e preenchidas com solução de salina + heparina (125 U.I.), para evitar a formação de trombos no interior das cânulas os quais poderiam prejudicar o sinal de registro. A extremidade livre do PE-50 foi obstruída com um pino de metal. Terminado o preparo das cânulas, os animais foram anestesiados com isoflurano (na proporção de 2 a 2,5%/2L de O₂, por via aérea). A região inguinal e femoral do animal foram tricotomizadas e assepsiadas. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o triângulo femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral. Feita a identificação, a artéria femoral fora tensionada com auxílio de dois fios em suas extremidades. Seguente ao tensionamento, fazendo uso de uma pequena tesoura oftálmica, procedemos a uma pequena secção na artéria através da qual a cânula foi

implantada até alcançar a aorta abdominal (aproximadamente 4 cm). Em seguida, a cânula foi exteriorizada no dorso do animal com auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter), para permitir o registro e a administração de drogas com livre movimento. Terminado o procedimento os locais de incisão foram suturados.

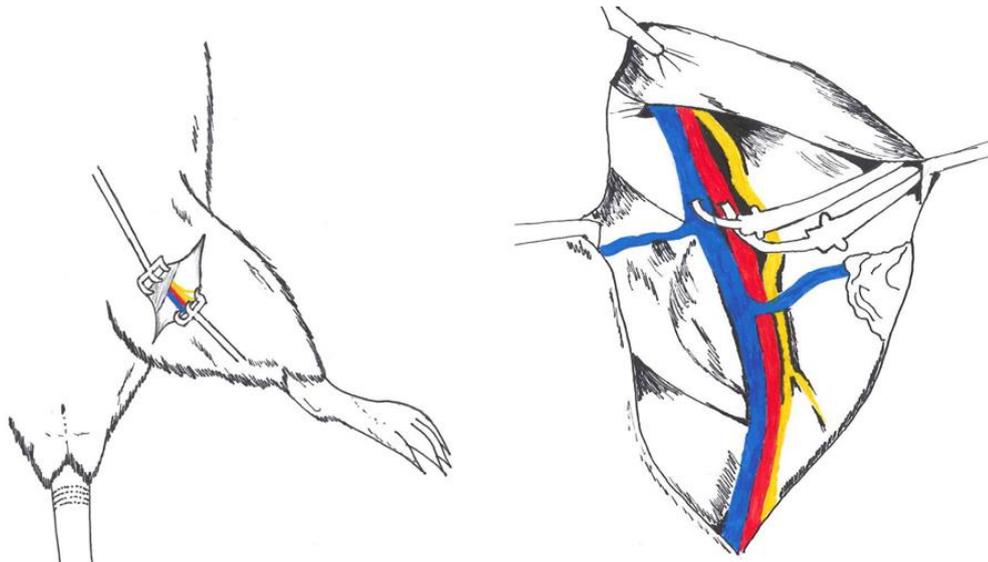


Figura 9: Imagem esquemática de um procedimento de implante de cateteres femorais (Fortes, 2010)

3.4- Protocolo de aquisição dos sinais fisiológicos

Dados obtidos dois dias após cateterização dos animais (figura 10). Após instrumentação, os animais passaram por um período de estabilização durante 2 horas. Para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0699) ligado a um amplificador blindado ETH-400 conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400. A comunicação de dados entre o PowerLab/400 e o PC se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI no computador. Acompanha o PowerLab o software Chart for Windows 7 o qual processa os dados provenientes do PowerLab 400 e gera os registros de PAP e FC. Este registro pode ser processado a posterior (offline) ou concomitantemente ao registro (online) de forma a se obter os dados de FC, PAM e outros mais requeridos. É importante ressaltar que, os experimentos de registro só tiveram início decorrido o período de estabilização

de 2 horas, e somente com parâmetros registrados estáveis tiveram início os testes. Cada experimento teve duração aproximada de 90 minutos, sendo a frequência de amostragem de 200Hz. Nesta frequência é possível avaliar de maneira precisa todos os parâmetros registrados.

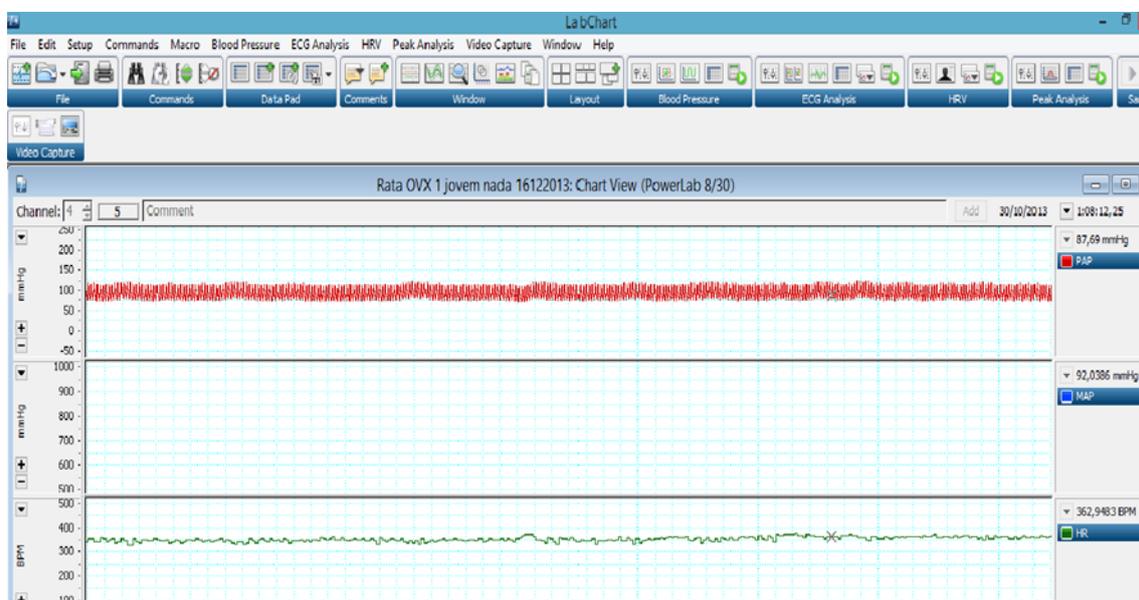


Figura 10: Figura ilustrativa de uma janela de aquisição de sinal do Labchart 7.0 . Em vermelho pressão PAM em mmHg e em verde FC em batimentos por minuto (BPM).

As aquisições dos dados fisiológicos foram obtidas através dos registros em três dias consecutivos, onde no primeiro dia foi feito tratamento com 100 nl de salina como controle para E₂ ou veículo (ciclodextrina) para controle de DPN. No segundo dia foi realizado o tratamento com 100 nl (0,5 pmol) de estradiol ou DPN e no terceiro e último dia, procedia-se o registro normal sem tratamento com qualquer substância.

3.5- Constatação do ciclo estral

A determinação da ciclicidade foi realizada por meio de um esfregaço vaginal. Para efetuar a coleta do material, fizemos o uso de uma pipeta automática de 20µl e solução salina. Foram introduzidos 20 µl da solução salina na vagina do animal e realizada aspiração do conteúdo em movimento de lavagem. Após a coleta, o material foi transferido para lâminas histológicas e espalhados sobre sua superfície com auxílio da ponteira. Para coloração das lâminas obtidas, quando necessário, foi utilizada a técnica de coloração hematoxilina eosina (HE). O ciclo estral das ratas foram determinados

usando o esfregaço e sendo fundamentado na análise do tipo e quantidade de células descamadas, do índice acidófilo, da infiltração de leucócitos e da presença de muco (Marcondes e cols., 2002).

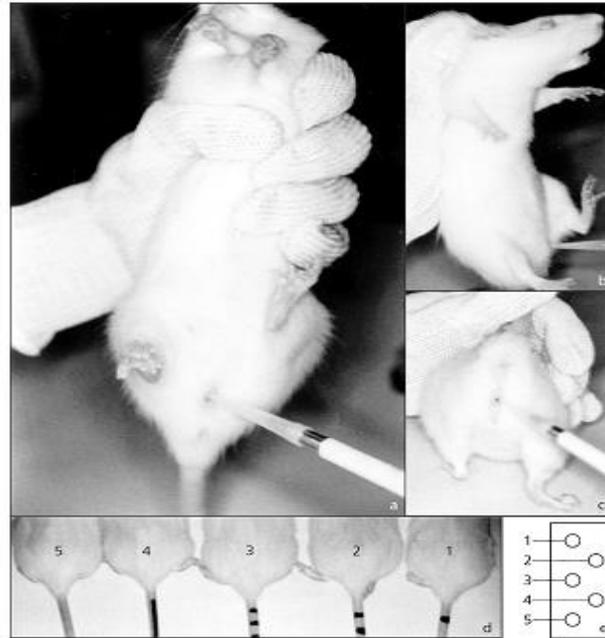


Figura 11: Imagem representativa da metodologia adotada para coleta de secreção vaginal utilizada pra confecção dos esfregaços. (a,b,c) com auxílio de uma pipeta de 20 µl preenchida com salina (NaCL 0,9%), a qual foi injetada dentro do canal vaginal e em seguida aspirado. (d) marcação na cauda dos animais para identificação de cada um durante todo o experimento. (e) lâminas confeccionadas da secreção aspirada e analisadas em microscópio ótico na objetiva de 40x (Marcondes e cols., 2002)

3.6- Procedimento de estresse

Realizado através da inserção dos animais em um tubo de contenção de acrílico e o posicionamento de uma bomba de nebulização ao lado do tubo contensor (Figura 12). Tal bomba é capaz de produzir um jato de ar de 4 l/min e, além disso, produzir ruído. Essa foi posicionada próxima ao tubo, pois o ruído produzido exacerba as respostas fisiológicas ao estresse de contenção. Entretanto, o jato de ar não foi direcionado diretamente para o rato, pois já foi demonstrado que pode causar uma pequena hipotermia

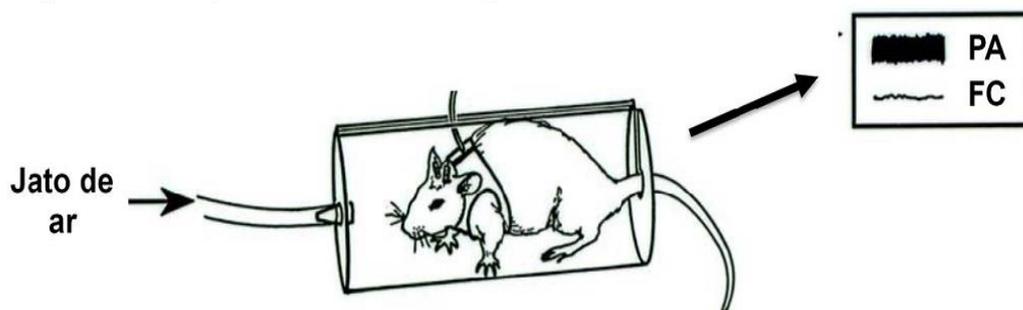


Figura 12: Modelo esquemático: estresse por contensão e jato de ar.

(observações não publicadas). Os animais permaneceram no tubo por 15 minutos (Abreu e cols., 2014).

3.7- Testes comportamentais

3.7.1- Labirinto em T elevado (LTE)

O LTE utilizado (figura 13) possui uma base de 50 cm de altura sendo constituído por três braços de dimensões iguais (50 cm x 12 cm) de madeira revestida por uma chapa de compensado branca. Um dos braços é fechado por paredes de 40cm de altura e outros dois são abertos e perpendiculares a este. Os braços abertos apresentam bordas de acrílico transparente de um centímetro (1 cm) como pode ser observado na foto ilustrativa da figura 9. Este modelo deriva do labirinto em cruz elevado e é baseado no medo inato que os animais possuem de locais elevados e desprotegidos (MONTGOMERY & MONKMAN, 1955). Contudo, o LTE permite analisar, separadamente, as respostas de esquiva inibitória e fuga em um mesmo animal, diferentemente do observado no labirinto em cruz elevado (Graeff e cols., 1993).

Tal teste diferentemente do teste em cruz elevado permite o estudo de dois tipos de comportamento negativamente motivados:

- a) a esquiva inibitória, medida através da latência que o animal, colocado no braço fechado, leva para alcançar um dos braços abertos.
- b) a fuga, considerada o tempo que o animal, colocado na extremidade de um dos braços abertos leva para alcançar o braço fechado. Os autores do teste afirmam que essas duas medidas podem estar relacionadas a dois tipos diferentes de medo: o medo condicionado e o medo inato, respectivamente.

Transpostos para a condição de ansiedade avaliada na clínica, o medo condicionado estaria relacionado ao transtorno de ansiedade generalizada, enquanto que o medo inato estaria relacionado ao transtorno do pânico. Assim, drogas com perfis mais seletivos de ação para cada um desses transtornos agiriam de maneira diferente em cada uma dessas medidas.

Para realização dos testes de esquiva inibitória, 24 horas antes do experimento, o animal é exposto em um teste de habituação, por 30 minutos ao aparato. Passados 24 horas dessa pré-exposição, o animal foi colocado por três vezes consecutivas no final do braço fechado, e foi verificado o tempo que se levou para sair com as quatro patas, deste braço, em cada tentativa.

Para testar a fuga, o animal foi colocado por três vezes consecutivas na extremidade distal do braço aberto e a latência para sair com as quatro patas deste braço foi verificada.



Figura 13: LTE (Insight[®]) utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga.

3.7.2- Campo Aberto (CA)

O CA consiste em uma arena retangular de plástico, medindo 72 cm x 72 cm e paredes de 23 cm de altura. A base do CA foi subdividida em 16 retângulos (18 cm x 18 cm).

Para a análise do CA foi utilizado IMAGE J, programa de processamento de imagem Java de código aberto. Instalado junto ao IMAGE J um plugin, o Animal Tracker, aplicativo de rastreamento universal projetado especificamente para suportar a análise comportamental em animais. Tal análise nos fornece rota demarca do animal, distância percorrida, tempo e tempo em que o animal permaneceu parado como pode ser observado na ilustração de número 14.

Para análise utilizou-se vídeos no formato AVI, 680 x 420 pixel de tamanho com 25 quadros (frames) por segundo. O intervalo de tempo entre os quadros foi definido, no caso de 25 frames, em $1/25 = 0,040$. Para determinar o tempo que o animal permaneceu parado, considerou-se quando este cobria uma distância (em pixel) menor do que o valor definido dentro de um determinado número de quadros. Foi considerado como imóvel um animal que se movimentou menos que 10 pixels por 25 quadros, como pode ser evidenciado na figura de número 14.

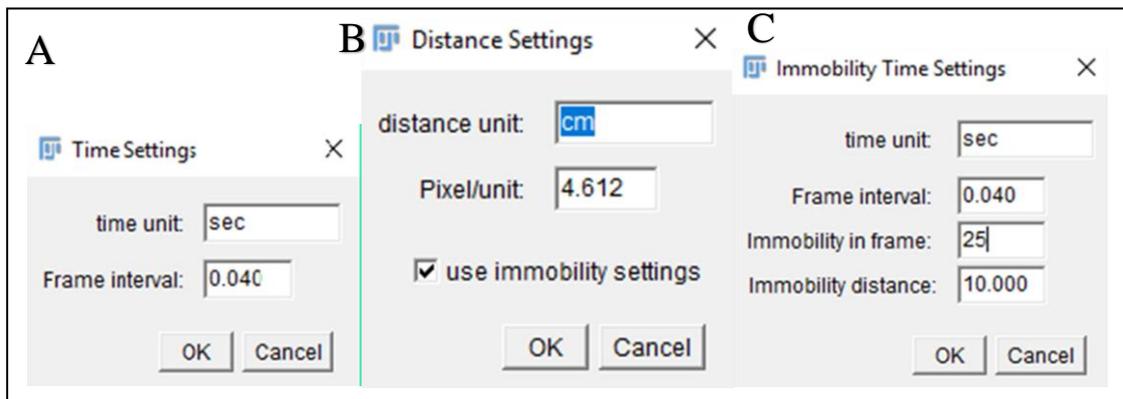


Figura 14: Exemplo das janelas de configurações do plugin Animal Tracker para; (A), tempo, (B), distância e (C), imobilidade.

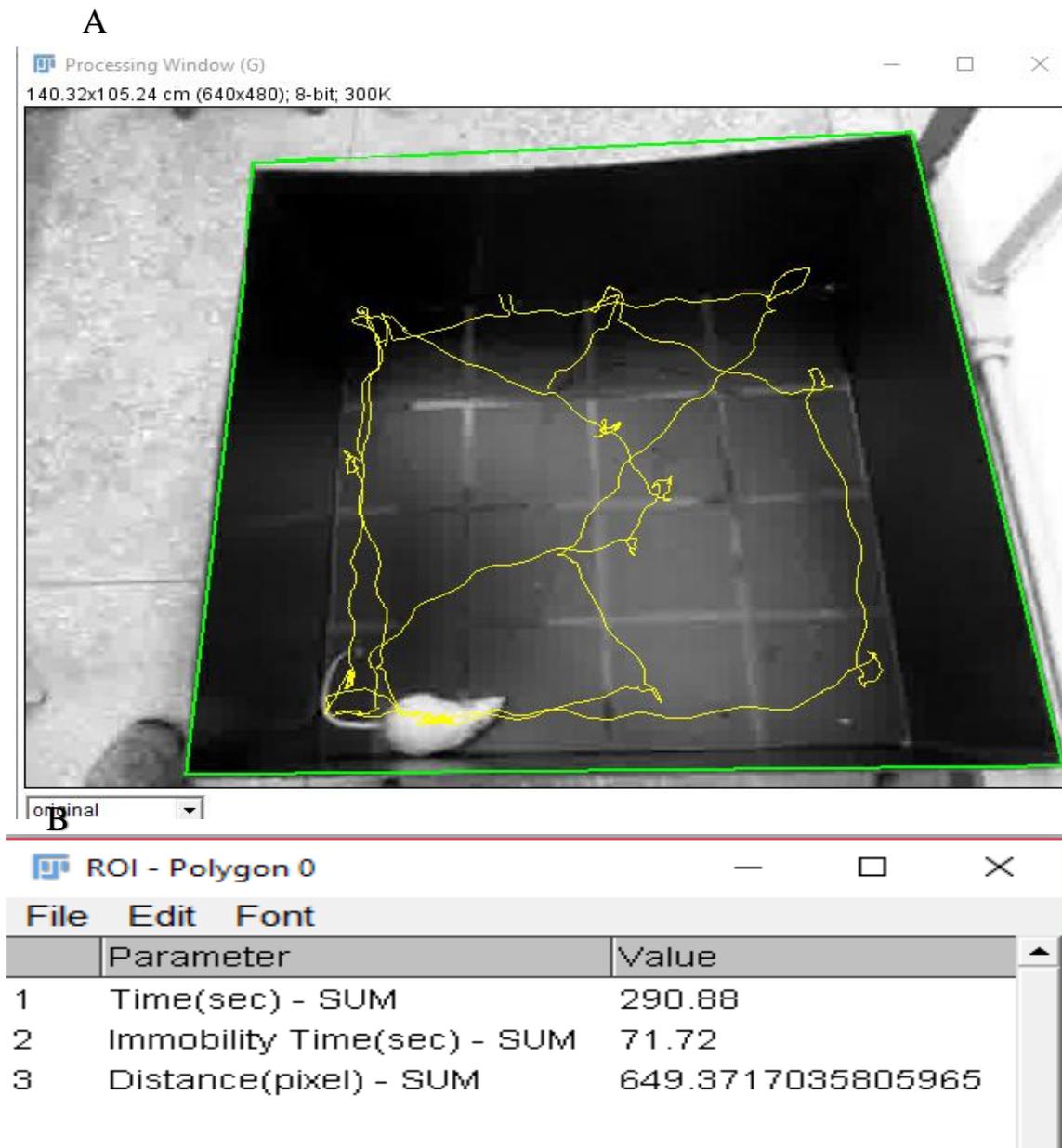


Figura 15: Figura ilustrativa da janela de análise do programa IMAGE J (A) mapa de deslocamento do animal através do campo aberto e em (B) parâmetros analisados na janela de análise do programa.

3.8.3- Histologia

Terminado os registros, os animais foram anestesiados com coquetel Ketamina/Xilazina (volume 0,2mL/100g de animal, I.P.). Em seguida, foram submetidos a uma toracotomia e identificação das câmaras cardíacas. Um cateter foi atravessado pelo ventrículo esquerdo atingindo a artéria aorta ascendente. Procedeu-se a perfusão com solução salina (0,9%), seguida de solução de paraformaldeído (0,4%). Terminado o procedimento, os encéfalos foram retirados e fixados em solução de formaldeído

tamponado 10% por 48 horas. Após 48 horas, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% por 24 horas e então congelados. Posteriormente os encéfalos foram seccionados transversalmente em fatias de 40 μm de espessura com o auxílio de um Criostato (Leica CM 1850, Alemanha). Os cortes histológicos foram corados em Vermelho Neutro para posterior visualização em microscópio óptico. Apenas animais com sítios de injeção confirmados pela microscopia óptica foram incluídos nos resultados.

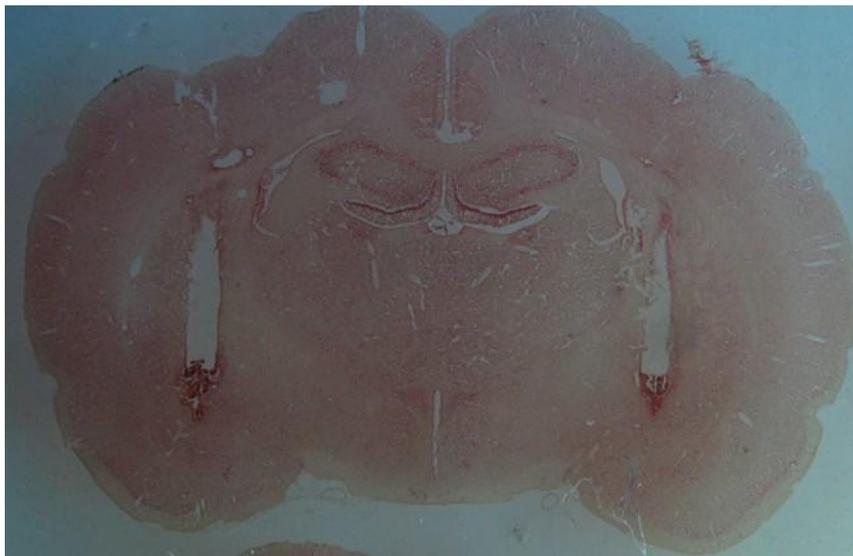


Figura 16: Fotomicrografia de um corte coronal de 40 μm do encéfalo de rato, representativa dos locais típicos de microinjeção na CeA, bregma de -1,56mm.

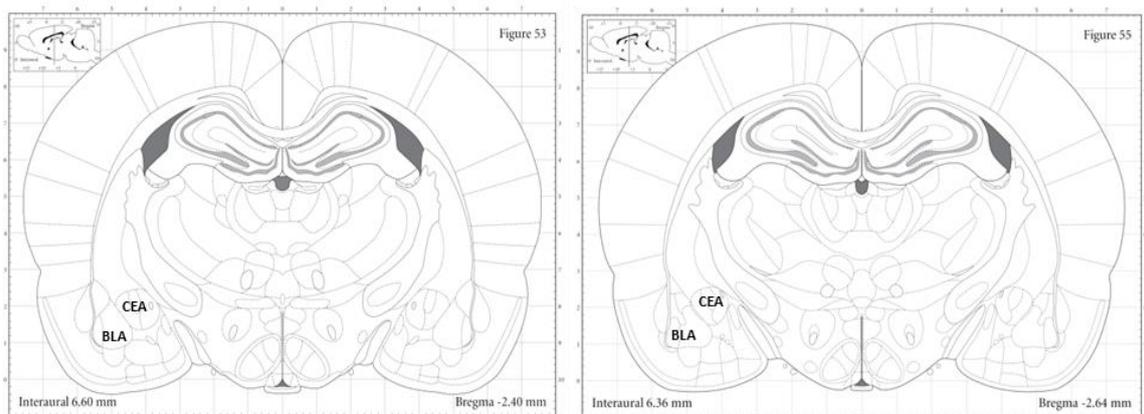


Figura 17: Esquema dos cortes coronais do encéfalo de ratos adaptado do atlas de (Paxinos & Watson, 2007) ilustrando local de posicionamento da amígdala central (CeA) em um corte coronal do cérebro de rato a -2,64mm antero posterior do bregma e a 4,1mm latero lateral. Distâncias de -1,56mm a -3mm do bregma, foram analisadas cuidadosamente. Os números na figura indicam a distância do bregma em milímetros.

3.9- Análises estatísticas

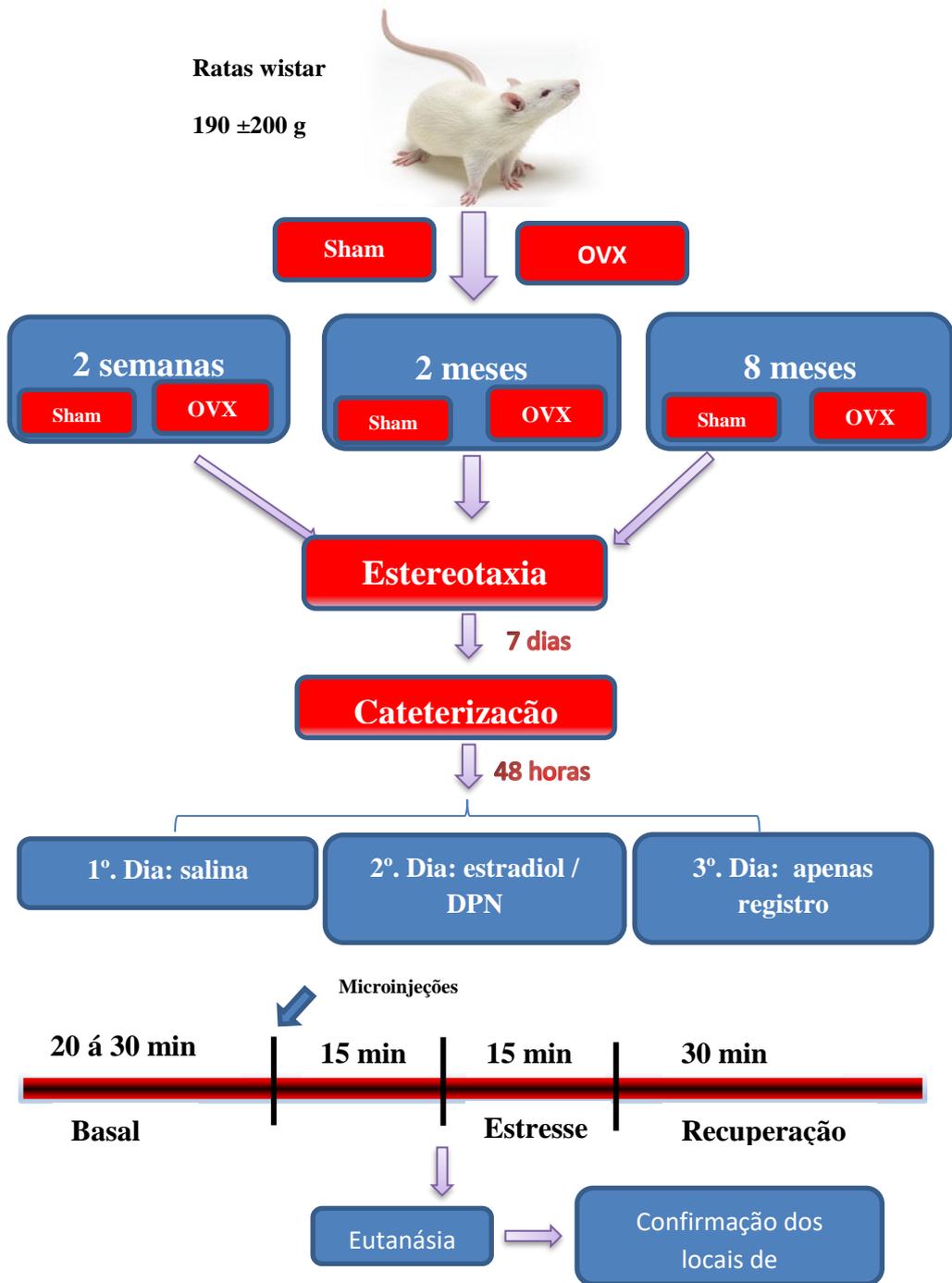
Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias (EPM) e o nível de significância adotado foi de 5 % valores de $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Inc.) foi usado para realização das análises.

Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para determinar se eram dados paramétricos ou não para utilização do teste *t-Student*. Quando necessário foi realizado teste *t-Student* não pareado.

Teste de variância ANOVA *one way* foi devidamente aplicado para análise das médias sob uma variável seguida de pós teste de *Tukey*.

Teste de variância ANOVA *two way* foi devidamente aplicado para análise das médias sob duas variáveis, seguido de pós teste de *Bonferroni*.

Para as análises dos períodos correspondentes à PAM e FC, cada trecho referente ao basal, microinjeções, estresse e recuperação foram analisados de maneira independente para minimizar interferências estatísticas.



Para os testes de comportamento, após 2 semanas de OVX ou Sham:



Figura 18: Fluxograma dos experimentos realizados nesse trabalho.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito da OVX sobre o ganho de peso dos animais

Todos os animais submetidos ao protocolo cirúrgico de ooforectomia sobreviveram. A figura 19 mostra que o procedimento de castração induziu o ganho de peso dos animais nos grupos estudados. Os animais do grupo Sham 2 semanas ganharam 12,85 % de peso, enquanto que os animais do grupo OVX 2 semanas ganharam 31,85 %, sendo a diferença de ganho de peso entre esses dois grupos de 149% ($t=19,46$; $p < 0,0001$).

Os animais pertencentes ao grupo Sham 2 meses mostraram ganho de peso de 18%, já os animais OVX 2 meses apresentaram 47% de ganho. Quando comparados, os animais OVX 2 meses mostraram 153% de ganho de peso em comparação aos animais Sham 2 meses ($t=16,35$; $p < 0,000137$).

Animais relativos ao grupo Sham 8 meses tiveram 48% de ganho de peso, em contrapartida os animais provenientes do grupo OVX 8 meses tiveram aumento de 82 % de seu peso. Quando comparados, animais do grupo OVX 8 meses expuseram 68% mais peso que os animais Sham 8 meses ($t=6,526$; $p < 0,0001$).

Tomados em conjunto, a privação hormonal procedente da ablação ovariana bilateral foi capaz de promover um desequilíbrio metabólico, elevando o peso corporal dos animais estudados. Observa-se que o aumento de peso é gradual proporcionalmente ao tempo de privação hormonal.

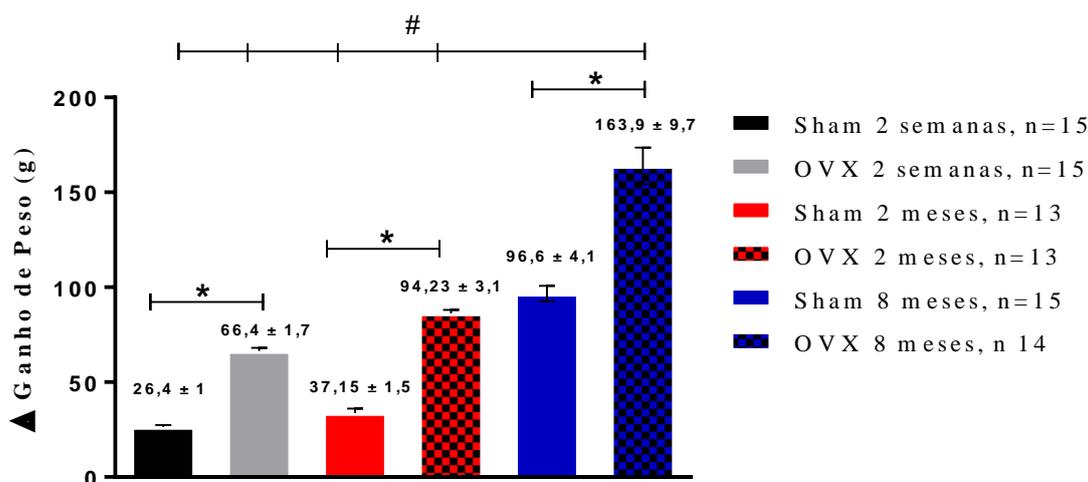


Figura 19: Efeito da OVX sobre o ganho de peso (g) dos animais. Valores numéricos sobre as barras mostram média ± EPM. * mostra diferença significativa entre os grupos,

teste *t-Student* para $p < 0,05$, e # grupo OVX 8 meses e os demais grupos, ANOVA *one way* seguido de pós teste de *Bonferroni*.

4.2- Efeito da OVX sobre o peso uterino dos animais

A figura 20 reproduz que a excisão bilateral dos ovários conferindo uma condição de hipoestrogenismo, promove atrofia uterina nos três grupos analisados. Para o grupo estudado duas semanas após OVX nota-se redução de 187% no peso relativo do útero por 100 g de peso do animal, evidenciando nas barras cinza e preta da figura 20 ($t=30,87$; $p < 0,0001$). O grupo estudado após dois meses de OVX também apresentou diminuição significativa dos valores de peso uterino por 100 g, totalizando 338% observado nas barras vermelha e vermelha quadriculada ($t=21,57$; $p < 0,0001$). Já os animais analisados 8 meses após OVX, os valores foram ainda mais reduzidos, perfazendo 1785%, vistos nas barras azul e azul quadriculada ($t=33,51$; $p < 0,0001$).

Importante ressaltar que o índice uterino funciona como parâmetro para avaliação de queda nos níveis plasmáticos de estradiol, visto que a musculatura uterina, bem como seus epitélios de revestimento dependem intimamente das influências hormonais para sua hipertrofia cíclica nos períodos reprodutivos.

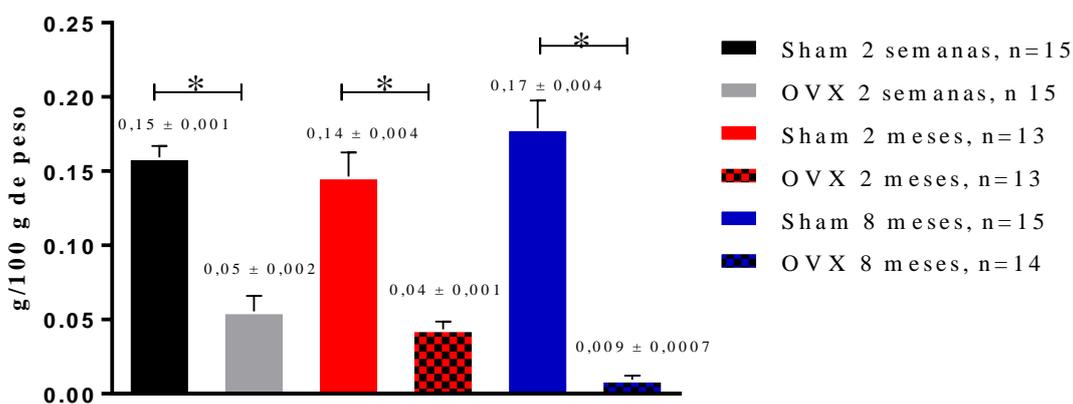


Figura 20: Efeito da OVX sobre o índice uterino em animais 2 semanas, 2 meses e 8 meses. Valores sobre as barras mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística pelo teste *t-Student* para $p < 0,05$.

Para facilitar a compreensão dos próximos dados, serão expostos primeiramente os resultados autonômicos referentes aos animais com 2 semanas castração seguidos dos

animais com 2 semanas de castração que receberam agonista para receptor-ER- β (DPN), posteriormente os animais com 2 meses de castração e por último os animais com 8 meses de castração. Ao final da exposição destes, serão expostos resultados comportamentais realizados com animais com 2 semanas de castração.

4.3- Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA do grupo Sham com 2 semanas de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e FC

Em primeira apreciação, demonstraremos as alterações autonômicas durante os três dias de experimentação ocorridas nos animais sham. Procedendo-se análise sobre os valores basais da PAM, o tratamento com de E₂ (0,5 pmol/100nl) promoveu reduções significativas nos valores basais 24 horas após administração de E₂, ao longo do tempo quando comparado ao dia que se administrou salina e E₂ visualizado na figura 21-A ($F_{(4, 32)} = 4,399$; $P = 0,0060$) nessas condições, observamos interação entre o tempo de registro e o dia de tratamento ($F_{(8, 64)} = 3,133$; $p = 0,0047$).

Percebe-se que os níveis pressóricos se mantêm inferiores por todo o registro 24h após microinjeção de E₂, demonstrado pela linha verde na figura 21-A. Os níveis de PAM para o dia que se administrou E₂ se mantiveram similares ao primeiro dia de experimento onde se administrou salina. Para o período referente ao estresse por contensão/jato de ar, os valores de PAM 24h após E₂ se mantiveram inferiores durante o tempo de registro ($F_{(4, 32)} = 4,577$; $p = 0,0049$) e para o fator tratamento ($F_{(2, 16)} = 4,292$; $p = 0,0322$), não mostrando interação entre o tempo de registro e dia de tratamento ($F_{(8, 64)} = 0,6513$; $p = 0,7317$).

Interessantemente, para o parâmetro de FC não observamos alterações no período basal ($F_{(2, 16)} = 2,192$; $p = 0,1441$). Porém, administração de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) promoveu maior resposta ao estresse por contensão/jato de ar tanto no dia de tratamento ($F_{(2, 16)} = 10,66$; $p = 0,0011$) quanto 24 horas após, comparados ao primeiro dia de experimento, onde foi microinjetado salina. Porém, não houve interação entre os fatores ($F_{(8, 64)} = 0,7905$; $p = 0,6128$) (figura 21-B).

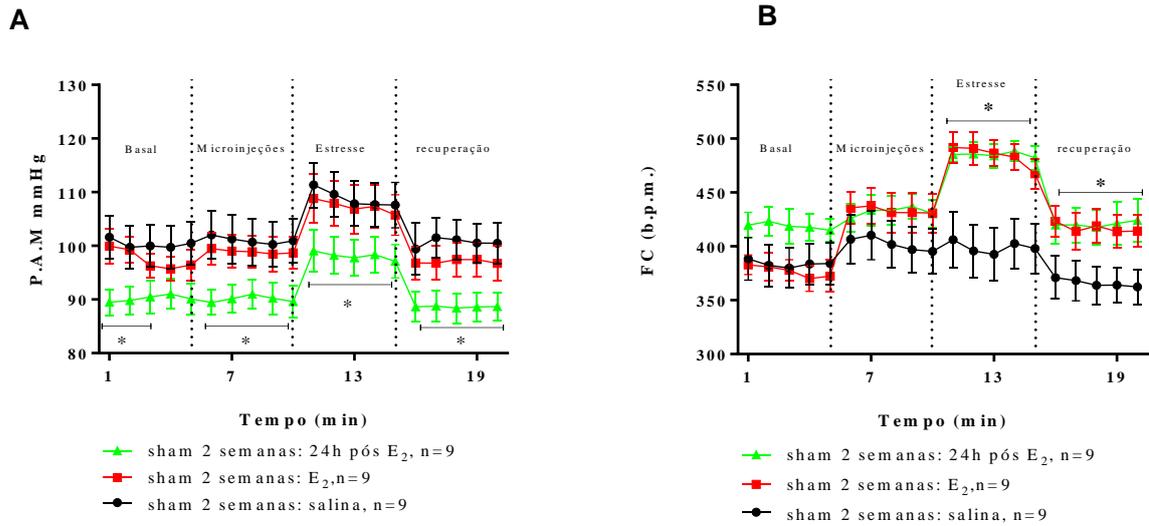


Figura 21: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA de ratas com 2 semanas de cirurgia sobre a PAM e FC durante os três dias de experimento. (A) mostra registros da PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde registro 24h pós E₂; (B) mostra registro da FC durante os três dias de experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores são mostrados em média ± EPM. * mostra diferença estatística pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

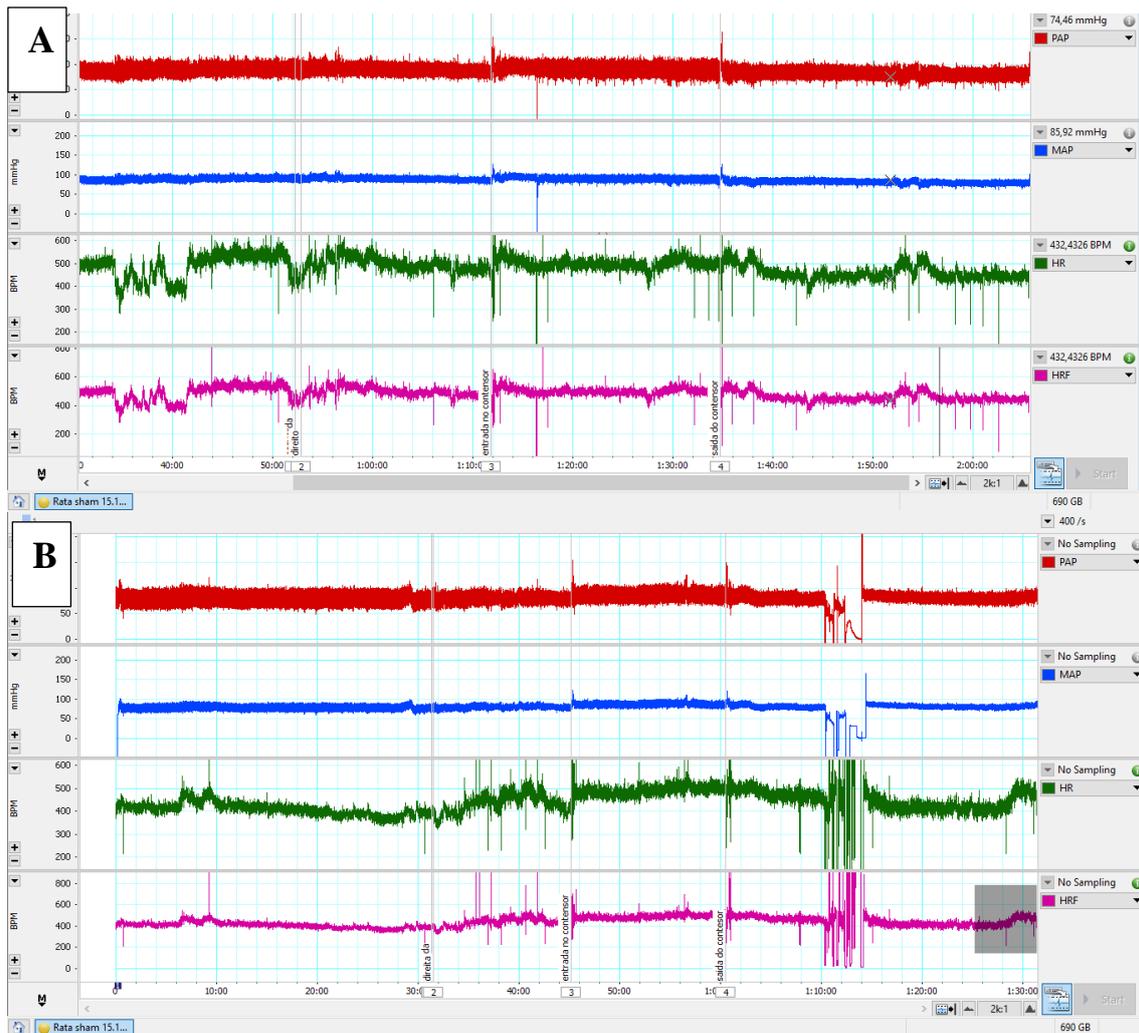


Figura 22: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC e quarto canal, em rosa, a análise dos ciclos de pulsos pressóricos e recontagem da FC.

4.4- Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA de ratas OVX com 2 semanas de castração sobre respostas autonômicas da PAM e a FC

De maneira similar ao observado nos animais do grupo sham, a figura 23-A mostra que o tratamento bilateral com de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) promoveu redução nos valores basais de PAM 24h após E₂ comparado ao tratamento com salina. Porém, também observamos reduções no dia de microinjeção com E₂ ($F_{(2, 16)} = 8,604$; $p = 0,0029$), mas

sem interação entre os fatores ($F_{(8, 64)} = 1,325$; $p = 0,2473$). Em resposta ao estresse, observamos respostas pressóricas inferiores no dia de microinjeção com E_2 quanto 24h após, tanto ao longo do tempo ($F_{(4, 32)} = 5,922$; $p = 0,0011$) quanto dia de tratamento ($F_{(2, 16)} = 4,974$; $p = 0,0209$) havendo interação entre os dois parâmetros ($F_{(8, 64)} = 4,935$; $p < 0,0001$).

Analisando os valores referentes a de FC na figura 23-B, evidenciamos valores basais reduzidos somente 24h após microinjeção com E_2 ($F_{(2, 16)} = 25,60$; $p < 0,0001$) sem interação entre os fatores ($F_{(8, 64)} = 0,5496$; $p = 0,8146$). Já em relação ao período de estresse percebemos maior responsividade tanto para o dia de microinjeção com E_2 quanto 24h após ($F_{(2, 16)} = 5,310$ $P = 0,0170$) sem interação entre os fatores ($F_{(8, 64)} = 1,029$; $p = 0,4235$).

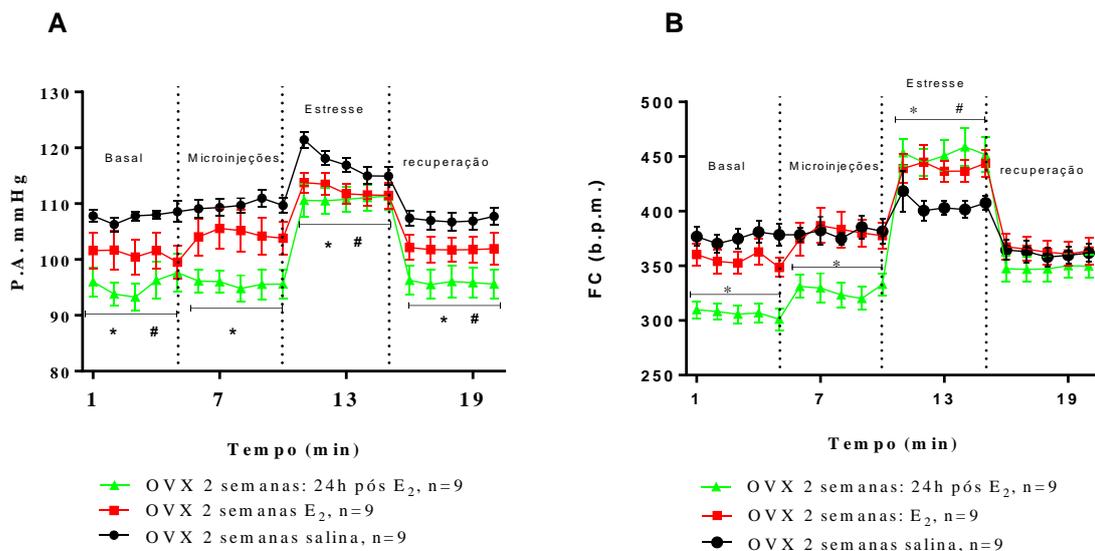


Figura 23: Efeito da microinjeção bilateral com 100 nl de E_2 (0,5 pmol) na CeA de ratas OVX com privação hormonal de 2 semanas sobre a PAM e FC durante os três dias de experimento. (A) mostra registros da PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E_2 e linha verde; registro 24h pós E_2 e (B) mostra registro da FC durante os três dias experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística entre o dia onde se administrou salina e 24h pós E_2 ; # mostra

diferença estatística entre o dia que se administrou E₂ e o dia que se administrou salina, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

Para melhor visualização a figura 24-A mostra alterações decorrentes da microinjeção *in situ* com E₂ na CeA sobre respostas autonômicas ao estresse. Procedemos a análise entre os deltas de variações da PAM e FC e evidenciamos que houveram maiores respostas ao estresse por contensão/jato de ar 24h pós E₂ ao longo do tempo de registro no grupo OVX, para os valores pressóricos ($F_{(3, 120)} = 12,22$; $p < 0,0001$) não havendo interação entre os parâmetros ($F_{(12, 128)} = 0,8677$; $p = 0,5813$). A análise da área sob a curva confirma nossos dados ($F_{(12, 120)} = 0,1342$; $p = 0,9998$).

Os valores das variações da FC mostraram-se significativamente mais responsivos no grupo OVX 24h após E₂ comparado ao grupo sham 24h após E₂ e dos demais grupos ($F_{(3, 120)} = 29,17$; $p < 0,0001$). Não houveram alterações observadas ao longo do tempo de registro de estresse ($F_{(4, 40)} = 0,2612$; $p = 0,9011$) nem interação entre os parâmetros ($F_{(12, 120)} = 0,2034$; $p = 0,9981$) (figura 24-B).

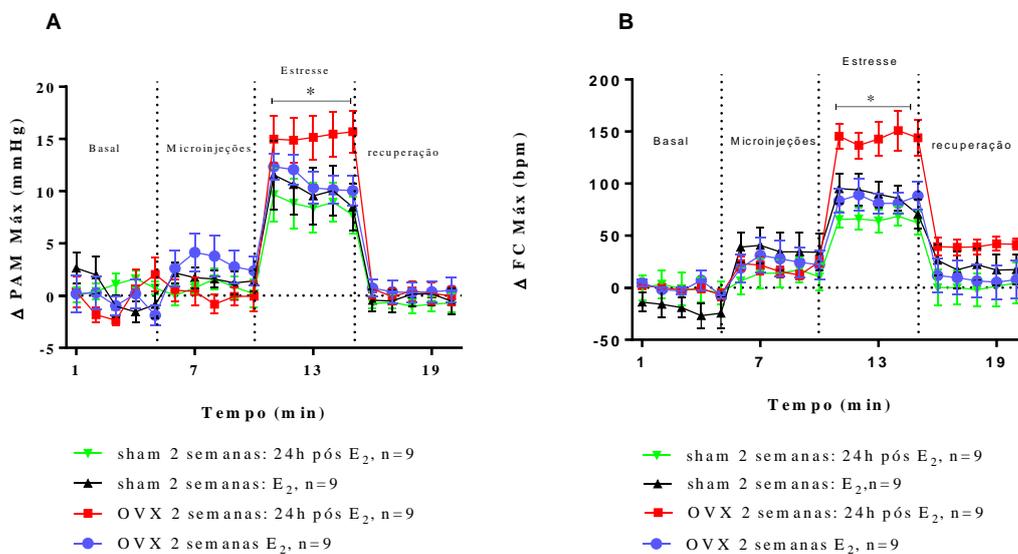


Figura 24: Comparação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 semanas e grupo OVX 2 semanas após tratamento bilateral com E₂ (0,5 pmol/100 nl) e decorridos 24h. Os dados são expressos em média \pm EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre OVX 24h pós E₂ e os demais grupos; em (B) * mostra diferença estatística entre OVX 24h após E₂ e os demais grupos, pelo teste ANOVA

two way seguido de pós teste de *Tukey*; área sob a curva ANOVA *one way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p \leq 0,05$.

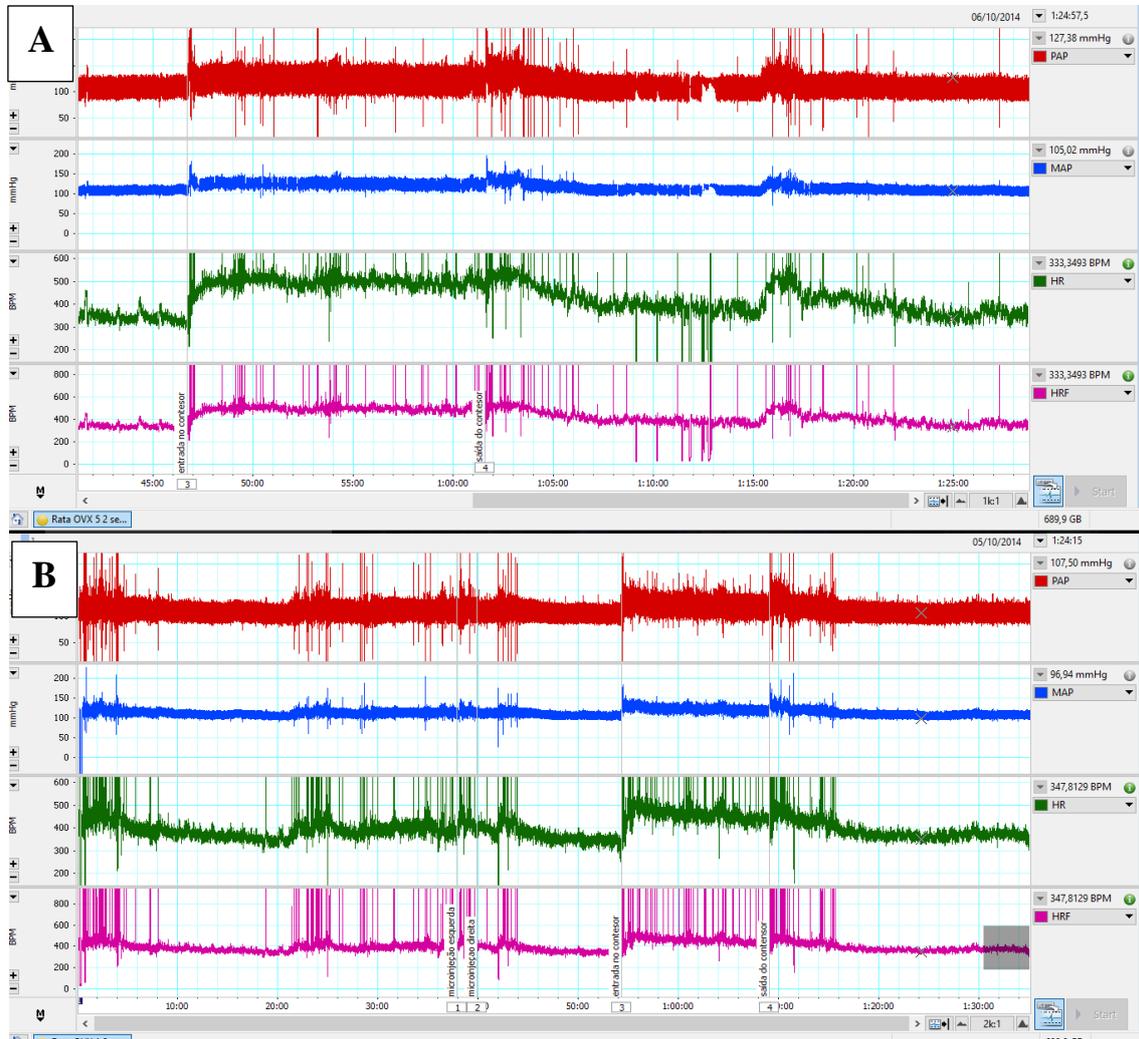


Figura 25: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E_2 (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E_2 . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.5- Efeito da microinjeção bilateral de agonista de receptor ER- β (DPN) (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sham com 2 semanas de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e FC.

Visando identificar qual receptor estaria envolvido em tais respostas autonômicas, administramos o mesmo volume e concentração de um agonista de receptor ER- β (DPN). Ao observar a figura 26-A, tomando-se como controle o dia de tratamento com salina, notamos houve redução dos valores de PAM no dia de administração de DPN ($F_{(2, 14)} = 7,425$; $p = 0,0063$) antes mesmo de sua administração. Porém, a microinjeção de DPN não promoveu alterações com 24h. Apesar das reduções observadas, quando comparamos ao dia de tratamento com salina, concluímos que o DPN não alterou as respostas dos períodos basais da PAM. Dados mostrados na figura 26-A.

Apesar de na figura 26-A observamos valores pressóricos ao estresse mais elevados no dia de microinjeção com veículo, tanto ao longo do tempo de registro ($F_{(4, 28)} = 3,810 = 4,313$; $p = 0,0135$) quanto referente ao dia de tratamento, em comparação ao dia de administração de E_2 e 24h após ($F_{(2, 14)} = 4,313$; $p = 0,0347$), ao analisarmos os valores reminiscentes aos deltas de variações, não observamos quaisquer diferenças entre os dias de microinjeções ($F_{(2, 14)} = 1,348$; $p = 0,2915$), ou interação entre os parâmetros ($F_{(8, 56)} = 0,8905$; $p = 0,5305$).

Já quando analisamos o período basal referente a FC (figura 26-B), não observamos alterações entre os dias de tratamento ($F_{(2, 14)} = 2,267$; $p = 0,1403$) nem interação entre os fatores ($F_{(8, 56)} = 0,4444$; $p = 0,8890$). Contudo em consideração ao período do registro referente ao estresse, percebemos valores mais elevados no dia 24h após E_2 comparado ao dia de tratamento com salina não se diferenciando do dia em que se microinjetou E_2 ($F_{(2, 14)} = 4,442$; $p = 0,0321$) e não interação entre os fatores ($F_{(8, 56)} = 0,5125$; $p = 0,8420$).

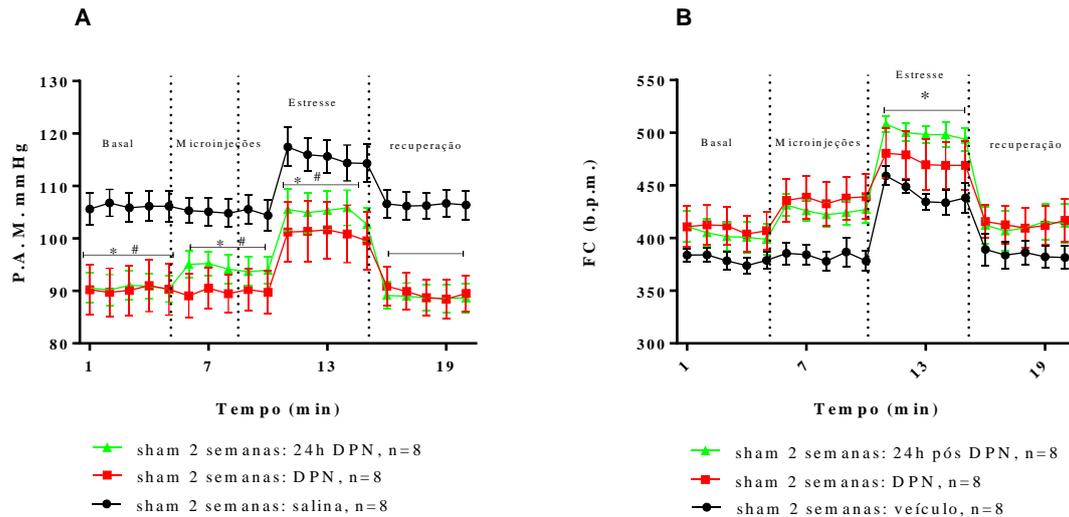


Figura 26: Efeito da microinjeção bilateral de agonista de receptor β (DPN) (0,5 pmol/100 nl) na CeA de ratas sham. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de Veículo, linha vermelha; microinjeção de DPN e linha verde; registro 24h pós E_2 e (B) mostra alterações da FC durante o experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores expressos em média \pm EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre o dia de tratamento com DPN e o dia de tratamento de veículo; e # mostra diferença estatística 24h após E_2 e o dia de tratamento com veículo; e em B * mostra diferença entre 24h após E_2 e o dia de tratamento com veículo, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

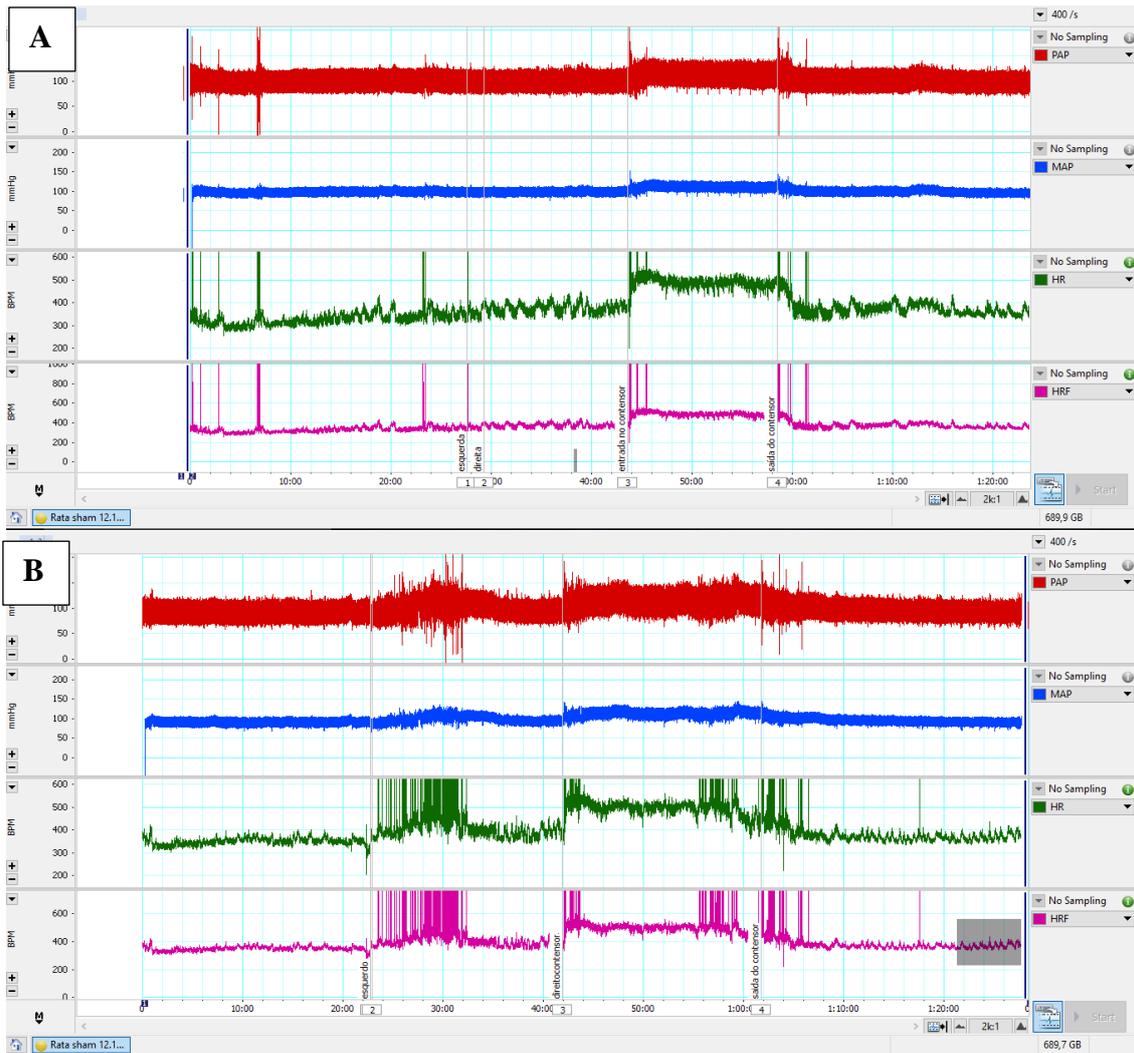


Figura 27: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de DPN (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.6- Efeito da microinjeção bilateral com agonista de receptor ER- β (DPN) (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OVX com 2 semanas de castração sobre respostas autonômicas da PAM e FC.

Na figura 28-A podemos observar de maneira similar ao ocorrido com o grupo sham que houve redução nos níveis de PAM no dia de tratamento com DPN antes mesmo a administração da droga quando comparado ao dia de tratamento com veículo ($F_{(2, 24)} = 12,57$; $p = 0,0002$) não havendo interações entre os fatores ($F_{(8, 96)} = 1,196$; $p = 0,3095$).

Contudo, 24h após DPN, nota-se reduções ainda maiores na PAM dos animais quando comparado ao dia de tratamento com veículo, bem como ao dia de tratamento com DPN.

Na figura 29-A, procedendo análise do período referente ao estresse, no dia de tratamento com veículo, observamos maiores picos de PAM quando comparado aos demais dias de tratamentos, ($F_{(2, 24)} = 8,658$; $p = 0,0015$) não havendo interação entre os fatores ($F_{(8, 96)} = 0,3076$; $p = 0,9615$). Porém, as análises sobre os deltas de variação da PAM não mostraram quaisquer diferenças quanto ao dia de tratamento ($F_{(3, 38)} = 0,7980$; $p = 0,5027$).

A figura 28-B mostra mudanças ocorridas sobre a FC. Podemos observar para os valores basais, que após 24h de E₂ os valores referentes à FC encontram-se reduzidos em comparação aos dois primeiros dias de tratamentos, onde se administrou veículo ou DPN ($F_{(2, 24)} = 6,823$; $p = 0,0045$) não sendo observada interação entre os fatores ($F_{(8, 96)} = 0,7431$; $p = 0,6533$). Já a análise sobre o período de estresse, não foram verificadas diferenças para o dia de tratamento ($F_{(3, 38)} = 2,322$; $p = 0,0906$).

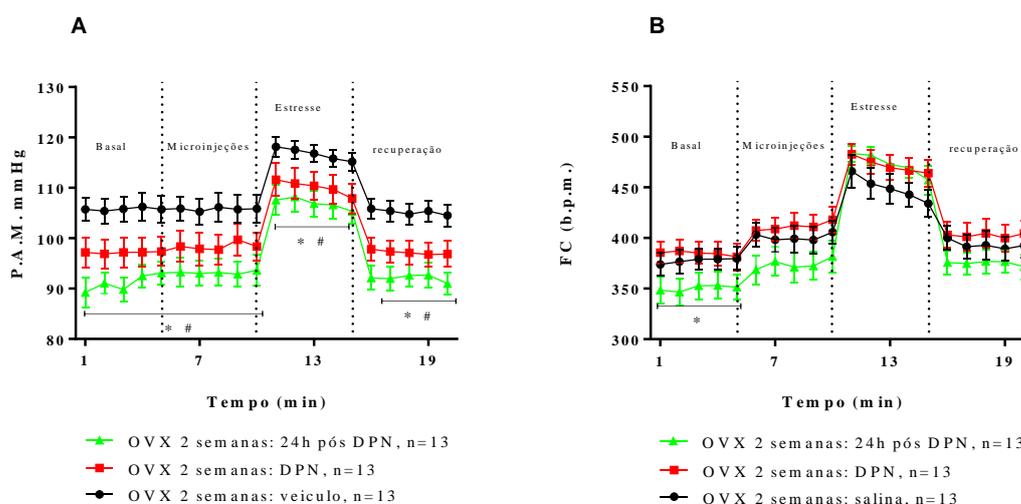


Figura 28: Efeito da microinjeção bilateral com (0,5 pmol/ 100 nl) agonista de receptor ER- β (DPN) na CeA de ratas OVX. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de DPN e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante o experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores numéricos seguindo mesma coloração das linhas gráficas mostram média \pm EPM. Em A, * mostra diferença estatística entre o dia de administração de DPN e o dia de administração de veículo, e # mostra diferença estatística após 24h e o primeiro dia e em B, * mostra

diferença entre 24h após E₂ e os demais dias, pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

Apesar das pequenas alterações observadas nos registros de PAM e FC nos grupos submetidos às microinjeções de DPN (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA, tanto animais sham quanto animais OVX não mostraram quaisquer diferenças quando estudado o delta de variações dos valores referente à PAM ($F_{(3,38)} = 1,900$; $p = 0,1460$) e FC ($F_{(3,38)} = 0,8448$; $p = 0,4779$) como pode ser visualizado na figura de número 29-A e B.

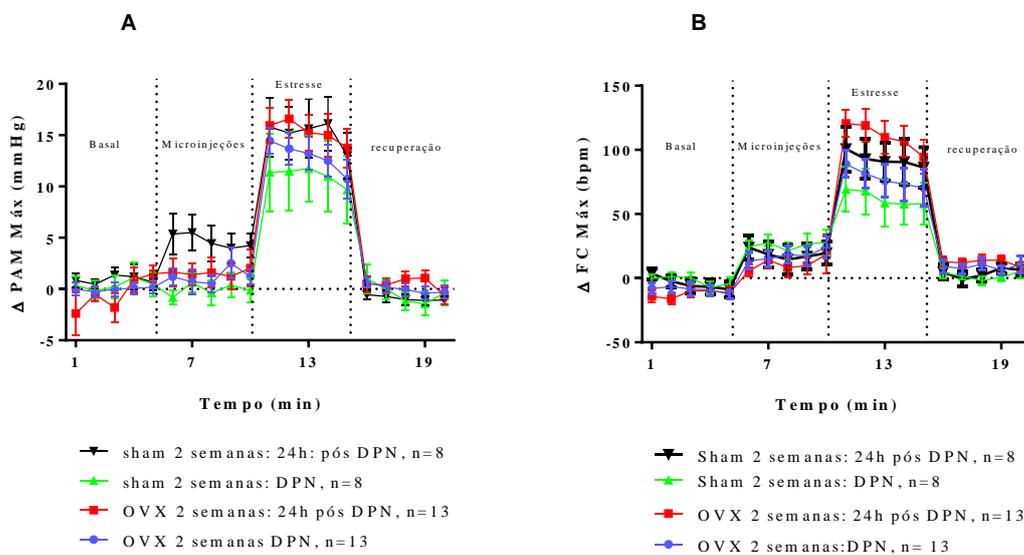


Figura 29: Comparação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 semanas e grupo OVX 2 semanas após microinjeção bilateral de DPN. Os dados são expressos em média \pm EPM. Para este grupo de estudo não foram observadas diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p \leq 0,05$.

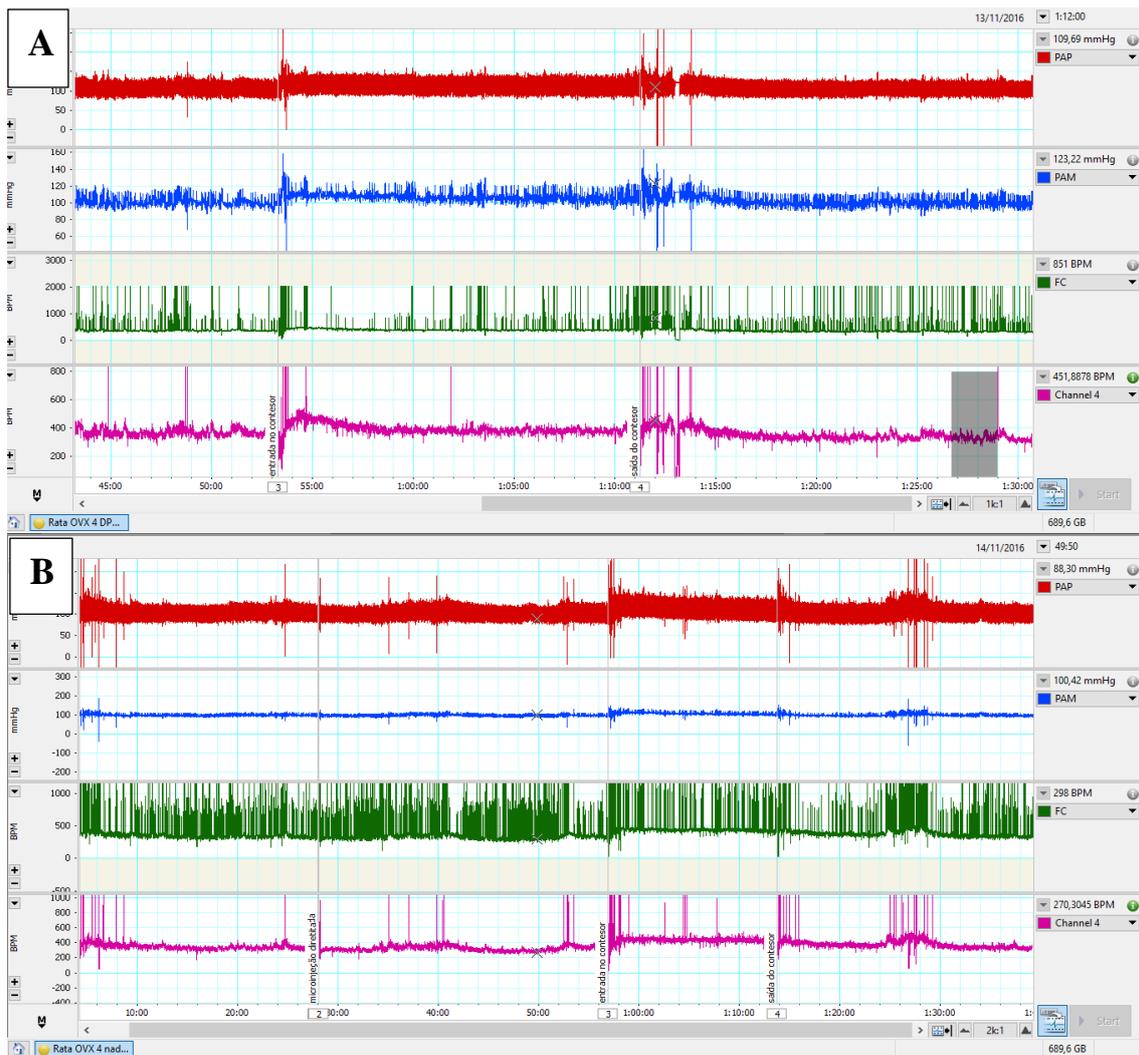


Figura 30: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de DPN (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.7- Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100nl) na CeA de ratas sham com 2 meses de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e a FC.

Ao estudarmos os efeitos desencadeados pela administração de E₂ (0,5 pmol/ 100nl) na CeA sobre os valores basais da PAM das ratas pertencentes ao grupo sob 2 meses de cirurgia fictícia (sham) na figura 31-A, notamos reduções significativas após 24h

comparado ao dia de tratamento com salina, ($F_{(2, 16)} = 7,985$; $p = 0,0039$) não havendo interação entre os fatores ($F_{(6, 48)} = 0,3988$; $p = 0,8762$). Entre o dia de tratamento com E_2 e o dia de tratamento com salina não houveram diferenças. Quando analisamos as respostas da PAM ao estresse na figura 31-A, observamos níveis menores da PAM 24h após microinjeções de E_2 ao longo do tempo de registro sob estresse comparado ao dia de tratamento com salina ou E_2 ($F_{(4, 32)} = 4,920$; $p = 0,0033$) existindo interação entre os fatores ($F_{(8, 64)} = 3,220$; $p = 0,0039$).

Não observamos alterações para os valores de FC nos períodos basais ($F_{(2, 16)} = 0,5516$; $p = 0,5866$) ou de estresse ($F_{(2, 16)} = 3,092$; $p = 0,0732$) (figura 31-B).

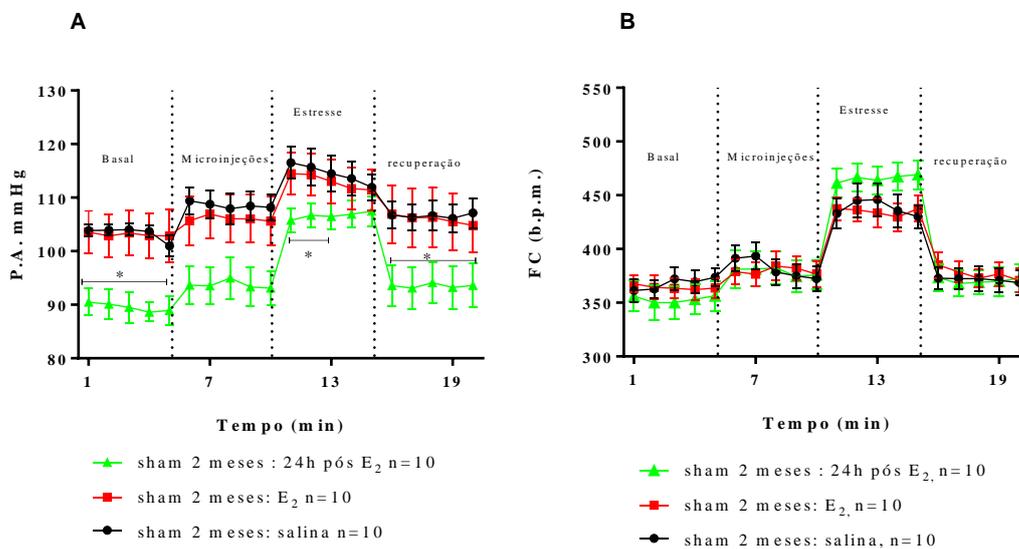


Figura 31: Efeito da microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sham 2 meses de cirurgia sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta, microinjeção de salina; linha vermelha, microinjeção de E_2 e linha verde, registro 24h pós E_2 e (B), mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PAM e FC. Valores mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E_2 e o dia de tratamento com salina e E_2 ; pelo teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

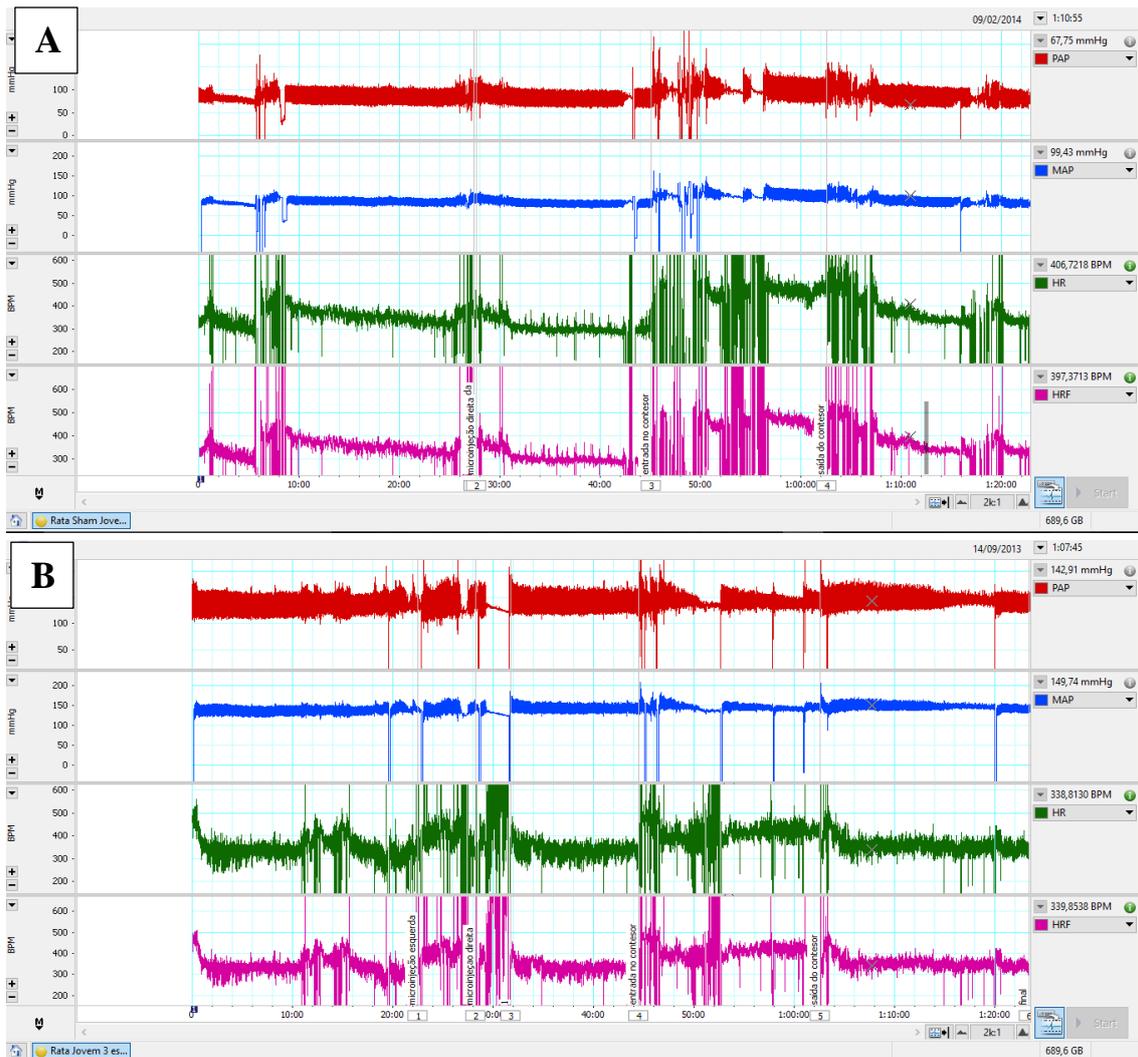


Figura 32: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.8- Efeito da microinjeção bilateral com E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OVX com 2 meses de castração sobre respostas autonômicas da PA e FC.

A figura 33-A ilustra a administração de 100 nl (0,5 pmol/100 nl) de E₂ na CeA das ratas pertencentes ao grupo sob 2 meses de privação hormonal (OVX), onde nota-se reduções da PAM 24h após tratamento com E₂ comparado ao dia que se tratou com salina ($F_{(2,26)} = 11,39$; $p = 0,0003$) sem interações entre os fatores ($F_{(8,104)} = 1,509$ $p; = 0,1631$). Nas respostas da PAM ao estresse, observamos valores reduzidos da PAM 24h após

tratamento com E₂ comparadas ao dia de tratamento com salina ($F_{(2, 26)} = 5,447$; $p = 0,0106$). Foram observadas diferenças ao longo do tempo de registro sob estresse ($F_{(4, 52)} = 8,904$; $p < 0,0001$) sem interação entre os fatores ($F_{(8, 104)} = 0,3618$; $p = 0,9383$).

A figura 33-B ilustra as respostas da FC. Observamos reduções nos valores basais 24h após microinjeções de E₂ comparado ao dia de tratamento com salina ($F_{(2, 30)} = 15,91$; $p < 0,0001$) não havendo diferença entre o dia de tratamento com E₂ e o dia de tratamento com salina. Não foram observadas diferenças ao longo do tempo de registro ($F_{(4, 60)} = 1,557$; $p = 0,1974$) nem interação entre os fatores ($F_{(8, 120)} = 0,4432$; $p = 0,8928$). Ao ponderar sobre as alterações ocorridas na FC sob o período de estresse, não verificamos quaisquer mudanças ($F_{(2, 30)} = 0,3067$; $p = 0,7382$).

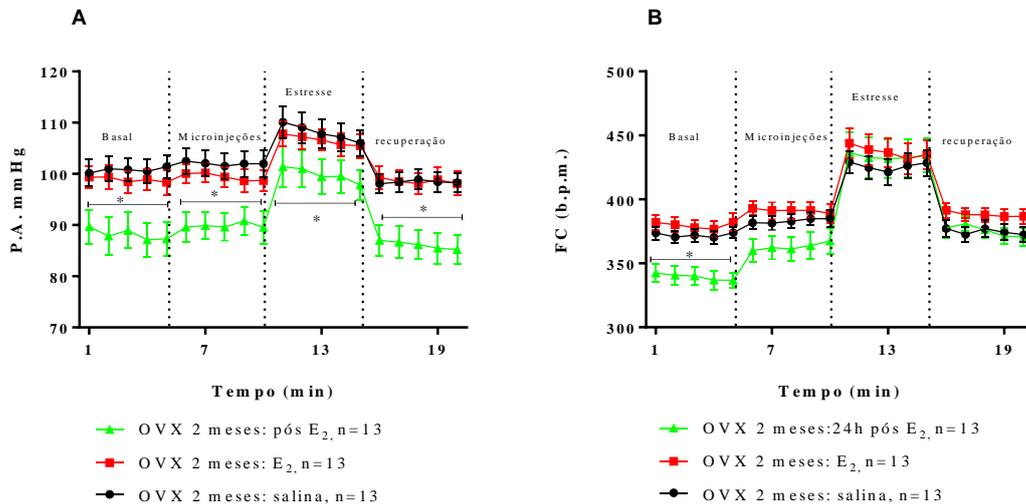


Figura 33: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OVX 2 meses sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PA durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média \pm EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E₂ e os onde se administrou salina. Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

A análise dos deltas de variações da PAM dos grupos sham 2 meses e OVX dois meses (34-A), observamos que apesar da queda dos valores basais, o grupo OVX praticamente não apresentou maior responsividade ao momento de estresse nos dias de

tratamento com E₂ e após 24h, como observado nos animais do grupo com 2 semanas. Notamos na figura 34-B que, os animais sham 2 meses: 24h após E₂ mostraram maiores respostas taquicárdicas ao estresse que os demais grupos, menos quando comparado ao grupo OVX 2 meses: 24h após E₂ ($F_{(3, 41)} = 3,496$; $p = 0,0239$). Os valores relacionados à FC observamos maior responsividade no grupo sham 2 meses: 24h após E₂ ($F_{(3, 45)} = 2,930$; $p = 0,0437$).

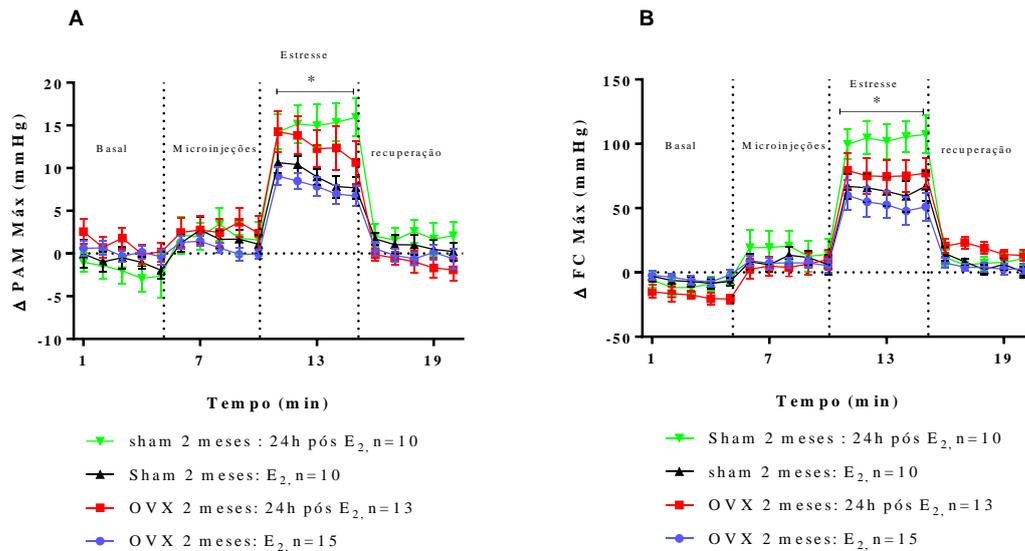


Figura 34: Correlação entre os deltas de variações da PAM e FC entre os grupos sham 2 meses e grupo OVX 2 meses após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) e decorridos 24h. Os dados são expressos em média ± EPM. Em (A), * mostra diferença estatística entre sham 2 meses 14h após E₂ e sham 2 meses; OVX 2 meses: E₂ e em (B), * mostra diferença estatística entre sham 2 meses: 24h após E₂ e os demais grupos. ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p \leq 0,05$.

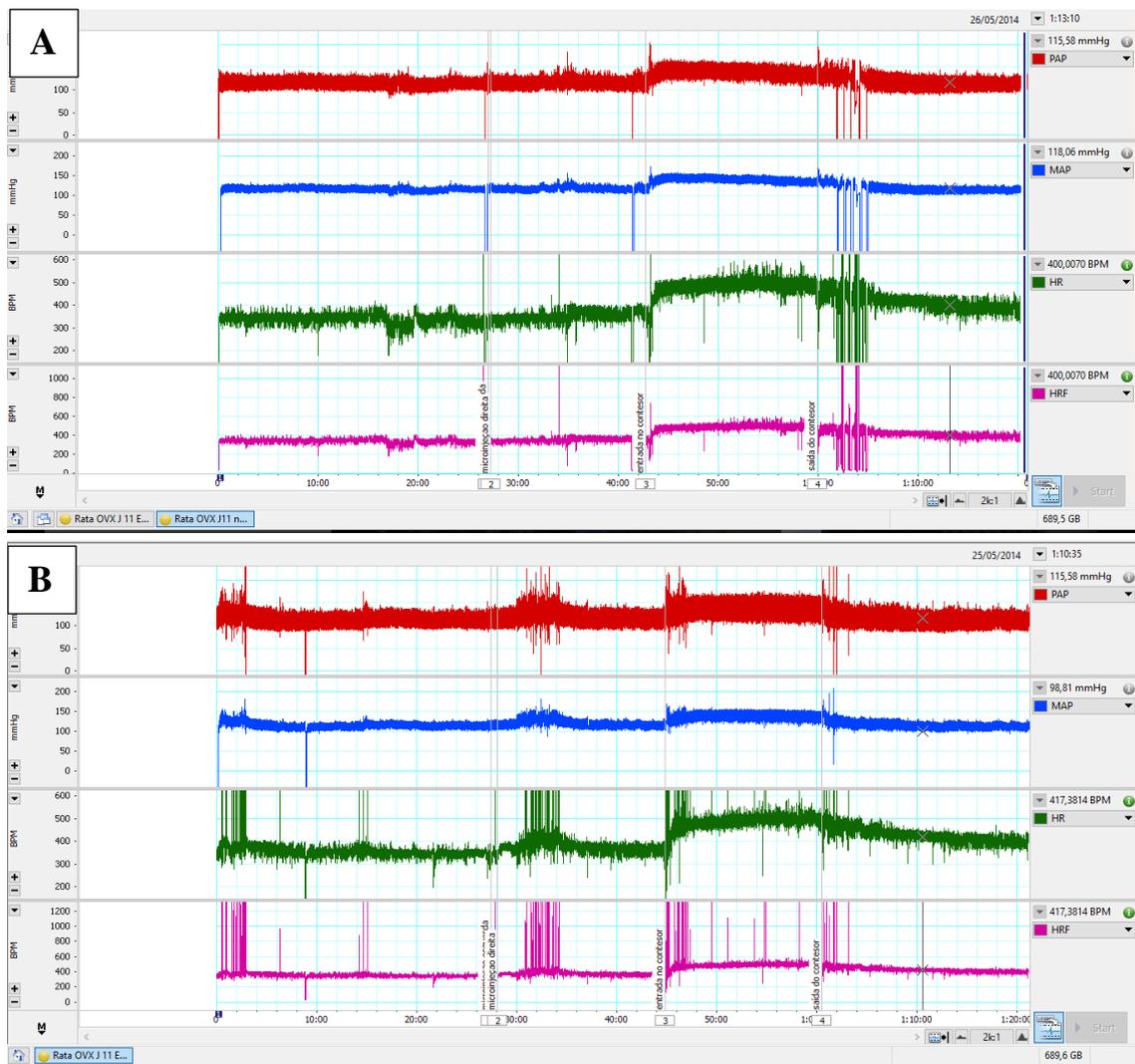


Figura 35: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E_2 (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E_2 . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.9- Efeito da microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA em ratas Sham com 8 meses de cirurgia fictícia sobre respostas autonômicas da PAM e FC.

A figura 36-A reproduz os dados dos animais do grupo sob cirurgia fictícia (sham) de 8 meses. Interessantemente esses animais não mostraram redução nos níveis pressóricos decorridos 24h de microinjeção de E_2 na CeA em seu período basal comparado ao dia de

tratamento com salina ou E₂ ($F_{(2, 10)} = 2,148$; $p = 0,1674$). Ao se analisar o período sob estresse, percebemos que não houveram alterações na responsividade 24h após tratamento com E em comparação ao tratamento com salina ($F_{(2, 10)} = 0,8898$; $p = 0,4409$).

A análise sobre os valores basais de FC na figura 36-B não revelam quaisquer alterações entre os dias de experimentação ($F_{(4, 28)} = 1,372$ $P = 0,2688$). Contudo, o estudo das respostas ao estresse ao longo do tempo, despontam maiores responsividades ($F_{(4, 28)} = 2,945$; $p = 0,0377$), mas sem alterações para dia de tratamento com E₂ e 24h após, comparado ao dia de tratamento de salina ($F_{(2, 14)} = 3,700$; $p = 0,0513$).

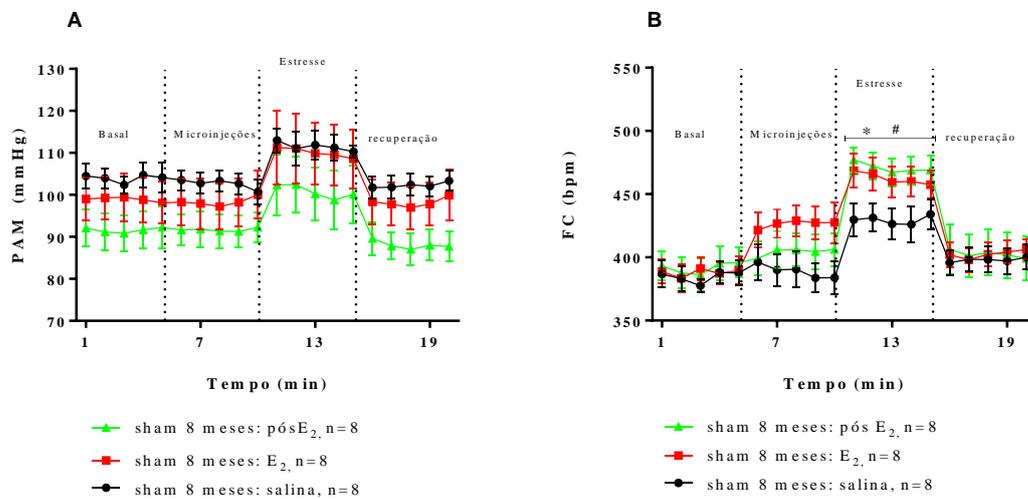


Figura 36: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sham 8 meses sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PA durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média \pm EPM. Em (A) * mostra diferença estatística entre o dia de tratamento com E₂ e dia de tratamento salina, # diferença entre 24h após E₂ e salina; em (B) * mostra diferença estatística ao longo do tempo entre o dia de tratamento com E₂ e dia de tratamento salina, # diferença ao longo do tempo, entre 24h após E₂ e salina; Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de Tukey, para $p < 0,05$.

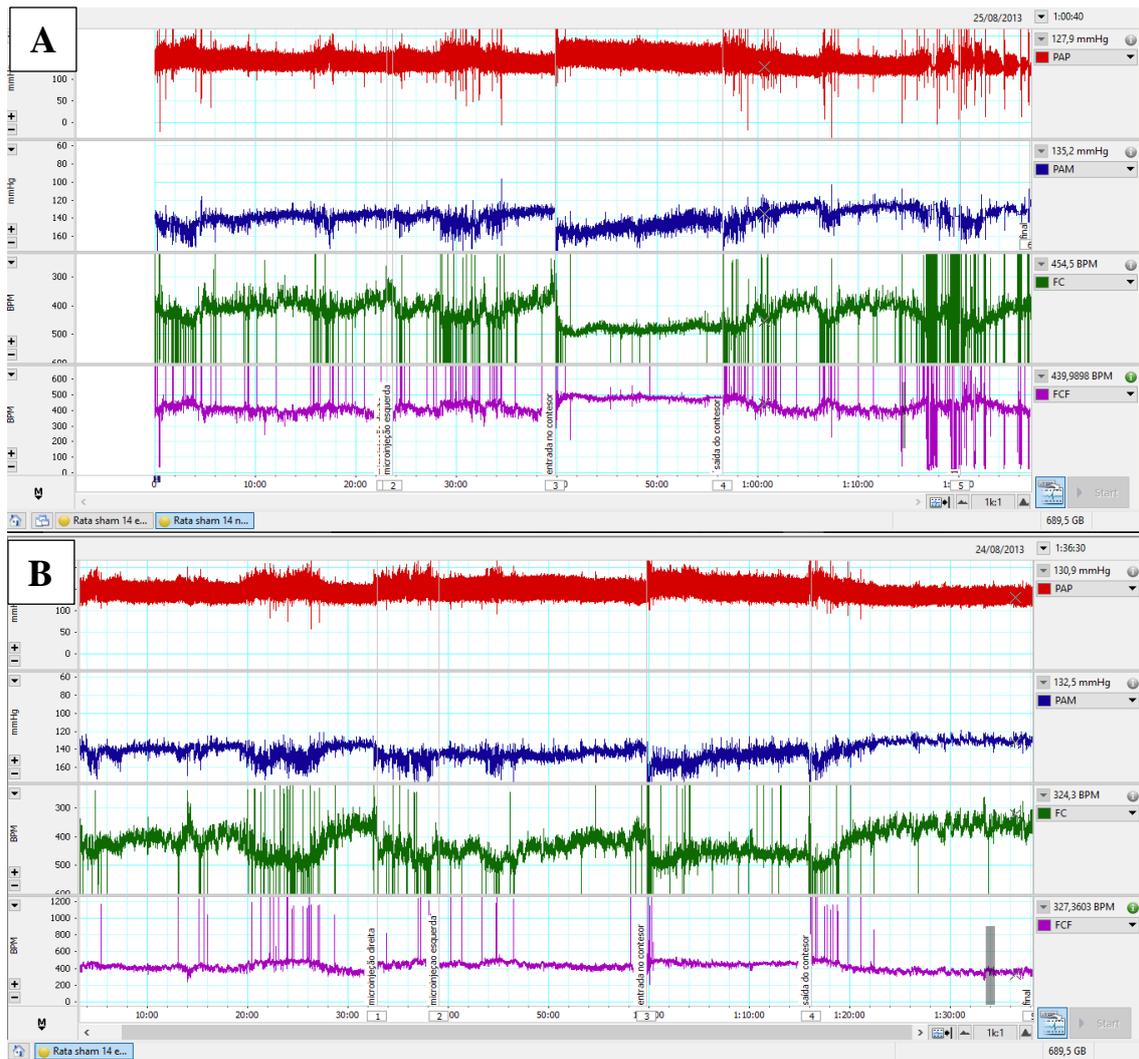


Figura 37: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E_2 (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E_2 . Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

4.10- Efeito da microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OVX com 8 meses de castração sobre a PAM e a FC

A figura 38-A demonstra que, a microinjeção bilateral de E_2 (0,5 pmol/ 100 nl) nos animais sob OVX de 8 meses, não promoveu quaisquer alterações sobre os valores basais de PAM nos três dias de experimentação ($F_{(2, 14)} = 1,448$; $p = 0,2682$) e também não observamos interações entre os fatores ($F_{(8, 56)} = 0,7795$; $p = 0,6224$). Contudo no período referente à situação de estresse, observamos níveis mais baixos de PAM 24h após

tratamento com E₂ ($F(2, 14) = 4,364$ $P = 0,0337$) sem interações sobre os fatores ($F(8, 56) = 0,3068$ $P = 0,9604$).

Na figura 38-B o estudo das alterações decorrentes da microinjeção E₂ sobre a FC mostra que não foram encontradas diferenças sobre os valores entre os dias de tratamento ($F(2, 14) = 2,041$ $P = 0,1668$). Já a análise sobre o período referente ao estresse nos revela que o tratamento com E₂ também não causou qualquer contenda entre os dias estudados ($F(2, 14) = 0,8264$ $P = 0,4579$).

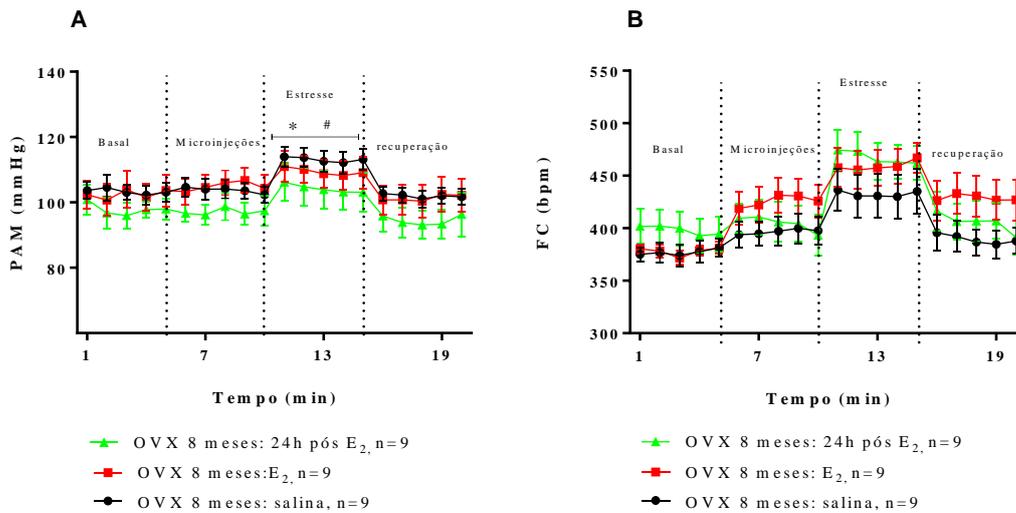


Figura 38: Efeito da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas sob OVX de 8 meses (OVX) sobre a PAM e FC. (A) mostra alterações na PAM durante os três dias de experimento; linha preta microinjeção de salina, linha vermelha; microinjeção de E₂ e linha verde; registro 24h pós E₂ e (B) mostra alterações da FC durante experimento. As linhas seguem os mesmos padrões de cores utilizados para a PA. Valores mostram média ± EPM. * mostra diferença estatística entre o dia 24h pós E₂ e o dia de tratamento com salina, # mostra diferença entre o dia de tratamento com E₂ e o dia de administração de salina. Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey*, para $p < 0,05$.

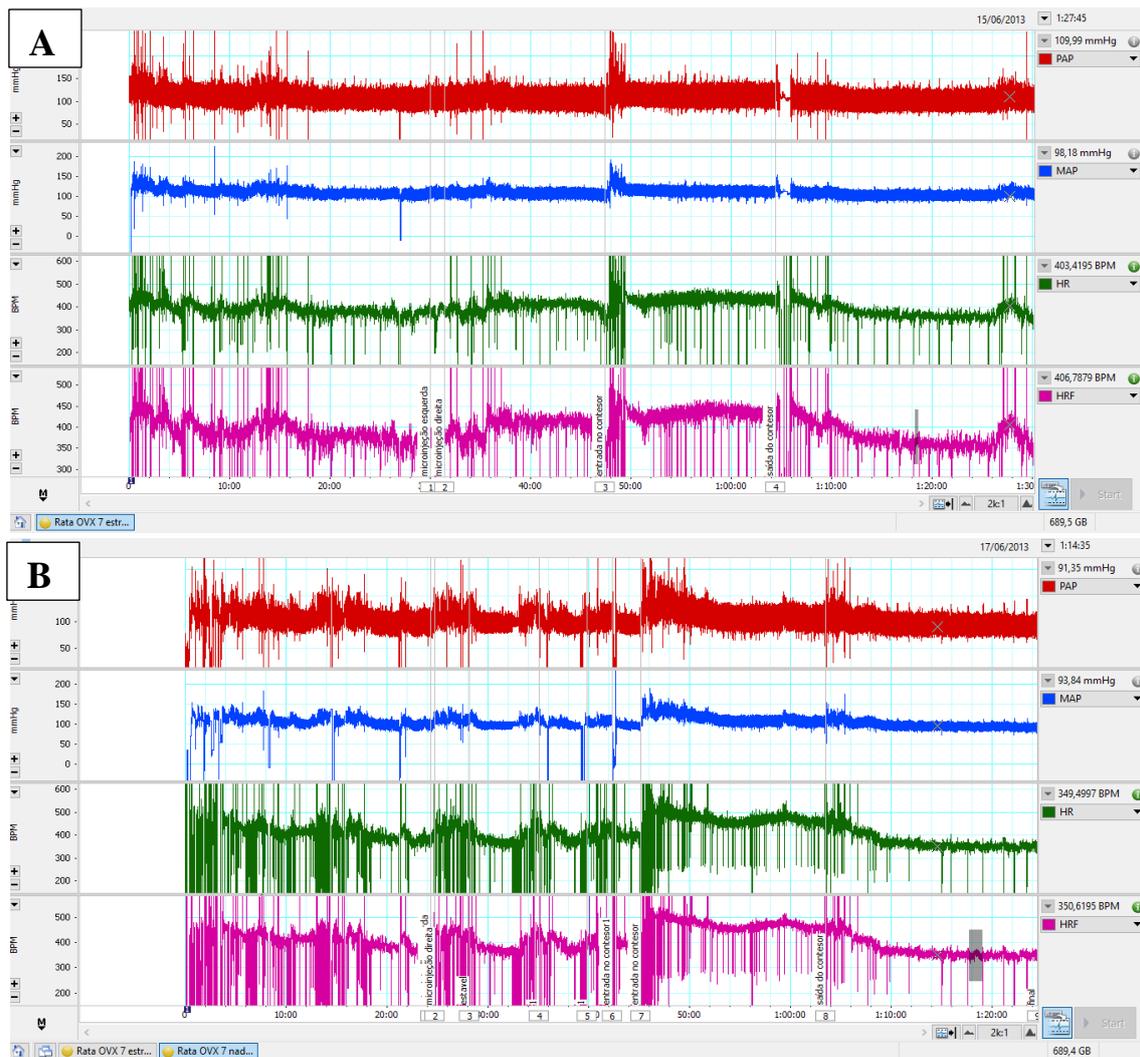


Figura 39: Alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), **A**, após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100nl) na CeA e **B**, 24 horas após administração de E₂. Representação da janela de visualização do software Lab Chart® durante o registro original de pressão e frequência cardíaca. No primeiro canal em vermelho, é possível observar a PAP; no segundo canal em azul, a PAM e no terceiro, em verde, a FC.

Correlacionando agora os valores entre os deltas de variações da PAM dos três grupos etários de animais OVX (2 semanas, 2 meses e 8 meses) 24h após microinjeção bilateral de 100 nl (0,5 pmol/ 100 nl) de E₂, observamos na figura 40-A que o delta de variação da PAM em resposta ao estresse por contensão/ jato de ar mostra-se reduzido nos animais com 8 meses de privação hormonal comparado aos demais grupos (2 semanas e 2 meses) confirmado com análise da área sob a curva demonstrado na figura 40-B ($F_{(2, 23)} = 4,343$; $p = 0,0251$). Já na figura 40-C, podemos visualizar que de maneira similar, a

FC mostra-se com delta de variação reduzido 24h após administração *in situ* de 100 nl (0,5 pmol) de E₂ no grupo OVX 8 meses confirmado através da análise da área sob a curva (figura 40-D) ($F_{(2, 30)} = 10,86$; $p = 0,0003$).

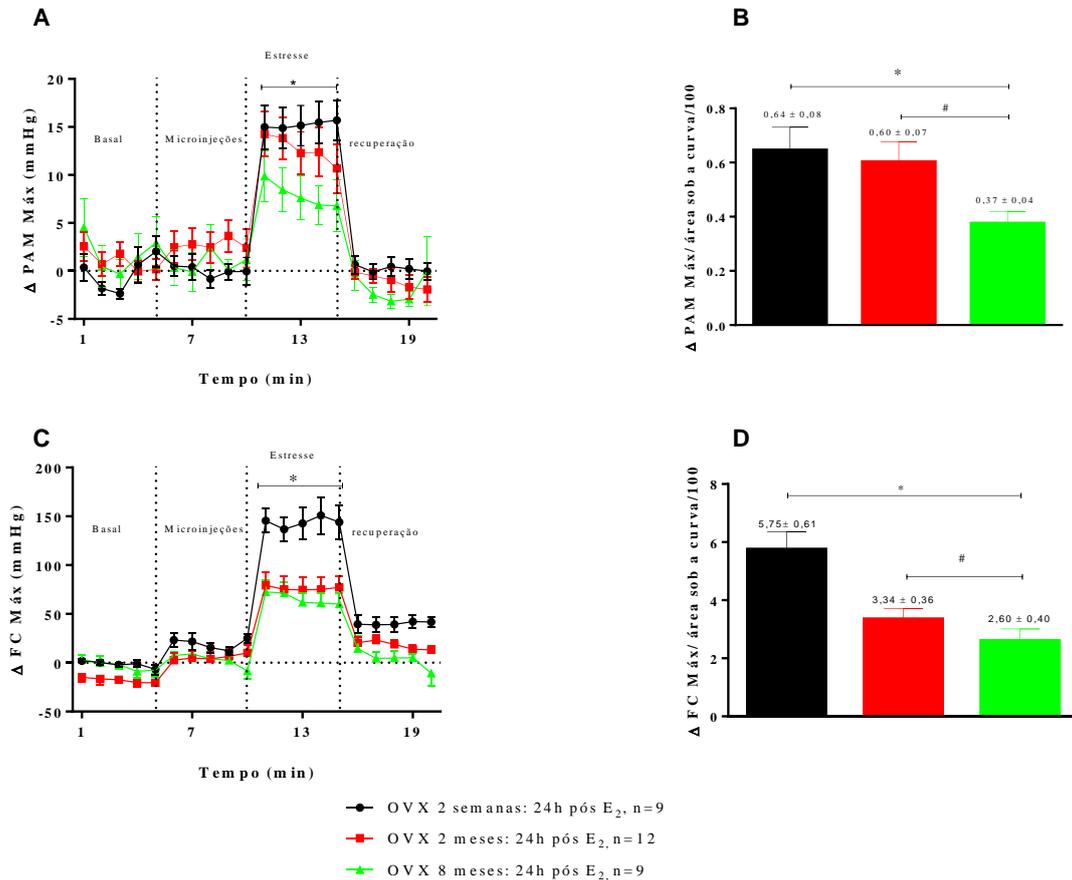


Figura 40: Comparação entre os deltas de variações de PAM (A e B) e FC (C e D) após 24h da administração de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl) na CeA de ratas OXX de diferentes tempos de OVX. Em (A), * mostra diferença significativa entre OVX 8 meses e os demais grupos, em (B) * mostra diferença entre OVX 8 meses e 2 semanas, e # diferença entre OVX 2 meses e OVX 2 semanas; Em (C), * mostra diferença de OVX 8 meses e os demais grupos e em (D), * mostra diferença entre OVX 2 semanas e OVC 8meses, e # mostra diferença entre OVX 2 meses e OVX 8 meses. Resultados expressos em média ± EPM. Teste ANOVA *two way* seguido de pós teste de *Tukey* para e Anova *one way* seguida de pós teste de *Tukey* para análise da área sob a curva $p < 0,05$.

4.11- Ovariectomia e comportamento

Para melhor compreensão dos dados, na primeira sessão dos resultados referentes ao comportamento no LTE, descreveremos os testes comportamentais realizados no LTE nos animais OVX e sham após microinjeção bilateral de 100 nl de salina.

Em nosso estudo, pode ser observado (Figura 41) que no teste de esquiiva inibitória os animais pertencentes ao grupo OVX, sob OVX de 2 semanas, após microinjeção de salina, mostraram relativo aumento no tempo de latência de saída do braço fechado ao longo das tentativas, na esquiiva 2 (Esq 2), quando comparados aos animais sham na Esq 2 ($F_{(2, 44)} = 5,550$; $p = 0,0071$). O tempo de latência eleva-se gradualmente nos três testes para os animais OVX. Já para os animais pertencentes ao grupo controle (sham), não foi verificada qualquer alteração. O fator castração mostrou diferença ($F_{(1, 22)} = 6,260$; $p = 0,0203$) e houve interação entre os fatores ($F_{(2, 44)} = 3,818$; $p = 0,0296$). Resultado este sugerindo que animais castrados tendem a um comportamento mais ansioso apresentando elevações no tempo de latência de saída do braço fechado do LTE.

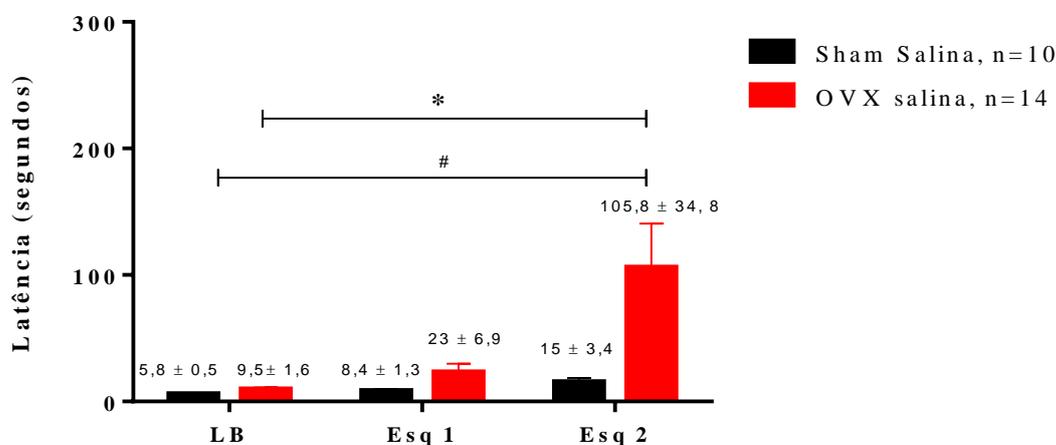


Figura 41: Teste de esquiiva inibitória no LTE. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas sham ($n = 10$) e submetidas à OVX ($n = 14$). * Diferença estatística após teste *ANOVA one way* entre animais de mesmo grupo (OVX) e # mostra diferença significativa entre os animais OVX e sham no teste esquiiva 2 pelo teste *ANOVA two way* seguido de pós teste de *Sidak's* para $p < 0,05$.

A figura 42 mostra o comportamento das ratas no teste de fuga realizado no LTE. Não houve diferença entre o tempo de latência de saída do braço aberto ao longo das

tentativas dentro do mesmo grupo (sham $F_{(2, 21)} = 0,04907$; $p = 0,9522$) e (OVX $F_{(2, 33)} = 0,07861$; $p = 0,9246$), assim como também não foi encontrada na comparação entre os grupos, indicando que a castração cirúrgica não compromete a resposta de fuga, ou seja, estes animais não apresentam transtorno do tipo pânico ($F_{(2, 36)} = 0,1371$; $p = 0,8724$).

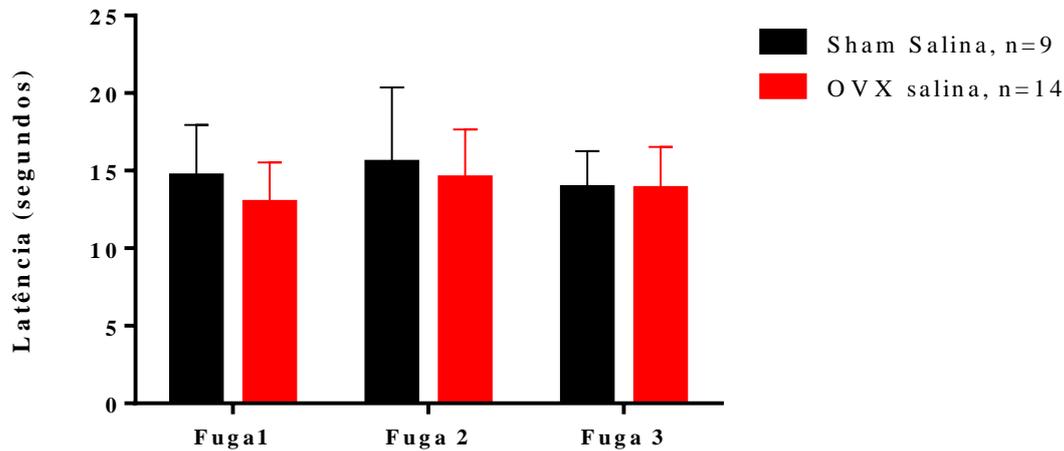


Figura 42: Teste de pânico no LTE. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas sham ($n=9$) e submetidas à OVX ($n=13$). ANOVA *one way*, com pós-teste de *Tukey*, e ANOVA *two way*, com pós-teste de *Sidak's* ($p<0,05$).

Transcorridos 24h dos experimentos realizados no LTE, procedeu-se a realização do teste de memória de esQUIVA inibitória (figura 43-A) e fuga (figura 43-B). Analisando os dados mostrados no painel 43-A percebemos diferenças no tempo de latência de saída do braço fechado ($t_{=10,21}$ $p = < 0,0001$) o que se traduz em uma maior resposta de ansiedade dos animais deste grupo não afetando a memória de ansiedade desses animais comparados ao teste de esQUIVA do dia anterior. Para os valores no tempo de latência da fuga, apesar de valores médios menores observados nos animais OVX não houve diferença significativa quando comparado aos animais sham ($t_{=0,3226}$ $0,7502$).

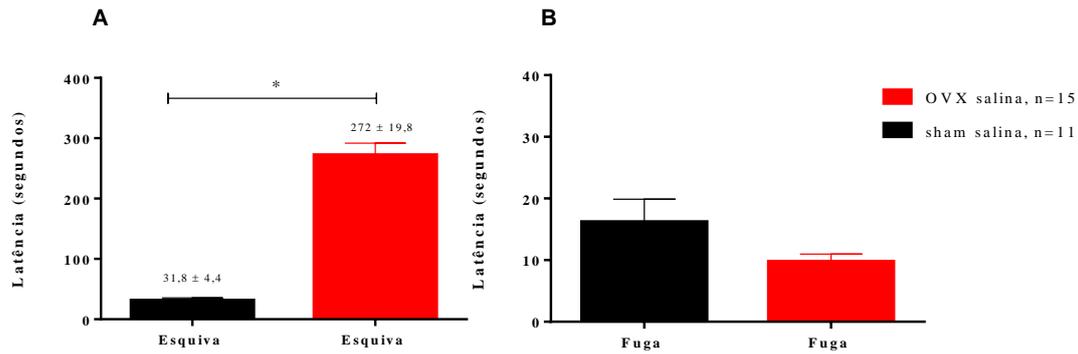


Figura 43: Teste de memória de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE após 24 horas. Valores numéricos acima das barras indicam média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída dos braços fechado (A) e aberto (B) de ratas sham (n= 11) e OVX (n= 15), após microinjeção bilateral de 100 nl de salina na amígdala central. * mostra diferença significativa no tempo de latência de saída do braço fechado entre os grupos sham e OVX. Teste *t Student* não pareado ($p < 0,05$).

As próximas sessões deste trabalho serão apresentados os dados referentes aos testes comportamentais realizados no LTE para animais sham e OVX com duas semanas de OVX ou cirurgia fictícia, 20 minutos após a tratamento com E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA.

A figura 44 mostra a resposta do teste de esquiva inibitória onde pode ser observado que ao longo do experimento houve aumento no tempo de latência de saída do braço fechado pelas ratas OVX durante as tentativas ($F_{(2, 42)} = 16,68$; $p < 0,0001$), apesar de não terem sido observadas interações entre o fator tempo e tratamento. Mesmo assim, as mudanças ocorridas no (esq 2) sugerem comportamento mais ansiogênico nos animais castrados. De maneira sutil o grupo sham mostrou pequena elevação entre a Esq 1 e a Esq 2 ($F = 5,959$; $p = 0,0089$). Porém, animais do grupo OVX apresentaram elevação ainda maior, principalmente na Esq 2.

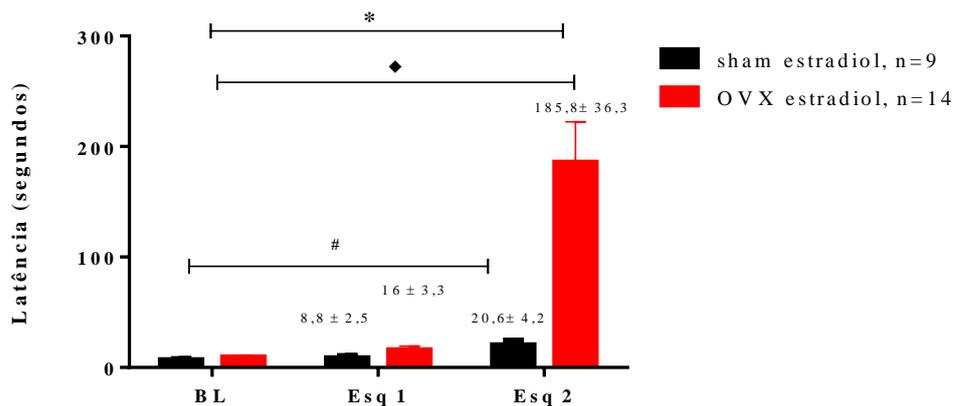


Figura 44: Teste de esquiva inibitória no LTE. Valores numéricos acima das barras mostram média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) sham (n= 9) e OVX (n= 14) após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl). ♦ Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo (OVX), por ANOVA one way, com pós-teste de Tukey (p<0,05). * Diferença estatística entre os grupos (sham x OVX) na mesma tentativa, ANOVA two way, com pós-teste de Tukey; # mostra diferença significativa entre tentativas no mesmo grupo (sham), ANOVA one way com pós teste de Bonferroni, (p<0,05).

Curiosamente, em relação ao teste de pânico avaliado após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl), quando avaliado através do tempo de latência de fuga do braço aberto para o braço fechado do LTE, observamos tempos de latência maiores no grupo OVX quando comparado ao grupo controle sham ($F_{(1, 60)} = 13,05$; $p = 0,0006$).

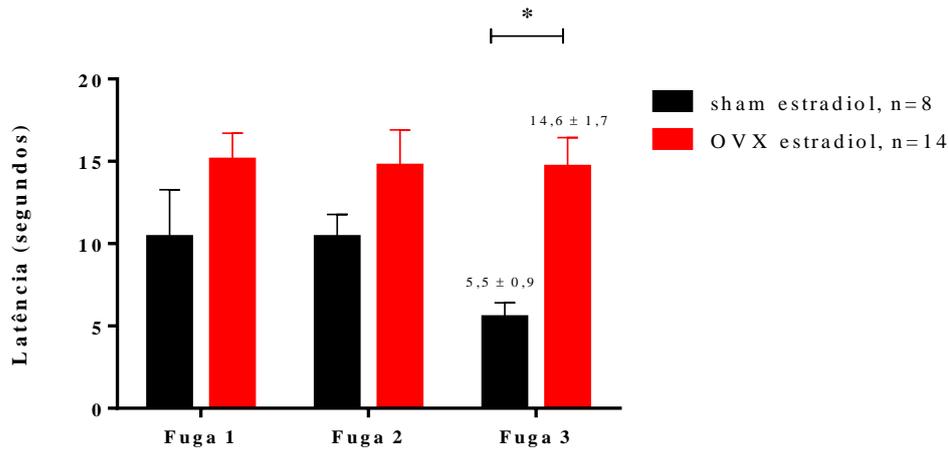


Figura 45: Teste de fuga no LTE após a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100 nL) na CeA de ratas sham e OVX. Valores numéricos sobre as barras mostram média (± EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de sham (n= 8) e OVX (n= 14). ANOVA *two way*, com pós-teste de *Tukey* para $p < 0,05$.

O teste de memória de esquiwa inibitória (figura 46-A) e fuga, (figura 46-B realizado 24h após o experimento no LTE e 24h após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl), mostrou um aumento no tempo de latência de saída do braço aberto dos animais OVX quando comparado aos animais sham e mantiveram a memória de ansiedade verificada no dia anterior ($t_{26,97} < 0,0001$). Na figura 46-B observamos também uma elevação no tempo de latência de saída do braço aberto para os animais do grupo OVX quando comparados ao grupo sham ($t_{2,108} p = < 0,0452$).

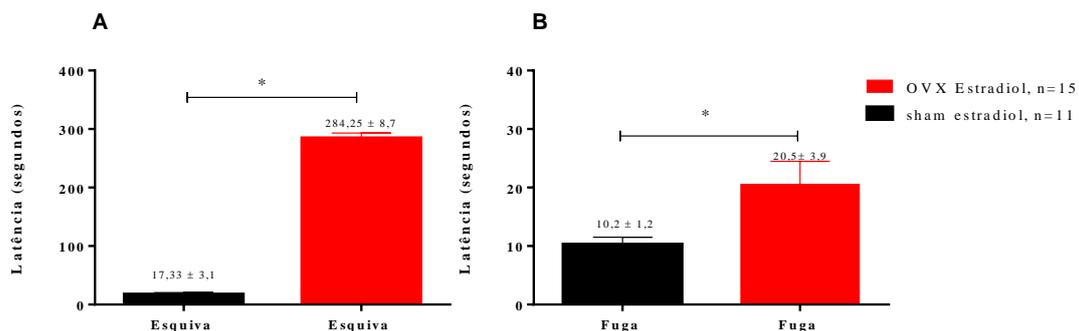


Figura 46: Teste de memória de esquiwa inibitória (A) e fuga (B) no LTE após 24 horas. Valores numéricos acima das barras indicam Média (± EPM) das latências (em segundos) de saída dos braços fechado (A) e aberto (B) de ratas sham (n= 11) e OVX (n= 15), após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA. * mostra diferença significativa

na no tempo de latência de saída do braço fechado entre os grupos sham e ovx. Teste *t Student* não pareado ($p < 0,05$).

E última análise no LTE, no intuito de reforçar nossos pensamentos acerca do estradiol mediando reações de ansiedade em ratas, a figura 47 mostra aumento no tempo de latência de saída do braço fechado de ratas OVX ao longo das tentativas, 20 minutos após microinjeção bilateral de E₂ confrontadas com ratas OVX que receberam tratamento de salina ($F_{(2, 52)} = 27,34$; $p < 0,0001$) sugerindo comportamento mais ansiogênico em animais que receberam tratamento com E₂.

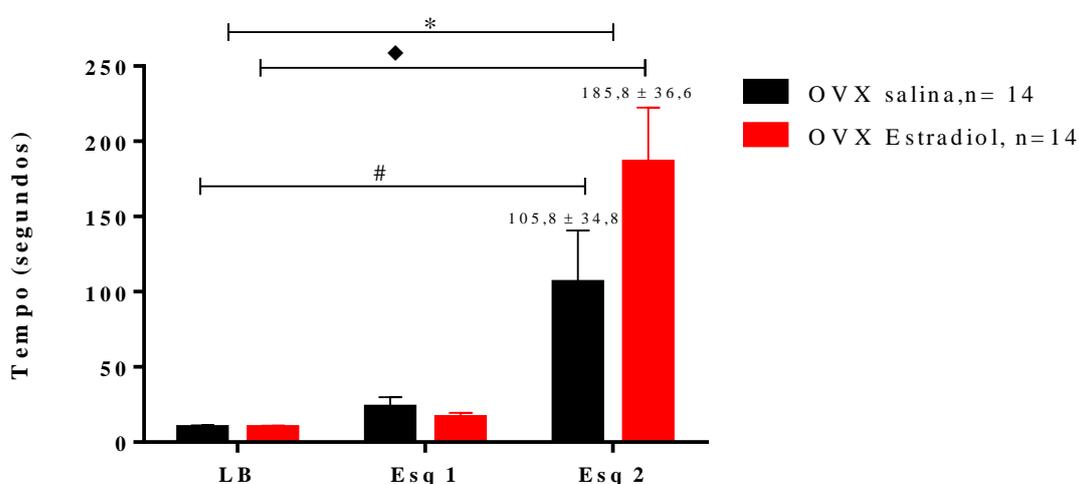


Figura 47: Teste de esquiiva inibitória no LTE. Valores numéricos acima das barras mostram média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) sham ($n = 14$) e OVX ($n = 14$) após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/ 100 nl). ♦ Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo (OVX E₂), por ANOVA *one way*, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). * Diferença estatística entre os grupos (OVX salina x OVX E₂) na mesma tentativa, ANOVA *two way*, com pós-teste de Tukey; # mostra diferença significativa entre tentativas no mesmo grupo (OVX salina), ANOVA *one way* com pós teste de Bonferroni, ($p < 0,05$).

Campo aberto

Ao efetuarmos o estudo do comportamento de locomoção dos animais fazendo uso do campo aberto (open field), podemos observar na figura 48-A que os animais OVX

após microinjeção de 100 nl de salina, estes locomoveram-se menos que os animais sham sob mesmo tratamento. Podemos observar também que 20 minutos após microinjeção bilateral de E₂ os animais OVX passaram a se locomover na mesma proporção dos animais sham ($F_{(2, 38)} = 5,232$; $p = 0,0098$).

Corroborando com o achado da figura 48-A, a análise sobre a velocidade média de locomoção dos animais mostrada na figura 48-B, notamos que animais OVX, após microinjeção de salina, locomovem-se mais lentamente que animais sham salina e que após 20 min da aplicação de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA, animais OVX movem-se com igual velocidade dos animais sham ($F_{(2, 38)} = 4,979$; $p = 0,0120$).

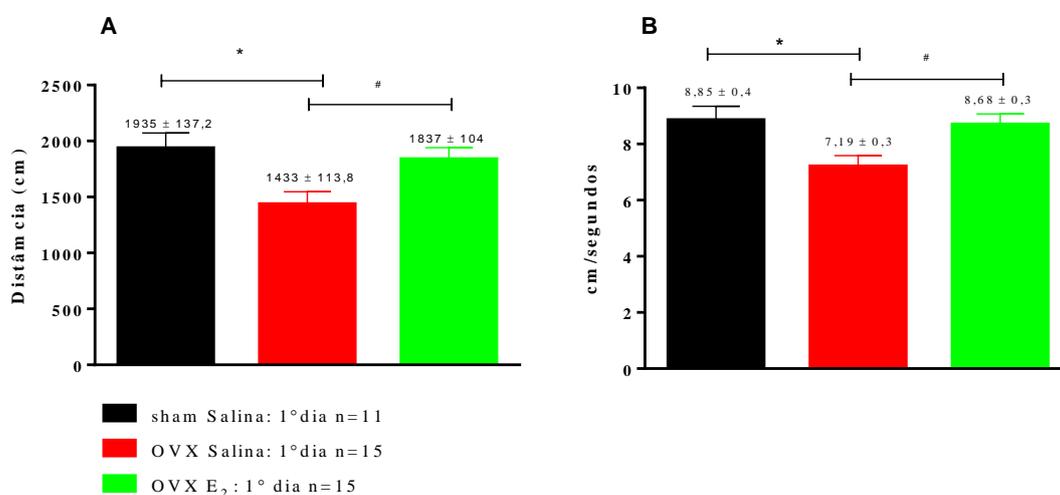


Figura 48: Teste de atividade locomotora no CA a partir dos centímetros (cm) percorridos e velocidade (cm/segundo) em cada grupo. Valores numéricos acima das barras mostram média (\pm EPM). * mostra diferença significativa entre os grupos sham salina e OVX salina. # mostra diferença significativa entre o grupo OVX salina e OVX E₂. ANOVA *one way* com pós teste de *Tukey*.

5- DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos se diferentes tempos de castração cirúrgica (2 semanas; 2 meses e 8 meses) promovem alterações autonômicas cardíacas em ratas submetidas ao estresse por contenção/ jato de ar e, qual seria o papel da CeA e do E₂ nessas respostas. Avaliamos também se a OVX ocasionaria disfunção comportamental e cognitiva, mais especificamente, transtornos de ansiedade, pânico e comprometimento da

memória avaliadas no LTE e campo aberto, bem como ponderamos se o E₂ exerceria alguma função na mediação de tais comportamentos quando administrado na CeA.

Como já é conhecido desde o século passado, ratas ovariectomizadas apresentam maior ingestão alimentar, elevando sua massa corpórea e apresentando grau elevado de tecido adiposo e que a TRH reverte esses efeitos exibindo atividade lipolítica (Richard e cols., 1987). Tal implicação sobre a redução de peso em animais sob TRH poderia ser atribuído à inibição do peptídeo γ com conseqüente diminuição da ingestão alimentar (Kimura e cols., 2002). Somando-se aos dados obtidos em animais, observações clínicas também apontam envolvimento do estradiol na distribuição de massa adiposa em mulheres, exibindo maior acúmulo de gordura na região glúteo-femural (Kissebach AH e cols., 1985; Zamboni e cols., 1992) e menor na região visceral (Kvist e cols., 1988; Zamboni e cols., 1992).

A perda sistêmica dos hormônios esteroides no período pós menopausa, ou por ooforectomia bilateral está associada ao aumento de doenças metabólicas tanto em humanos quanto em animais (Tchernof e cols., 2004). É importante destacar também a importância dos receptores de E₂ e da aromatase em tal observação. Pesquisas realizadas com animais *knockout* para ER- α ou aromatase, revelaram hiperplasia e hipertrofia de tecido adiposo, assim como, intolerância à glicose em ambos os sexos (Heine e cols., 2000; Jones e cols., 2000). Assim, inicialmente, verificamos em nosso estudo que a castração cirúrgica, com conseqüente redução dos níveis hormonais, promovem descontrole metabólico ocasionando elevação do peso final dos animais, sendo já verificado em trabalhos anteriores, maior adiposidade central destes animais (Fortes, 2010). Este ganho é proporcional ao tempo de privação ao qual foram submetidos os animais. Em nossa pesquisa, animais com 8 meses pós castração mostraram ganho de peso superiores aos demais tempos (figura 19).

Verificamos também que a remoção ovariana provocou cessação dos ciclos estrais das ratas em estudo, ratificado por esfregaço vaginal segundo (Marcondes e cols., 2001a). A confirmação de 10 dias em ausência completa de ciclos estrais, caracterizado por presença maciça de leucócitos e muco nos esfregaços vaginais, determinando uma fase anovulatória (diestro), fato já verificado e confirmado através de dosagens plasmáticas de E₂ em estudos anteriores de nosso laboratório (Fortes, 2010). De tal modo, cada animal foi considerado em anestro, sendo adotado como sucesso a remoção dos ovários abolindo

ciclos reprodutivos concomitante à redução dos níveis de E₂ e consequente atrofia uterina verificada pelo índice uterino (Bonilla-Becerra e cols., 2017; Fortepiani e cols., 2003) figura 20.

Os trabalhos apontam forte modulação estrogênica nas respostas adaptativas ao estresse emocional e metabólico e pouco se sabe sobre os mecanismos, substratos moleculares e neuroquímicos envolvidos. A CeA é considerada uma importante estrutura na mediação das emoções, tais como ansiedade e o estresse. A exemplo disso, a ablação bilateral das amígdalas em primatas promovem embotamento emocional (Fortepiani e cols., 2003; WEISKRANTZ, 1956). Vários estudos apontam ainda que a CeA está associada às respostas autônomas e neuroendócrinas ao estresse, como batimentos cardíacos, pressão sanguínea, defecação e secreção de corticosterona em vários animais (Iwata e cols., 1987). No presente estudo observamos que após 24h de microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA de animais com cirurgia fictícia de duas semanas houveram reduções dos níveis basais de PAM e maior resposta taquicárdica observada ao estresse por contenção/jato (Figura 21A e B). Os animais com duas semanas de OVX, também exibiram reduções dos valores basais de PAM somando-se a reduções basais da FC (figura 23-A e B), apresentando respostas taquicárdicas ainda maiores ao estresse no dia da microinjeção e ainda mais elevadas 24 horas após. Contudo, as análises sobre os deltas de variações dos valores de PAM e FC desses animais, durante a exposição ao estresse por contenção/ jato de ar, mostraram que animais ooforectomizados exibem respostas pressóricas e taquicárdicas maiores que animais sham, 24 h após E₂ (figura 24 A e B). Classicamente é documentado na literatura que os estrógenos exercem suas ações de duas maneiras distintas, uma ação rápida (não genômica) e uma outra ação lenta (genômica) que pode levar horas à dias para ocorrer (Beato, 1989; Deroo & Korach, 2006). Observam-se em nossos resultados que as respostas autonômicas foram verificadas apenas 24 horas após micro injeções de E₂ na CeA, o que pode ser interpretado com ações do tipo genômica para tal manifestação.

Na tentativa de identificar qual receptor seria responsável por nossas observações administramos o mesmo volume e concentração de agonista seletivo de receptores ER-β. Verificamos que após administração de DPN (0,5 pmol/ 100 nl) em animais sham (2 semanas) houve apenas redução no valor basal da PAM 24h após tratamento com DPN, mas ao mesmo tempo, observamos redução do valor basal no dia de administração do DPN, o que torna difícil a discussão de nossos dados. Não observamos qualquer alteração

sobre a resposta da FC (figura 26 A e B). Já para animais do grupo OVX, nota-se redução do nível basal de PAM 24h após a microinjeção de DPN bem como redução no valor de FC basal (figura 28 A e B). Entretanto, quando analisamos os deltas de variações tanto da PAM quanto da FC não observamos quaisquer diferenças entre os grupos estudados. Tal observação pode ser traduzida como maior participação dos receptores α à receptores β sobre as respostas autonômicas decorrentes do estresse. Vale destacar que as atividades dos receptores de E_2 apresentam diferenças no SNC e, que existe na CeA, menor incidência de receptores do tipo ER- β quando comparados ao tipo α , o que também explicaria os menores efeitos ligados à receptores do tipo β (Lee e cols., 2006; Merchenthaler e cols., 2004). Vale destacar que através de ER- α o estradiol tem regulação positiva na imunoreatividade em receptores NMDA (Morissette e cols., 2008) e negativa sobre receptores AMPA (Le e cols., 2006), já através de ER- β o DPN não regula atividades de receptores glutamatérgicos.

Sabemos que na menopausa ou em situações que envolvam a perda da função ovariana começa a se estabelecer um quadro de hipoandrogenismo. Com isso, a hipófise anterior secreta maiores volumes de LH e FSH devido à falta de regulação por retroalimentação negativa de estradiol, caracterizando um estado de hipogonadismo hipergonadotrófico e um aumento na expressão nos RE hipotalâmicos (Butler & Santoro, 2011). Dessa forma, a maior resposta ao estresse vista nos animais OVX poderia ser explicada através de um maior número de RE em resposta ao desequilíbrio hormonal desencadeado pela menopausa cirúrgica em um período curto após a perda da função ovariana. Verificamos, então, que a resposta ao estresse por contensão/ jato de ar, pode apresentar dependência de ações locais de E_2 na CeA. Destacam-se ainda que os estrogênios podem modular a expressão de outros tipos de receptores via sistema de segundo mensageiro, como receptores noradrenérgicos, serotoninérgicos, ocitocinérgicos e catecolaminérgicos. Uma maior expressão de receptores catecolaminérgicos determinada pela administração local E_2 poderia ser a resposta para a maior responsividade ao estresse por contensão/jato de ar observada 24h após microinjeção *in situ* de E_2 . Já os padrões bradicárdicos observados 24h após E_2 poderiam ter participação da vasopressina, haja vista que já foi caracterizado presença de receptores de $V1_A$ de vasopressina na CeA e, interessantemente, a vasopressina (AVP) se liga em igual afinidade à receptores de ocitocina (OTX) também já identificados na CeA, e produz respostas bradicárdicas e de imobilidade em situações estressantes como já verificado em

roedores (Roozendaal e cols., 1992). Ademais, estudos mais antigos demonstraram que estradiol é capaz de excitar neurônios ocitocinérgicos, mas não vasopressinérgicos (Akaishi & Sakuma, 1985a), contudo em 1995, Wang e colaboradores demonstraram que estradiol induz a secreção de ocitocina e AVP dos dendritos e corpo celular em neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico (Wang e cols., 1995). Assim, observa-se fortes modulações do E₂ sobre os sistemas ocitocinérgicos e vasopressinérgicos, exercendo alterações sobre o sistema autonômico no controle da PAM e FC.

Baseado nesses achados, através de qual circuito neural a CeA exerceria as influências autonômicas observadas?

É referenciado na literatura, que a CeA recebe projeções diretas de uma gama de regiões cerebrais. Regiões corticais como córtex insular, ou córtex frontal e outras projeções que atingem a CeA de maneira indireta, oriundas do córtex temporal, giro do cíngulo, tálamo e outros núcleos subcorticais (Price & Amaral, 1981; Russchen, 1982). Ademais, a CeA também ganha projeções intra-nucleares dos núcleos basolateral e medial do complexo amigdalóide (Krettek & Price, 1978). Outro ponto a se destacar é que a CeA faz projeções neuronais diretas para áreas cardiovasculares do tronco encefálico em tal proporção que sugere uma forte influência sobre a função cardiovascular e respiratória (Zhang e cols., 1986). Pesquisas realizadas em gatos mostram aumentos da PAM e FC após estimulação da CeA (Frysinger e cols., 1984) e que sua crio-lesão em gatos evoca uma resposta depressora e bradicárdica após esse procedimento (Zhang e cols., 1986).

Trabalhos como o de Bruce em 1982 e Applegate em 1983 que mostraram em experimentos com coelhos que a estimulação elétrica de baixa intensidade desencadeia respostas bradicárdicas e hipotensoras seguido de elevação de frequência respiratória bem como midríase pupilar, e a administração de metil-atropina (5 mg/kg I.V.) aboliu tais observações. (Applegate e cols., 1983; Kapp e cols., 1982). O que ao nosso entendimento indica ativação de regiões de projeções parassimpáticas.

Estudos realizados em ratos, têm mostrado que a estimulação elétrica da CeA promove reações bradicárdicas e hipotensoras em animais anestesiados (Mogenson & Calaresu, 1973). (Galeno & Brody, 1983) demonstraram após estimulação elétrica da CeA profundas respostas cardiovasculares, incluindo bradicardia, mudanças pressóricas e de fluxo sanguíneo em leitos vasculares como renal e mesentérico. Outra característica

observada nesse trabalho é que a estimulação da CeA apresenta um efeito máximo em animais acordados, mas estados de sono ou em animais anestesiados as respostas são atenuadas ou mesmo abolidas, mostrando que o estado cerebral apresenta grande influência sobre as respostas da CeA (Galeno & Brody, 1983). Jiro Iwata e seus colaboradores, demonstraram em 1987, respostas depressoras e bradicárdicas após estímulos elétricos na CeA em animais anestesiados, e em animais acordados, a microinjeção de L-glutamato na CeA provocou elevação de PA e FC, bem como a estimulação elétrica. (Iwata e cols., 1987).

Com isso, acreditam-se que os aumentos pressóricos e de frequência nos animais acordados sejam atribuídos à neurônios locais e não fibras de passagem (Iwata e cols., 1987). Essas variações nos resultados obtidos poderiam ser devidas à diferenças das espécies de animais utilizadas, nas vias ativadas ou estado do animal (anestesiado ou acordado) (Yamanaka e cols., 2017b). Na tentativa de elucidar essa questão Yamanaka e colaboradores obtiveram resultados pressóricos e taquicárdicos após estimulação elétrica e estimulação química através da microinjeção de um antagonista GABA_A (bicuculina) bem como os mesmos resultados para lesões eletrolíticas dessa região (Yamanaka e cols., 2017b). Outras regiões do complexo amigdalóide estimuladas, como a BLA, exibiram manifestações hipotensoras e bradicárdicas (Yamanaka e cols., 2017b). Yamanaka concluiu então que a depender da região estimulada do complexo amigdalóide pode ocorrer tanto respostas hipotensoras e bradicárdicas como hipertensora e taquicardias (Yamanaka e cols., 2017b).

Os padrões de descarga dos neurônios da CeA estão correlacionados aos ciclos cardíacos e respiratórios. As descargas espontâneas da CeA são alteradas após estimulação elétrica do seio carotídeo, nervo depressor aórtico, baro e quimiorreceptores. Dessa maneira o CeA participaria de um controle parcial da regulação cardiovascular (Cechetto e cols., 1983; Cechetto & Calaresu, 1983).

Vale notar que tais respostas autonômicas observadas em estimulações elétricas ou químicas da CeA, fazem parte de processos naturais em situações de estresse mental ou físico, como um encontro com o inimigo, que determina uma situação conhecida como luta ou fuga, que induz drásticas alterações da PAM e FC. Essas alterações fazem parte de um conjunto de mudanças cardiovasculares que são coordenadas autonomicamente

(simpático ou parassimpático) associadas com comportamentos defensivos (Yamanaka e cols., 2017b).

Como já discutido previamente, em situações de estresse, o estímulo estressor chega ao sistema nervoso central (SNC) através dos órgãos dos sentidos e a resposta a esses estímulos passam através do complexo amigdalóide o qual funciona como um gatilho para as respostas hipotalâmicas. Por meio da liberação hormônios-liberadores de corticotropina (HLC) ativam o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), que por sua vez secreta hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise atuando sobre o córtex das glândulas suprarrenais incitando a liberação de glicocorticoides que são extremamente importantes para a adaptação ao estresse (Nemeroff, 1996; Raglan e cols., 2017).

Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição por retroalimentação negativa da secreção do ACTH pela pituitária e do HLC a partir do hipotálamo (Pariante & Miller, 2001). Ocorre simultaneamente a liberação de catecolaminas pelas medulas das suprarrenais que facilitam reações imediatas associadas à uma preparação muscular violenta. Não obstante, praticamente os mesmos estímulos que iniciam a resposta do eixo HPA também promovem a ativação do sistema catecolaminérgico central, com envolvimento principal do A6, que se acredita seja importante na coordenação das respostas endócrinas e cognitivas ao estresse (Valentino & Van, 2008).

É de extrema importância salientar que o E₂ após ligação em seus receptores específicos pode modular a funcionalidade de outros receptores específicos, como por exemplo o aumento da expressão de receptores glutamatérgicos NMDA, bem como o aumento de espinhas dendríticas na região CA1 e CA3 do hipotálamo (Gazzaley e cols., 1996; Gould e cols., 1990) e do núcleo medial da amígdala (Rasia-Filho e cols., 2004).

Com a perda da função ovariana, pode ainda haver influências diretas sobre sistema serotoninérgico, colinérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, ocitocinérgico e vasopressinérgico (Norbury e cols., 2003). Essas alterações são restauradas após administração de estradiol. (Gazzaley e cols., 1996; Gould e cols., 1990). Interessantemente o estradiol modula a atividade GABAérgica apresentando função inibitória (Murphy e cols., 1998).

Pensando-se, então, que através das projeções GABAérgicas ao apresentarem-se “inibidas” após microinjeções *in situ* de E₂ (0,5pmol/100 nl) na CeA deixando regiões excitatórias do NTS, livres para estimular a região caudal-ventrolateral da medula (CVLM) e os neurônios desta área uma vez excitados irão promover a inibição de neurônios localizados na porção anterior do bulbo ou RVLM, desencadeando uma resposta hipotensora e bradicárdica. Por outro lado, já é referenciado na literatura a modulação pelo estradiol em neurônios glutamatérgicos e catecolaminérgicos. Existem projeções tanto GABAérgicas quanto glutamatérgicas da CeA diretamente para o RVLM que também estariam moduladas pela microinjeção de E₂ favorecendo as respostas hipotensoras e bradicárdicas observadas (Boulware e cols., 2005). Em outra análise, o NTS livre de modulações GABAérgicas provindas da CeA, estaria livre para exercer atividades excitatórias sobre o núcleo dorsal do vago, acentuando ou favorecendo as respostas bradicárdicas.

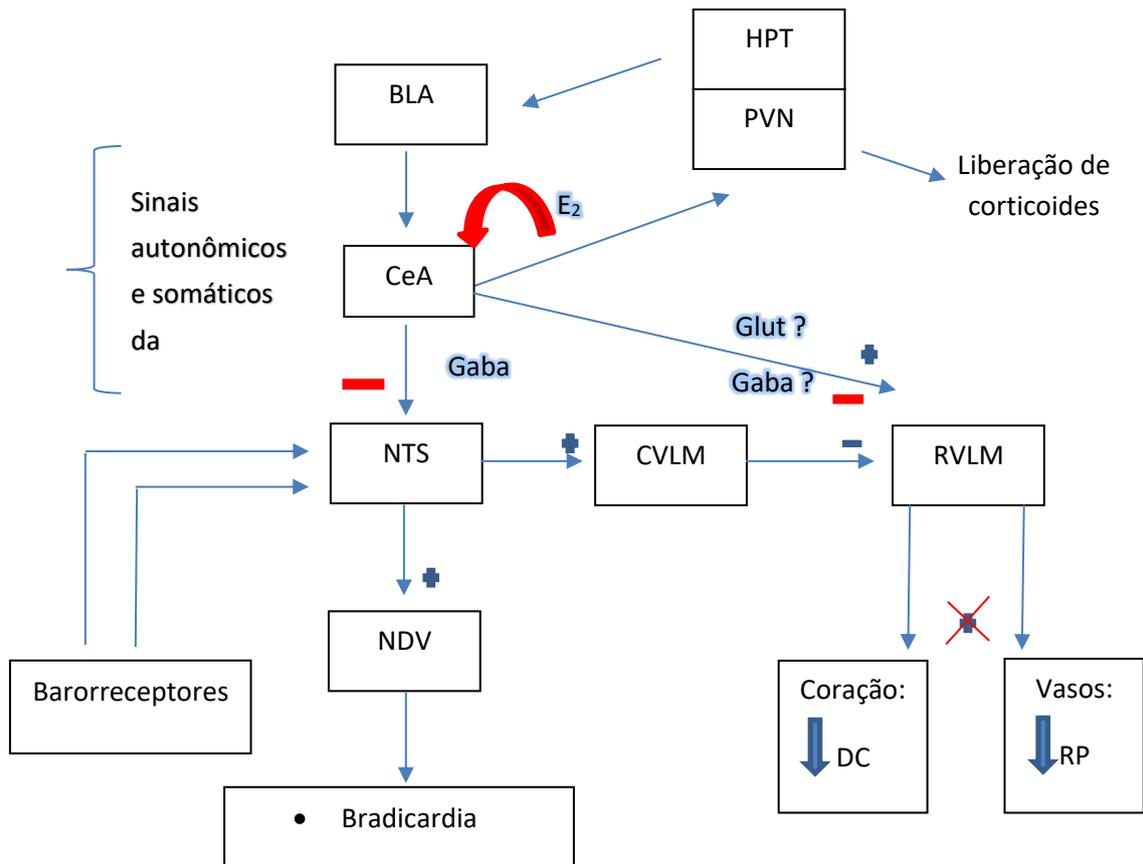


Figura 49: Figura esquemática da participação do estradiol nas respostas autonômicas observadas neste estudo após microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA . A redução da atividade GABAérgica da CeA sobre o NTS facilitaria o estímulo do NTS sobre o CVLM que atua modulando neurônios do RVLM. Dessa forma a atividade simpática é regulada. Por outro lado, o NTS livre de modulação GABAérgica pode excitar o núcleo dorsal do vago (NDV) modulando também a atividade parassimpática.

Com relação às análises realizadas sobre os animais pertencentes aos grupos 2 meses, ressaltamos no grupo sham, redução do valor basal de PAM 24 h após E₂, não sendo notada alteração para o valor de FC assim como verificado nos animais com duas semanas (figura 31 A e B). Para os animais com dois meses de OVX foram observados os mesmos padrões de respostas, mas com reduções nos níveis basais de PAM e FC 24h após E₂ (figura 33 A e B). Os Deltas de variações desses animais nos mostram novamente, porém de maneira mais discreta, que 24h após microinjeção de E₂ temos maior responsividade ao estresse nos animais sham (figura 34 A e B). Mostrando, assim, redução nas respostas observadas anteriormente nos animais OVX.

Para os animais sham, do grupo 8 meses, percebemos discreta redução do valor de PAM e um efeito pressórico e taquicárdico mínimo 24h após E₂ (figura 36 A e B). De maneira similar, os animais com oito meses de OVX, exibiram discretas alterações sobre PAM e FC (Figura 38 A e B).

Entretanto quando analisamos o gráfico contendo os deltas de variações de PAM e FC para os três tempos de OVX, percebemos nitidamente que quanto maior o tempo sob um estado de hipoestronismo, mais acentuada é a resposta ao estresse após tratamento *in situ* de E₂ (figura 40). Não foram observadas quaisquer alterações sobre os valores obtidos para os animais sham (dados não mostrados).

Com esses dados, observamos que com o passar do tempo as respostas ao tratamento *in situ* com E₂ diminui. De fato, alguns estudos têm apontado que a partir de 1 semana de perda da função ovariana e o declínio gradual nos níveis séricos do hormônio, a expressão de receptores ER- α começa a ser reduzida em regiões cerebrais como hipocampo chegando 40% ao final de oito semanas, porém tal redução não acontece com os receptores ER- β (Zhang e cols., 2009; Qu e cols., 2013; Zhang e cols., 2011). Fato esse que nos ajuda a explicar a redução das respostas dos animais aos dois meses e praticamente a sua abolição ao estresse com 8 meses e a perceber que os dois receptores para E₂ podem ter diferentes ações nas mudanças patológicas induzidas pelo déficit hormonal.

Sabemos que os estrógenos desempenham um importante papel contra doenças cardiovasculares. Dessa maneira, a incidência de doenças cardiovasculares é reduzida em mulheres na pré-menopausa quando comparadas a mulheres na pós menopausa e homens de idade pareada (Kannel e cols., 1976; Reckelhoff, 2001) e a TRH pode reduzir substancialmente esse risco (Prelevic & Jacobs, 1997). Embora o estrogênio tenha pouco efeito sobre a PAM de mulheres normotensas na pós-menopausa, houve redução na PAS e PAD de 24 h (Regensteiner e cols., 1991) e PAM em resposta ao exercício em mulheres na pós-menopausa com leve hipertensão (Pines e cols., 1996). Respostas similares têm sido obtidas em animais experimentais como a redução de PAM em modelos genéticos e não genéticos de hipertensão (Crofton & Share, 1997; Fortepiani e cols., 2003; Reckelhoff & Fortepiani, 2004). Ainda paira muitas dúvidas sobre quais os mecanismos cardioprotetores que os estrógenos exercem para promover esses benefícios. Efeitos sobre metabolismo de lipoproteínas, glicose, efeitos cardíacos diretos, efeitos vasculares bem

como efeitos sobre o SNC exercendo modulações sobre o sistema nervoso autonômico (simpático ou parassimpático).

Se tratando da TRH, após publicações de dois conhecidos estudos de coorte *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study* (HERS) (Hulley e cols., 1998) e *Women's Health Initiative* (WHI) (Rossouw e cols., 2002) e em 2004 (Anderson e cols., 2004) marcou a fase de TRH e estabelecimento de alguns critérios, tais como idade, haja vista que nem todas as mulheres que recebiam terapia hormonal se beneficiavam do tratamento.

Em análise do estudo WHI, observa-se que o desfecho negativo dos tratamentos se deve principalmente à idade avançada das pacientes no início do tratamento (63 anos), altas doses, e tempo decorrido da última menstruação. Atentando a esses dados e de outros estudos observacionais, concluiu-se que se iniciarmos TRH em uma paciente transcorrido 10 anos da menopausa, há um risco elevado de eventos cardiovasculares. Essa constatação atribuiu-se como janela de oportunidade (Lobo, 2013).

Em nosso modelo experimental, não realizamos a TRH, porém o estradiol foi administrado localmente em um núcleo cerebral, componente do sistema límbico responsável por interação de respostas às situações estressantes. Observamos que as respostas bradicárdicas, hipotensoras foram modificadas pela administração de E₂, apresentando-se mínimas aos 8 meses. Contudo, as respostas taquicárdicas e pressóricas ao estresse por contenção/jato de ar foram reduzidas nos animais com OVX de oito meses quando comparados aos animais com tempos inferiores. Isso mostra que o tempo de ovariectomia também afeta negativamente as respostas do SNC à uma posterior TRH.

Se este período crítico, para o início do tratamento está relacionado com a diminuição da responsividade dos neurônios para o estrogênio com a idade crescente, ou com a incapacidade de o hormônio reverter a perda neuronal, e ou a disfunção que pode ter ocorrido, durante o intervalo entre a menopausa e o início da TRH ainda não está completamente elucidado. No entanto, dada a riqueza de achados de pesquisa animal e humana que apoiam esta observação, estas são questões para prosseguir no futuro (Sherwin, 2006).

Com relação aos aspectos cognitivos, várias metanálises, estudos observacionais e também realizados com animais mostram que os estrógenos prescritos em mulher jovem, na perimenopausa, acarretam em um risco reduzido de desenvolvimento de

Alzheimer ou mesmo retarda seu aparecimento. Mesmo para esses casos há um “*timing*” crítico para a TRH, como o observado para doenças cardiovasculares. Sendo que, a TRH após os 60 anos não apresenta efeitos benéficos sobre a memória (Lobo, 2013). A reposição hormonal pode ter diferentes efeitos sobre o SNC dependendo da idade da paciente, tipo de menopausa (natural ou induzida) e o tipo de reposição utilizada (Rozenberg e cols., 2013).

Dentre as desordens comportamentais existentes nos estudos que analisam as flutuações de estradiol, os transtornos de ansiedade e as desordens cognitivas são sempre citados.

Avaliando o comportamento do tipo ansiedade, estudado através da resposta de esQUIVA inibitória em animais sob experimentação, após 2 semanas de OVX ou sham, verificamos que animais OVX apresentaram tempo de latência de saída do braço fechado maiores que animais sham, após microinjeção bilateral de salina na CeA em ambos os grupos (figura 41). Tal observação sugere que animais castrados com reduções de hormônios gonadâis apresentam comportamento mais ansioso do que àqueles apresentados pelos animais sham, com flutuações hormonais normais. De fato, já no século passado, Anastasia Sfikakis (1977) mostrou em experimentos com ratos que as flutuações hormonais ocorridas durante o ciclo estral alteravam o comportamento dos animais nos testes. Animais em proestro, fase essa, caracterizada por altas concentrações de E₂, apresentavam comportamento menos ansioso, mostrando tempo de esQUIVA reduzido em comparação às outras fases do ciclo (Sfikakis e cols., 1978). Marcondes e colaboradores fazendo uso de outras metodologias para testarem comportamentos de ansiedade, como em labirinto em cruz elevado, mostraram que animais no proestro apresentam comportamento de ansiedade reduzido em comparação aos animais de outras fases do ciclo estral (Marcondes e cols., 2001b). Em outros estudos no labirinto em cruz elevado, quando comparadas a machos, apresentam o tempo de permanência no braço aberto maiores, o que indica menor ansiedade (Johnston & File, 1991b). Trabalhos recentes do laboratório de fisiologia Cardiovascular (LFC), realizados em animais sob restrição alimentar, em um modelo animal de anorexia, levando a um descontrole da homeostase hormonal e a um quadro de ansiedade, elevando o tempo de latência de saída do braço fechado quando comparado à animais com dieta controle (Campos G.S.V., 2015).

A influência do gênero, ciclo reprodutivo e hormônios gonadais, sobre situações diferentes da reprodução, têm sido observadas em humanos e em laboratório, principalmente sobre respostas fisiológicas a situações de estresse (Marcondes e cols., 2001b).

Como já referido, a presença do estradiol afeta a modulação de diversos outros tipos de receptores. Uma ativação de receptores serotoninérgicos pode resultar em respostas ansiolíticas ou ansiogênicas, a depender do subtipo de receptor, e estruturas cerebrais ativadas. Pesquisas tem sugerido que um aumento da atividade serotoninérgica tem efeito ansiogênico em ratos (Gerhardt & van, 1997). Biegon demonstrou em 1980 que a depender da fase do ciclo estral, há uma diferença nos números de receptores de serotonina (5-HT_{1A}) em diferentes regiões do SNC, havendo redução em até 50% na fase proestro quando comparado ao diestro (Biegon e cols., 1980), com redução nas concentrações de receptores nas regiões hipotalâmicas, límbica e mesencefálica (Kueng e cols., 1976). Outro ponto é que o E₂ também modula a síntese e liberação de serotonina através do aumento da atividade do transportador de serotonina (SERT) e ainda regula a frequência de disparo de neurônios serotoninérgicos (Dalmaso e cols., 2011; Sanchez e cols., 2010). Sabemos também que o NDR faz projeções serotoninérgicas diretas para a BLA que tendem a aumentar o comportamento do tipo ansioso. O efeito ansiolítico do estradiol através desta via parece estar ligado ao fato deste estrógeno aumentar a expressão dos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}, que atua em seus auto-receptores no NDR com características inibitórias, o que causa redução da excitabilidade destes neurônios e, conseqüentemente, reduz a atividade da via .(Andrade e cols., 2005). Em conjunto estas análises apontam para forte modulação da atividade serotoninérgica em diferentes regiões do SNC o que poderia explicar baixos níveis de ansiedade em animais com concentrações séricas de estradiol mais altas.

A ocitocina é outro hormônio considerado por muitos pesquisadores ansiolítico, como já observado em estudos com camundongos. Sabe-se que o E₂ pode aumentar seus efeitos (McCarthy e cols., 1996), e a presença de receptores de ocitocina já foi verificada na CeA (Roozendaal e cols., 1992). Trata-se de um neuropeptídeo de nove aminoácidos sintetizado principalmente por núcleos hipotalâmicos e liberados através da porção posterior da glândula pituitária, apresentando efeitos versáteis, como já descrito. Inicialmente proposto como um importante ativador na lactação, e participação nas contrações uterinas (HAWKER & ROBERTSON, 1957). Diferentes estímulos levam à

secreção de ocitocina: trabalho de parto, em resposta a sucção do mamilo da mãe durante a lactação, osmolaridade, (Lucio-Oliveira & Franci, 2012), durante orgasmo e ereção peniana (Caldwell, 1992). Nos últimos anos tem sido verificado que situações de estresse agudo levam ao aumento da secreção de ocitocina em humanos (Pierrehumbert e cols., 2010) bem como em roedores também tem sido verificada essa elevação apresentando efeitos ansiolíticos, diminuindo ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Windle e cols., 2004). O tratamento de animais com estradiol aumenta o número de locais de ligação para ocitocina em sítios como núcleo ventromedial do hipotálamo e complexo amigdalóide (de Kloet e cols., 1985; Patchev e cols., 1993). Dessa maneira, animais OVX tendem a apresentar redução dos sítios de ligação para ocitocina em resposta ao declínio hormonal e aumento de sítios de ligação 5-HT_{1A} o que seria a, em parte, responsável por maior ansiedade nesses animais.

Para o parâmetro de fuga, que nos indica respostas do tipo pânico, avaliado através da medida do tempo de latência de saída do braço aberto do LTE, não observamos qualquer alteração neste teste entre animais Sham e OVX que receberam tratamento salina (figura 42). Corroborando com nossos resultados, (Daendee e cols., 2013) demonstraram em animais castrados que o tempo de fuga do braço aberto do LTE, não se altera em diferentes tempos de OVX. Entretanto, em outras pesquisas, animais sham no proestro (com flutuações normais de E₂) tiveram aumento no tempo de latência de saída do braço aberto do LTE, indicando comportamento mais panicolítico (Pandaranandaka e cols., 2009).

O teste de memória de esquiwa inibitória, realizado 24h após os testes comportamentais no LTE, mostrou que após duas semanas de OVX, houve maior tempo de latência na esquiwa no braço fechado, indicando que o estímulo de ansiedade se manteve 24 h após, em comparação ao grupo sham (figura 43). Em adição, novamente não observamos alterações nos padrões de comportamento de fuga.

Em resposta a microinjeção de E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA, animais OVX mostraram tempo de latência de saída do braço aberto maiores (esq 2 da figura 45) em comparação aos animais sham. Dado que mostra que a microinjeção de E₂ na CeA não foi capaz de reduzir o tempo de saída do braço fechado dos animais OVX no LTE, caracterizando os animais OVX como mais ansiosos e que o E₂ não atua diretamente na CeA como um substrato ansiolítico. Entretanto, estudos do LFC, mostraram que o

tratamento com E₂ no núcleo dorsal da rafe (NDR) reduz comportamentos ansiosos em ratas com restrição alimentar e níveis hormonais reduzidos (Campos G.S.V., 2015).

Já o comportamento de pânico para esses animais sob microinjeção com E₂, observamos que em animais sham houveram reduções no tempo de latência de saída do braço aberto, indicando um comportamento panicolítico comparado aos animais OVX que também receberam E₂. De fato, foi observado que o tratamento agudo com E₂ pode exercer ações panicogênicas ao invés de panicolíticas, porém essa premissa foi observada em animais OVX e não em animais sham (Kalandakanond-Thongsong e cols., 2012b). Importante lembrarmos que em nosso trabalho mesmo a análise entre animais sham tratados com salina e animais sham tratados com E₂, aqueles tratados com E₂ tiveram seu tempo de fuga do braço aberto do LTE reduzidos, confirmando tal comportamento panicolítico.

Já em relação ao teste de memória de esQUIVA inibitória no LTE realizados com 24h mostrou que os animais OVX, mesmo após tratamento com E₂ na CeA, permaneceram com tempo de latência de saída do braço fechado maiores que os observados para os animais sham que receberam E₂. Dado esse que nos remete não prejuízo da memória em relação ao dia precedente.

A reexposição dos animais ao teste de fuga (o que não se caracteriza como memória no LTE) levou a redução no tempo de fuga dos animais sham que receberam E₂ em relação aos animais OVX que receberam E₂, mantendo o mesmo padrão do dia anterior.

Por fim, quando efetuamos a análise separadamente dos tempos que esQUIVA inibitória dos animais OVX que receberam salina ou E₂. Observamos no teste (esq 2) elevação no tempo de latência de saída do braço fechado nos animais que receberam tratamento com E₂, indicando comportamento mais ansioso desses animais. Diferindo de dados da literatura que mostram que o tratamento agudo ou crônico reduz o tempo de saída do braço fechado, (Kalandakanond-Thongsong e cols., 2012b) observamos que após tratamento *in situ* na CeA, esse tempo torna-se elevado (figura 47). Vale lembrarmos que dentre as vias de efeitos mediados pelos estrógenos, gênômica e não gênômica o tempo de ação pode levar de 5 a 15 min na via não gênômica a 3 horas na via gênômica. Então é possível que alguns efeitos comportamentais poderiam ser observados em curto

prazo e outros não, já que alguns estudos têm administrado E₂ 48h antes dos testes comportamentais (Walf & Frye, 2005).

Já em relação ao teste de memória, analisamos o teste (esq 2), e comparamos ao tempo de esquiiva inibitória 24h após (memória). Observamos que para os animais OVX o padrão de ansiedade medido pelo tempo de latência de saída dos braços fechados não se altera, mostrando que não houveram alterações rápidas atribuídas serem não genômicas nem posteriores, genômicas.

Concluimos, assim, que o tratamento *in situ* na CeA não alterou o comportamento de ansiedade observado nos animais OVX em 20min e nem após 24h. Contudo observamos reduções nos tempos de fuga do braço aberto em animais sham.

Estendendo-se a análise comportamental agora para a locomoção dos animais em campo aberto, observamos que animais após duas semanas de OVX apresentam distância de ambulação inferiores às distâncias percorridas pelos animais sham, e que após 20 minutos da microinjeção bilateral de E₂ (0,5 pmol/100 nl) o padrão de locomoção nos animais OVX se iguala aos animais sham (figura 48 A e B). De fato, é bem documentado na literatura que os estrógenos regulam atividade locomotora em roda tanto em fêmeas quanto em machos. Somando-se a isso, fêmeas são mais ativas no proestro, fase em que são encontradas maiores concentrações hormonais (Al-Mohaisen e cols., 2000; Wollnik & Turek, 1988). Entretanto, trabalhos realizados em fêmeas jovens gonadectomizadas e machos, o tratamento com estradiol tem sido relatado aumentar a atividade locomotora revertendo os efeitos deletérios sobre o corpo (Akaishi & Sakuma, 1985b; Rodier, III, 1971; Greising e cols., 2011).

Em 1975, Blizard realizando testes em campo aberto mostrou que, após castração cirúrgica de ratas, essas passam a ter um padrão de locomoção inferiores, igualando à locomoção observada em machos, que são naturalmente menos ativos neste teste (Blizard e cols., 1975b).

O estradiol pode controlar a atividade locomotora ou na roda através de diversos mecanismos. É importante ressaltar que a atividade locomotora em campo aberto é realizada em um ambiente não familiar para o animal, o que poderia trazer efeitos emocionais e de comportamento para o teste e a atividade em roda é avaliada em sua própria gaiola. Interessantemente, a administração de E₂ na área pré-óptica medial

(mPOA) aumentou a atividade em roda, porém não modificou os padrões de locomoção em campo aberto (Fahrbach e cols., 1985). Com esses dados, parece que a regulação estrogênica sobre a atividade em roda está primeiramente localizada na mPOA, enquanto a atividade locomotora no campo aberto pode estar localizada em outras regiões cerebrais (Ogawa e cols., 2003).

É importante sempre lembrarmos que dois tipos diferentes de receptores para o E₂ são expressos nas mais variadas partes do SNC, o ER- α e o ER- β , e que podem apresentar diferentes ações quando estimulados. Pensando nisso, Ogawa e colaboradores em 2003, fazendo uso de animais *Knockout* para receptores ER- α ou ER- β mostraram que a deleção de receptores ER- α induz à menor atividade locomotora em campo aberto e roda quando comparados a camundongos selvagens e também aos animais KO para ER- β . (Ogawa e cols., 2003).

Partido desse ponto, e que a CeA é uma importante área de controle emocional em situações estressoras e com presença marcante de receptores ER- α (Merchenthaler e cols., 2004; Shughrue e cols., 1997), concluímos que de certo modo a ação direta de E₂ possivelmente em receptores do tipo ER- α na CeA alteram o padrão de locomoção desses animais. Vale destacar que fazendo uso do programa *Image J* o do *plugin Animal Tracker* foi possível avaliar também a velocidade de locomoção que se mostrou diretamente proporcional à distância percorrida dos animais. Além de se locomoverem por menor distância, os animais OVX se locomoveram mais lentamente quando comparados aos animais sham e após administração in situ de E₂ tanto locomoção quanto a velocidade de ambulação das ratas ficaram semelhantes.

6- CONCLUSÃO

Este estudo indica que a microinjeção de estradiol na CeA foi capaz de produzir reduções da PAM e FC basais, 24 horas após sua administração, tanto em animais sham quanto em animais OVX com 2 semanas de cirurgia. Ao passar de dois meses, as respostas hipotensoras e bradicárdicas tornaram-se reduzidas até se anularem aos oito meses. Notamos através os deltas de variações da PAM e FC que animais sob maiores tempos de OVX apresentam máximas respostas hipertensoras e taquicárdicas ao estresse 24 horas após administração de estradiol. Observamos nos testes comportamentais que animais OVX apresentam maior grau de ansiedade com elevação tempo de latência de saída do braço fechado e que apesar de inúmeros trabalhos mostrarem efeitos ansiolíticos do

estradiol em outras regiões cerebrais, quando o administramos diretamente na CeA não exibiu tais efeitos, apresentando, em contrapartida, certo potencial ansiogênico em animais OVX. Lembramos ainda que animais OVX se locomovem menos e mais lentamente que animais sham e a microinjeção E₂ (0,5 pmol/100 nl) na CeA foi capaz de normalizar os padrões de ambulação e velocidade dos animais. Concluimos que, o estradiol atuando na CeA, exerce forte modulação em respostas autonômicas cardíacas tanto em valores basais quando em respostas a situações estressoras, provavelmente através de receptores do tipo ER- α e que também desempenha importante papel no controle das atividades locomotoras dos animais atuando na CeA.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU A.R., DE ABREU A.R., SANTOS L.T., DE SOUZA A.A., DA SILVA L.G.J., CHIANCA D.A., Jr. & DE MENEZES R.C. (2014) Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. *Neuroscience* **262**, 21-30.
- AKAISHI T. & SAKUMA Y. (1985a) Estrogen excites oxytocinergic, but not vasopressinergic cells in the paraventricular nucleus of female rat hypothalamus. *Brain Res.* **335**, 302-305.
- AKAISHI T. & SAKUMA Y. (1985b) Estrogen excites oxytocinergic, but not vasopressinergic cells in the paraventricular nucleus of female rat hypothalamus. *Brain Res.* **335**, 302-305.
- AL-MOHAISEN M., CARDOUNEL A. & KALIMI M. (2000) Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. *Steroids* **65**, 8-15.
- AMIRAGOVA M.G. (1985) Neurophysiological analysis of the development of endocrine and hypertensive reactions in prolonged emotional stress. *Brain Res.* **344**, 303-315.
- ANDERSON G.L., LIMACHER M., ASSAF A.R., BASSFORD T., BERESFORD S.A., BLACK H., BONDS D., BRUNNER R., BRZYSKI R., CAAN B., CHLEBOWSKI R., CURB D., GASS M., HAYS J., HEISS G., HENDRIX S., HOWARD B.V., HSIA J., HUBBELL A., JACKSON R., JOHNSON K.C., JUDD H., KOTCHEN J.M., KULLER L., LACROIX A.Z., LANE D., LANGER R.D., LASSER N., LEWIS C.E., MANSON J., MARGOLIS K., OCKENE J., O'SULLIVAN M.J., PHILLIPS L., PRENTICE R.L., RITENBAUGH C., ROBBINS J., ROSSOUW J.E., SARTO G., STEFANICK M.L., VAN H.L., WACTAWSKI-WENDE J., WALLACE R. & WASSERTHEIL-SMOLLER S. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **291**, 1701-1712.
- ANDRADE T.G., NAKAMUTA J.S., AVANZI V. & GRAEFF F.G. (2005) Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT_{1A} receptors. *Behav. Brain Res.* **163**, 18-25.
- APPLEGATE C.D., KAPP B.S., UNDERWOOD M.D. & MCNALL C.L. (1983) Autonomic and somatomotor effects of amygdala central N. stimulation in awake rabbits. *Physiol Behav.* **31**, 353-360.
- BASSAN R. (1999) Alterações Cardiovasculares e Cardiopatologia da Menopausa. Efeitos da Reposição Hormonal. *Arq. Bras. Cardiol.* **72**, 85-71.
- BEATO M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.
- BEKKU N., YOSHIMURA H. & ARAKI H. (2006) Factors producing a menopausal depressive-like state in mice following ovariectomy. *Psychopharmacology (Berl)* **187**, 170-180.
- BIEGON A., BERCOVITZ H. & SAMUEL D. (1980) Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Res.* **187**, 221-225.
- BLIZARD D.A., LIPPMAN H.R. & CHEN J.J. (1975a) Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol Behav.* **14**, 601-608.

- BLIZARD D.A., LIPPMAN H.R. & CHEN J.J. (1975b) Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol Behav.* **14**, 601-608.
- BONILLA-BECERRA S.M., DE OLIVEIRA M.G., CALMASINI F.B., ROJAS-MOSCOLO J.A., ZANESCO A. & ANTUNES E. (2017) Micturition dysfunction in four-month old ovariectomized rats: Effects of testosterone replacement. *Life Sci.* **179**, 120-129.
- Botrel, T. E. A, Costa, R. D., Rosane, D., Costa, M. D, and Costa, A. M. D. Doenças cardiovasculares: causas e prevenção / Cardiovascular diseases: etiology and prevention. *Rev.bras.clín.ter* 3(26), 87-90. 2000. (GENERIC)
Ref Type: Magazine Article
- BOULWARE M.I., WEICK J.P., BECKLUND B.R., KUO S.P., GROTH R.D. & MERMELSTEIN P.G. (2005) Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J.Neurosci.* **25**, 5066-5078.
- BRAILOIU E., DUN S.L., BRAILOIU G.C., MIZUO K., SKLAR L.A., OPREA T.I., PROSSNITZ E.R. & DUN N.J. (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J.Endocrinol.* **193**, 311-321.
- BRINLEY-REED M., MASCAGNI F. & MCDONALD A.J. (1995) Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in the rat. *Neurosci.Lett.* **202**, 45-48.
- BUNGAY G.T., VESSEY M.P. & MCPHERSON C.K. (1980) Study of symptoms in middle life with special reference to the menopause. *Br.Med.J.* **281**, 181-183.
- BUTLER L. & SANTORO N. (2011) The reproductive endocrinology of the menopausal transition. *Steroids* **76**, 627-635.
- CALDWELL J.D. (1992) Central oxytocin and female sexual behavior. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **652**, 166-179.
- CAMPEAU S. & DAVIS M. (1995) Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J.Neurosci.* **15**, 2301-2311.
- Campos G.S.V. Influencia do estradiol sobre os transtornos de ansiedade em ratas Fischer submetidas à restrição alimentar. 2015. Universidade Federal de Ouro Preto. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- CECHETTO D.F. & CALARESU F.R. (1983) Response of single units in the amygdala to stimulation of buffer nerves in cat. *Am.J.Physiol* **244**, R646-R651
- CECHETTO D.F., CIRIELLO J. & CALARESU F.R. (1983) Afferent connections to cardiovascular sites in the amygdala: a horseradish peroxidase study in the cat. *J.Auton.Nerv.Syst.* **8**, 97-110.
- COMISSÃO FEDERATIVA DA TERMINOLOGIA ANATÔMICA (2001) *Terminologia anatômica internacional*. Primeira Edição Ed. São Paulo: Manole.

- CORNIL C.A. & CHARLIER T.D. (2010) Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *J.Neuroendocrinol.* **22**, 664-673.
- CROFTON J.T. & SHARE L. (1997) Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. *Hypertension* **29**, 494-499.
- CUI J., SHEN Y. & LI R. (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol.Med.* **19**, 197-209.
- DAENDEE S., THONGSONG B. & KALANDAKANOND-THONGSONG S. (2013) Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats. *Behav.Brain Res.* **246**, 86-93.
- DALMASSO C., AMIGONE J.L. & VIVAS L. (2011) Serotonergic system involvement in the inhibitory action of estrogen on induced sodium appetite in female rats. *Physiol Behav.* **104**, 398-407.
- DAVIS M. & WHALEN P.J. (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol.Psychiatry* **6**, 13-34.
- DE KLOET E.R., VOORHUIS T.A. & ELANDS J. (1985) Estradiol induces oxytocin binding sites in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Eur.J.Pharmacol.* **118**, 185-186.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., SARKAR S., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2008) Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **295**, R881-R890
- DEL R.G., VELARDO A., MENOZZI R., ZIZZO G., TAVERNARI V., VENNERI M.G., MARRAMA P. & PETRAGLIA F. (1998) Acute estradiol and progesterone administration reduced cardiovascular and catecholamine responses to mental stress in menopausal women. *Neuroendocrinology* **67**, 269-274.
- DEROO B.J. & KORACH K.S. (2006) Estrogen receptors and human disease. *J.Clin.Invest* **116**, 561-570.
- DIAZ-VELIZ G., SOTO V., DUSSAUBAT N. & MORA S. (1989) Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. *Physiol Behav.* **46**, 397-401.
- DIMICCO J.A., SAMUELS B.C., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2002) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **71**, 469-480.
- DUVERNOY HM. (1988) *The human hippocampus: An atlas of applied anatomy*. Berlin: pp. 5-12.
- FAHRBACH S.E., MEISEL R.L. & PFAFF D.W. (1985) Preoptic implants of estradiol increase wheel running but not the open field activity of female rats. *Physiol Behav.* **35**, 985-992.
- FEINDEL W. & GLOOR P. (1954) Comparison of electrographic effects of stimulation of the amygdala and brain stem reticular formation in cats. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* **6**, 389-402.

- FEINDEL W. & PENFIELD W. (1954) Localization of discharge in temporal lobe automatism. *AMA.Arch.Neurol.Psychiatry* **72**, 603-630.
- FOLKOW B. (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* **62**, 347-504.
- FONSECA C.S., GUSMAO I.D., RASLAN A.C., MONTEIRO B.M., MASSENSINI A.R., MORAES M.F. & PEREIRA G.S. (2013) Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiol.Learn.Mem.* **101**, 19-25.
- Fontes D. Isquemia Cerebral em camundongos fêmeas knock-down para transportador vesicular de acetilcolina. 2009. Universidade Federal de Minas Gerais. 25-2-2014. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- FORTEPIANI L.A., ZHANG H., RACUSEN L., ROBERTS L.J. & RECKELHOFF J.F. (2003) Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **41**, 640-645.
- Fortes, L. H. S. Efeito da ovariectomia sobre o balanço autonômico cardíaco em ratas submetidas à desnutrição proteica. 2010. Universidade Federal de Ouro Preto. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- FOSTER T.C. (2005) Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. *Front Neuroendocrinol.* **26**, 51-64.
- FOSTER T.C. (2012) Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus* **22**, 656-669.
- FREEMAN E.W. (2010) Associations of depression with the transition to menopause. *Menopause.* **17**, 823-827.
- FRYSINGER R.C., MARKS J.D., TRELEASE R.B., SCHECHTMAN V.L. & HARPER R.M. (1984) Sleep states attenuate the pressor response to central amygdala stimulation. *Exp.Neurol.* **83**, 604-617.
- GALENO T.M. & BRODY M.J. (1983) Hemodynamic responses to amygdaloid stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* **245**, R281-R286
- GARCIA-SEGURA L.M. (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J.Neuroendocrinol.* **20**, 705-712.
- GAZZALEY A.H., WEILAND N.G., MCEWEN B.S. & MORRISON J.H. (1996) Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J.Neurosci.* **16**, 6830-6838.
- GERHARDT C.C. & VAN H.H. (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **334**, 1-23.
- GINGERICH S. & KRUKOFF T.L. (2006) Estrogen in the paraventricular nucleus attenuates L-glutamate-induced increases in mean arterial pressure through estrogen receptor beta and NO. *Hypertension* **48**, 1130-1136.

- GOULD E., WOOLLEY C.S., FRANKFURT M. & MCEWEN B.S. (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J.Neurosci.* **10**, 1286-1291.
- GRAEFF F.G., VIANA M.B. & TOMAZ C. (1993) The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **26**, 67-70.
- GRAY T.S. (1993) Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **697**, 53-60.
- GREISING S.M., CAREY R.S., BLACKFORD J.E., DALTON L.E., KOSIR A.M. & LOWE D.A. (2011) Estradiol treatment, physical activity, and muscle function in ovarian-senescent mice. *Exp.Gerontol.* **46**, 685-693.
- HALLSTROM T. & SAMUELSSON S. (1985) Mental health in the climacteric. The longitudinal study of women in Gothenburg. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.Suppl* **130**, 13-18.
- HAMANN S.B., ELY T.D., GRAFTON S.T. & KILTS C.D. (1999) Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nat.Neurosci.* **2**, 289-293.
- HAWKER R.W. & ROBERTSON P.A. (1957) Oxytocin and lactation. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **17**, 448-451.
- HEINE P.A., TAYLOR J.A., IWAMOTO G.A., LUBAHN D.B. & COOKE P.S. (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12729-12734.
- HENDERSON V.W., ST JOHN J.A., HODIS H.N., MCCLEARY C.A., STANCZYK F.Z., SHOUBE D., KONO N., DUSTIN L., ALLAYEE H. & MACK W.J. (2016) Cognitive effects of estradiol after menopause: A randomized trial of the timing hypothesis. *Neurology* **87**, 699-708.
- HERYNK M.H. & FUQUA S.A. (2004) Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr.Rev.* **25**, 869-898.
- HOGERVORST E. & BANDELOW S. (2010) Sex steroids to maintain cognitive function in women after the menopause: a meta-analysis of treatment trials. *Maturitas* **66**, 56-71.
- HRABOVSKY E., KALLO I., HAJSZAN T., SHUGHRUE P.J., MERCHENTHALER I. & LIPOSITS Z. (1998) Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology* **139**, 2600-2604.
- HULLEY S., GRADY D., BUSH T., FURBERG C., HERRINGTON D., RIGGS B. & VITTINGHOFF E. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* **280**, 605-613.
- HUNTER M., BATTERSBY R. & WHITEHEAD M. (1986) Relationships between psychological symptoms, somatic complaints and menopausal status. *Maturitas* **8**, 217-228.
- IWATA J., CHIDA K. & LEDOUX J.E. (1987) Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res.* **418**, 183-188.

- JOHNSTON A.L. & FILE S.E. (1991a) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav.* **49**, 245-250.
- JOHNSTON A.L. & FILE S.E. (1991b) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav.* **49**, 245-250.
- JONES M.E., THORBURN A.W., BRITT K.L., HEWITT K.N., WREFORD N.G., PROIETTO J., OZ O.K., LEURY B.J., ROBERTSON K.M., YAO S. & SIMPSON E.R. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12735-12740.
- KALANDAKANOND-THONGSONG S., DAENDEE S. & SRIKIATKHACHORN A. (2012a) Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. *Physiol Behav.* **105**, 357-363.
- KALANDAKANOND-THONGSONG S., DAENDEE S. & SRIKIATKHACHORN A. (2012b) Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. *Physiol Behav.* **105**, 357-363.
- KANNEL W.B., HJORTLAND M.C., MCNAMARA P.M. & GORDON T. (1976) Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann.Intern.Med.* **85**, 447-452.
- KAPP B.S., GALLAGHER M., UNDERWOOD M.D., MCNALL C.L. & WHITEHORN D. (1982) Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. *Brain Res.* **234**, 251-262.
- KIMURA M., IRAHARA M., YASUI T., SAITO S., TEZUKA M., YAMANO S., KAMADA M. & AONO T. (2002) The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **290**, 1349-1353.
- KISSEBACH AH, EVANS DJ, PEIRIS A & WILSON CR (1985) Endocrine characteristics in regional obesities: role of sex steroids. *Elsevier Science Publishers* 115-130.
- KNAPSKA E., RADWANSKA K., WERKA T. & KACZMAREK L. (2007) Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev.* **87**, 1113-1173.
- KRETTEK J.E. & PRICE J.L. (1978) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J.Comp Neurol.* **178**, 255-280.
- KUBO T., OKATANI H., NISHIGORI Y., HAGIWARA Y., FUKUMORI R. & GOSHIMA Y. (2004) Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci.Lett.* **354**, 84-86.
- KUENG W., WIRZ-JUSTICE A., MENZI R. & CHAPPUIS-ARNDT E. (1976) Regional brain variations of tryptophan, monoamines, monoamine oxidase activity, plasma free and total tryptophan during the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* **21**, 289-296.
- KUIPER G.G., SHUGHRUE P.J., MERCHENTHALER I. & GUSTAFSSON J.A. (1998) The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* **19**, 253-286.

- KVIST H., CHOWDHURY B., GRANGARD U., TYLEN U. & SJOSTROM L. (1988) Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am.J.Clin.Nutr.* **48**, 1351-1361.
- LAUGHLIN G.A., BARRETT-CONNOR E., KRITZ-SILVERSTEIN D. & VON M.D. (2000) Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 645-651.
- LE S.M., ESTRADA-CAMARENA E. & DI P.T. (2006) Selective estrogen receptor-alpha but not -beta agonist treatment modulates brain alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *J.Neurosci.Res.* **84**, 1076-1084.
- LEDOUX J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.* **23**, 155-184.
- LEDOUX J.E., IWATA J., CICCHETTI P. & REIS D.J. (1988a) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J.Neurosci.* **8**, 2517-2529.
- LEDOUX J.E., IWATA J., CICCHETTI P. & REIS D.J. (1988b) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J.Neurosci.* **8**, 2517-2529.
- LEE A.W., DEVIDZE N., PFAFF D.W. & ZHOU J. (2006) Functional genomics of sex hormone-dependent neuroendocrine systems: specific and generalized actions in the CNS. *Prog.Brain Res.* **158**, 243-272.
- LEOR J., POOLE W.K. & KLONER R.A. (1996) Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N.Engl.J.Med.* **334**, 413-419.
- LIM L., NG T.P., CHUA H.C., CHIAM P.C., WON V., LEE T., FONES C. & KUA E.H. (2005) Generalised anxiety disorder in Singapore: prevalence, co-morbidity and risk factors in a multi-ethnic population. *Soc.Psychiatry Psychiatr.Epidemiol.* **40**, 972-979.
- LINDHEIM S.R., LEGRO R.S., BERNSTEIN L., STANCZYK F.Z., VIJOD M.A., PRESSER S.C. & LOBO R.A. (1992) Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **167**, 1831-1836.
- LOBO R.A. (2013) Where are we 10 years after the Women's Health Initiative? *J.Clin.Endocrinol.Metab* **98**, 1771-1780.
- LUCIO-OLIVEIRA F. & FRANCI C.R. (2012) Effect of the interaction between food state and the action of estrogen on oxytocinergic system activity. *J.Endocrinol.* **212**, 129-138.
- MARCONDES F.K., BIANCHI F.J. & TANNO A.P. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz.J.Biol.* **62**, 609-614.
- MARCONDES F.K., MIGUEL K.J., MELO L.L. & SPADARI-BRATFISCH R.C. (2001a) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* **74**, 435-440.
- MARCONDES F.K., MIGUEL K.J., MELO L.L. & SPADARI-BRATFISCH R.C. (2001b) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* **74**, 435-440.

- MARGIS R, PICON P., COSMER A.F. & SILVEIRA R.DE O. (2003) Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Rev.psiquiatr.Rio Gd.Sul* **25**, 65-74.
- MARGIS R. (2003) [Comorbidities in posttraumatic stress disorder: rule or exception?]. *Rev.Bras.Psiquiatr.* **25 Suppl 1**, 17-20.
- MCCARTHY M.M., MCDONALD C.H., BROOKS P.J. & GOLDMAN D. (1996) An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav.* **60**, 1209-1215.
- McDonald AJ. Cell types and intrinsic connections of the amygdale. The amygdala. In: Aggleton, JP , 67-96. 1992. (GENERIC)
Ref Type: Magazine Article
- MCEWEN B. (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog.Horm.Res.* **57**, 357-384.
- MCEWEN B.S. & ALVES S.E. (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr.Rev.* **20**, 279-307.
- MCKINLAY J.B., MCKINLAY S.M. & BRAMBILLA D. (1987) The relative contributions of endocrine changes and social circumstances to depression in mid-aged women. *J.Health Soc.Behav.* **28**, 345-363.
- MCKINLAY S.M., BRAMBILLA D.J. & POSNER J.G. (1992) The normal menopause transition. *Maturitas* **14**, 103-115.
- MEDINA J.F., REPA J.C., MAUK M.D. & LEDOUX J.E. (2002) Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**, 122-131.
- MERCHENTHALER I., LANE M.V., NUMAN S. & DELLOVADE T.L. (2004) Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J.Comp Neurol.* **473**, 270-291.
- MILNER T.A. & DRAKE C.T. (2001) Ultrastructural evidence for presynaptic mu opioid receptor modulation of synaptic plasticity in NMDA-receptor-containing dendrites in the dentate gyrus. *Brain Res.Bull.* **54**, 131-140.
- MITRA S.W., HOSKIN E., YUDKOVITZ J., PEAR L., WILKINSON H.A., HAYASHI S., PFAFF D.W., OGAWA S., ROHRER S.P., SCHAEFFER J.M., MCEWEN B.S. & ALVES S.E. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **144**, 2055-2067.
- MITTERLING K.L., SPENCER J.L., DZIEDZIC N., SHENOY S., MCCARTHY K., WATERS E.M., MCEWEN B.S. & MILNER T.A. (2010) Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J.Comp Neurol.* **518**, 2729-2743.
- MOGENSEN G.J. & CALARESU F.R. (1973) Cardiovascular responses to electrical stimulation of the amygdala in the rat. *Exp.Neurol.* **39**, 166-180.
- MONTGOMERY K.C. & MONKMAN J.A. (1955) The relation between fear and exploratory behavior. *J.Comp Physiol Psychol.* **48**, 132-136.

- MORA S., DUSSAUBAT N. & DIAZ-VELIZ G. (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* **21**, 609-620.
- MORISSETTE M., LE S.M. & DI P.T. (2008) Effect of oestrogen receptor alpha and beta agonists on brain N-methyl-D-aspartate receptors. *J.Neuroendocrinol.* **20**, 1006-1014.
- MURPHY D.D., COLE N.B., GREENBERGER V. & SEGAL M. (1998) Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J.Neurosci.* **18**, 2550-2559.
- NAFTOLIN F., RYAN K.J. & PETRO Z. (1971a) Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J.Endocrinol.* **51**, 795-796.
- NAFTOLIN F., RYAN K.J. & PETRO Z. (1971b) Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **33**, 368-370.
- NARABAYASHI H., NAGAO T., SAITO Y., YOSHIDA M. & NAGAHATA M. (1963) Stereotaxic amygdalotomy for behavior disorders. *Arch.Neurol.* **9**, 1-16.
- NELSON L.R. & BULUN S.E. (2001) Estrogen production and action. *J.Am.Acad.Dermatol.* **45**, S116-S124
- NEMEROFF C.B. (1996) The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol.Psychiatry* **1**, 336-342.
- NEUGARTEN B.L. & KRAINES R.J. (1965) "MENOPAUSAL SYMPTOMS" IN WOMEN OF VARIOUS AGES. *Psychosom.Med.* **27**, 266-273.
- NORBURY R., CUTTER W.J., COMPTON J., ROBERTSON D.M., CRAIG M., WHITEHEAD M. & MURPHY D.G. (2003) The neuroprotective effects of estrogen on the aging brain. *Exp.Gerontol.* **38**, 109-117.
- OGAWA S., CHAN J., GUSTAFSSON J.A., KORACH K.S. & PFAFF D.W. (2003) Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology* **144**, 230-239.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1996) *Investigaciones sobre la menopausia em los años noventa.Serie de Informes Técnicos, No 866.*
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1999) Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10 - Diretrizes Diagnósticas e de Tratamento para Transtornos Mentais em Cuidados Primários. *Rev.Bras.Psiquiatr* **2**,
- OVERLIE I., MOEN M.H., MORKRID L., SKJAERAASEN J.S. & HOLTE A. (1999) The endocrine transition around menopause--a five years prospective study with profiles of gonadotropines, estrogens, androgens and SHBG among healthy women. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* **78**, 642-647.
- PAECH K., WEBB P., KUIPER G.G., NILSSON S., GUSTAFSSON J., KUSHNER P.J. & SCANLAN T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**, 1508-1510.

- PANDARANANDAKA J., POONYACHOTI S. & KALANDAKANOND-THONGSONG S. (2009) Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behav.Brain Res.* **198**, 142-148.
- PARE D., QUIRK G.J. & LEDOUX J.E. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J.Neurophysiol.* **92**, 1-9.
- PAREDES J., WINTERS R.W., SCHNEIDERMAN N. & MCCABE P.M. (2000) Afferents to the central nucleus of the amygdala and functional subdivisions of the periaqueductal gray: neuroanatomical substrates for affective behavior. *Brain Res.* **887**, 157-173.
- PARIANTE C.M. & MILLER A.H. (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol.Psychiatry* **49**, 391-404.
- PATCHEV V.K., SCHLOSSER S.F., HASSAN A.H. & ALMEIDA O.F. (1993) Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience* **57**, 537-543.
- PAXINOS G. & WATSON C. (1986) *The rat brain stereotaxic coordinates*. New York:
- PEREIRA L.M., BASTOS C.P., DE SOUZA J.M., RIBEIRO F.M. & PEREIRA G.S. (2014) Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor alpha. *Neurobiol.Learn.Mem.* **114**, 1-9.
- PETERSEN E.N., BRAESTRUP C. & SCHEEL-KRUGER J. (1985) Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by the specific benzodiazepine receptors. *Neurosci.Lett.* **53**, 285-288.
- PHELPS E.A. & LEDOUX J.E. (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* **48**, 175-187.
- PIERREHUMBERT B., TORRISI R., LAUFER D., HALFON O., ANSERMET F. & BECK P.M. (2010) Oxytocin response to an experimental psychosocial challenge in adults exposed to traumatic experiences during childhood or adolescence. *Neuroscience* **166**, 168-177.
- PIKE C.J., CARROLL J.C., ROSARIO E.R. & BARRON A.M. (2009) Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* **30**, 239-258.
- PINES A., FISMAN E.Z., SHAPIRA I., DRORY Y., WEISS A., ECKSTEIN N., LEVO Y., AVERBUCH M., MOTRO M., ROTMENSCH H.H. & AYALON D. (1996) Exercise echocardiography in postmenopausal hormone users with mild systemic hypertension. *Am.J.Cardiol.* **78**, 1385-1389.
- PITKANEN A., SAVANDER V. & LEDOUX J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* **20**, 517-523.
- POMPILI A., ARNONE B. & GASBARRI A. (2012) Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 1379-1396.
- PRELEVIC G.M. & JACOBS H.S. (1997) New developments in postmenopausal hormone replacement therapy. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* **9**, 207-212.

- PRICE J.L. & AMARAL D.G. (1981) An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J.Neurosci.* **1**, 1242-1259.
- PROSSNITZ E.R. & BARTON M. (2011a) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat.Rev.Endocrinol.* **7**, 715-726.
- PROSSNITZ E.R. & BARTON M. (2011b) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat.Rev.Endocrinol.* **7**, 715-726.
- QU N., WANG L., LIU Z.C., TIAN Q. & ZHANG Q. (2013) Oestrogen receptor alpha agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* **16**, 1071-1082.
- R.MISAO, Y.NAKANISHI, W.S.SUN, J.FUJIMOTO, S.IWAGAKI, R.HIROSE & T.TAMAYA (1999) Expression of oestrogen receptor a and subjectsb mRNA in corpus luteum of human. *European Society of Human Reproduction and Embryology* **5**, 17-21.
- RAGLAN G.B., SCHMIDT L.A. & SCHULKIN J. (2017) The role of glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone regulation on anxiety symptoms and response to treatment. *Endocr.Connect.*
- RASIA-FILHO A.A., FABIAN C., RIGOTI K.M. & ACHAVAL M. (2004) Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* **126**, 839-847.
- RECKELHOFF J.F. (2001) Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* **37**, 1199-1208.
- RECKELHOFF J.F. & FORTEPIANI L.A. (2004) Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension* **43**, 918-923.
- REGENSTEINER J.G., HIATT W.R., BYNY R.L., PICKETT C.K., WOODARD W.D. & MOORE L.G. (1991) Short-term effects of estrogen and progestin on blood pressure of normotensive postmenopausal women. *J.Clin.Pharmacol.* **31**, 543-548.
- RICHARD D., ROCHON L. & DESHAIES Y. (1987) Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. *Am.J.Physiol* **253**, R740-R745
- RODIER W.I., III (1971) Progesterone-estrogen interactions in the control of activity-wheel running in the female rat. *J.Comp Physiol Psychol.* **74**, 365-373.
- ROOZENDAAL B., WIERSMA A., DRISCOLL P., KOOLHAAS J.M. & BOHUS B. (1992) Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Res.* **596**, 35-40.
- ROSARIO E.R., CHANG L., HEAD E.H., STANCZYK F.Z. & PIKE C.J. (2011) Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* **32**, 604-613.
- ROSELLI C.E. & RESKO J.A. (1997) Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **61**, 365-374.

- ROSSOUW J.E., ANDERSON G.L., PRENTICE R.L., LACROIX A.Z., KOOPERBERG C., STEFANICK M.L., JACKSON R.D., BERESFORD S.A., HOWARD B.V., JOHNSON K.C., KOTCHEN J.M. & OCKENE J. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 321-333.
- ROZENBERG S., VANDROMME J. & ANTOINE C. (2013) Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat.Rev.Endocrinol.* **9**, 216-227.
- RUSSCHEN F.T. (1982) Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques. *J.Comp Neurol.* **207**, 157-176.
- SALOME N., NGAMPAMUAN S. & NALIVAICO E. (2007) Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience* **148**, 335-341.
- SANCHEZ R.L., REDDY A.P. & BETHEA C.L. (2010) Ovarian steroid regulation of the midbrain corticotropin releasing factor and urocortin systems in macaques. *Neuroscience* **171**, 893-909.
- SANDERS S.K., MORZORATI S.L. & SHEKHAR A. (1995) Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. *Brain Res.* **699**, 250-259.
- SANDERS S.K. & SHEKHAR A. (1991) Blockade of GABAA receptors in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure. *Brain Res.* **567**, 101-110.
- SANDERS S.K. & SHEKHAR A. (1995a) Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABAA and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. *Biol.Psychiatry* **37**, 473-476.
- SANDERS S.K. & SHEKHAR A. (1995b) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **52**, 701-706.
- SAPOLSKY R.M. (1990) Stress in the wild. *Sci.Am.* **262**, 116-123.
- SEEMAN M.V. (1997) Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am.J.Psychiatry* **154**, 1641-1647.
- SELYE H. (1998) A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* **10**, 230-231.
- SFIKAKIS A., SPYRAKI C., SITARAS N. & VARONOS D. (1978) Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. *Physiol Behav.* **21**, 441-446.
- SHERWIN B.B. (1994) Sex hormones and psychological functioning in postmenopausal women. *Exp.Gerontol.* **29**, 423-430.
- SHERWIN B.B. (2006) Estrogen and cognitive aging in women. *Neuroscience* **138**, 1021-1026.
- SHIBATA S., YAMASHITA K., YAMAMOTO E., OZAKI T. & UEKI S. (1989) Effects of benzodiazepine and GABA antagonists on anticonflict effects of antianxiety drugs injected into the rat amygdala in a water-lick suppression test. *Psychopharmacology (Berl)* **98**, 38-44.

- SHIGENAGA M.K., HAGEN T.M. & AMES B.N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 10771-10778.
- SHOUBE D., PARKER W.H., BRODER M.S., LIU Z., FARQUHAR C. & BEREK J.S. (2007) Elective oophorectomy for benign gynecological disorders. *Menopause*. **14**, 580-585.
- SHUGHRUE P.J., LANE M.V. & MERCHENTHALER I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J.Comp Neurol*. **388**, 507-525.
- SIDDIG A., MOHAMED A.O., AWAD S., HASSAN A.H., ZILAH E., AL-HAJ M., BERNSEN R. & ADEM A. (2008) Estrogen receptor alpha gene polymorphism and breast cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. **1138**, 95-107.
- SOKOLOWSKI K. & CORBIN J.G. (2012) Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol.Neurosci*. **5**, 55
- STOFFEL-WAGNER B. (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. **1007**, 64-78.
- STRAUSS JF & BARBIERI RL (2004) *Reproductive endocrinology*. 5 Ed. Elsevier saunders.
- STUMPF W.E. & SAR M. (1976) Steroid hormone target sites in the brain: the differential distribution of estrogen, progesterin, androgen and glucocorticosteroid. *J.Steroid Biochem*. **7**, 1163-1170.
- SUNG B.H., CHING M., IZZO J.L., Jr., DANDONA P. & WILSON M.F. (1999) Estrogen improves abnormal norepinephrine-induced vasoconstriction in postmenopausal women. *J.Hypertens*. **17**, 523-528.
- TANG X., TANG C. & XIE H. (2013) Effect of ovariectomy on rat behavior and hippocampal neuronal nitric oxide synthase and electroacupuncture intervention role. *Sheng Wu Yi.Xue.Gong.Cheng Xue.Za Zhi*. **30**, 833-837.
- TCHERNOF A., DESMEULES A., RICHARD C., LABERGE P., DARIS M., MAILLOUX J., RHEAUME C. & DUPONT P. (2004) Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 3425-3430.
- TRENCH B. & SANTOS C.G.D. (2005) Menopausa ou Menopausas? *Saúde e Sociedade* **14**, 91-100.
- VALENTINO R.J. & VAN B.E. (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur.J.Pharmacol*. **583**, 194-203.
- VEST R.S. & PIKE C.J. (2013) Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm.Behav*. **63**, 301-307.
- WALF A.A. & FRYE C.A. (2005) ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1598-1609.

- WANG H., WARD A.R. & MORRIS J.F. (1995) Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* **68**, 1179-1188.
- WEISKRANTZ L. (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J.Comp Physiol Psychol.* **49**, 381-391.
- WINDLE R.J., KERSHAW Y.M., SHANKS N., WOOD S.A., LIGHTMAN S.L. & INGRAM C.D. (2004) Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J.Neurosci.* **24**, 2974-2982.
- WOLLNIK F. & TUREK F.W. (1988) Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiol Behav.* **43**, 389-396.
- YAGUE J.G., AZCOITIA I., DEFELIPE J., GARCIA-SEGURA L.M. & MUNOZ A. (2010) Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Res.* **1315**, 41-52.
- YAMANAKA K., TAKAGISHI M., KIM J., GOURAUD S.S. & WAKI H. (2017a) Bidirectional cardiovascular responses evoked by microstimulation of the amygdala in rats. *J.Physiol Sci.*
- YAMANAKA K., TAKAGISHI M., KIM J., GOURAUD S.S. & WAKI H. (2017b) Bidirectional cardiovascular responses evoked by microstimulation of the amygdala in rats. *J.Physiol Sci.*
- YU M.W., ZHANG Y.J., BLANER W.S. & SANTELLA R.M. (1994) Influence of vitamins A, C, and E and beta-carotene on aflatoxin B1 binding to DNA in woodchuck hepatocytes. *Cancer* **73**, 596-604.
- ZAMBONI M., ARMELLINI F., MILANI M.P., DE M.M., TODESCO T., ROBBI R., BERGAMO-ANDREIS I.A. & BOSELLO O. (1992) Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables and their inter-relationships. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **16**, 495-504.
- ZHANG J.X., HARPER R.M. & NI H.F. (1986) Cryogenic blockade of the central nucleus of the amygdala attenuates aversively conditioned blood pressure and respiratory responses. *Brain Res.* **386**, 136-145.
- ZHANG Q.G., HAN D., WANG R.M., DONG Y., YANG F., VADLAMUDI R.K. & BRANN D.W. (2011) C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor-alpha and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108**, E617-E624
- ZHANG Q.G., RAZ L., WANG R., HAN D., DE S.L., YANG F., VADLAMUDI R.K. & BRANN D.W. (2009) Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J.Neurosci.* **29**, 13823-13836.

