



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

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



**Efeito do tratamento crônico com losartana, um bloqueador
de receptores AT1, sobre o comportamento de ansiedade,
depressão e memória de ratas de ovariectomizadas**

Glenda Siqueira Viggiano Campos

Ouro Preto

2019

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

**Efeito do tratamento crônico com losartana, um bloqueador
de receptores AT1, sobre o comportamento de ansiedade,
depressão e memória de ratas de ovariectomizadas**

Glenda Siqueira Viggiano Campos

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular/UFOP

Orientador estrangeiro: Profa. Dra. Kathryn Sandberg

Center for the Study of Sex Differences in Health, Aging and Disease –

Georgetown University, Washington, DC - EUA

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

Ouro Preto

2019

C198e Campos, Glenda Siqueira Viggiano .
Efeito do tratamento crônico com losartana, um bloqueador de receptores AT1, sobre o comportamento de ansiedade, depressão e memória de ratas de ovariectomizadas [manuscrito] / Glenda Siqueira Viggiano Campos. - 2019.
107f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

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

1. Ovariectomia. 2. Memória. 3. Ansiedade. 4. Hipocampo . I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 618.11-089.87

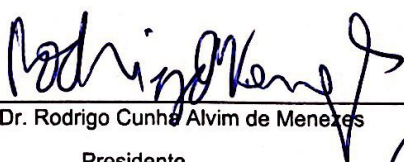


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
Biológicas



ATA DE DEFESA DE DOUTORADO


Aos 13 dias do mês de maio do ano de 2019, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda **Glenda Siqueira Viggiano Campos**, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Marco Antonio Peliky Fontes (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Romulo Leite (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeito do Tratamento Crônico com Losartana, Um Bloqueador de Receptores At1, Sobre o Comportamento de Ansiedade, Depressão e Memórias de Ratas Ovariectomizadas", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 6 (seis) meses à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 13 de maio de 2019.




Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes
Presidente




Prof. Dr. Antonio Carlos Pinheiro de
Oliveira



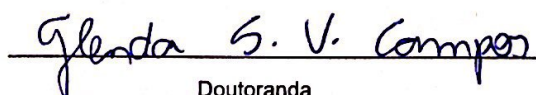
Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos
Santos Silva



Prof. Dr. Marco Antonio Peliky
Fontes



Prof. Dr. Romulo Leite



Doutoranda

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** vinculado ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, FAPEMIG e UFOP e no **Center for the Study of Sex Differences in Health, Aging and Disease** vinculado ao Departamento de Medicina da *Georgetown University* com o auxílio da CAPES e NIH 1R01HL119.

À minha mãe, Elvira, por acreditar no poder transformador da educação. Por lutar por meus sonhos junto comigo e vibrar a cada pequena vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, os meus mais sinceros agradecimentos. Pela oportunidade, paciência, confiança, incentivo e todos os ensinamentos. Por ter contribuído tanto para o meu crescimento científico.

À Prof. Dra. Kathryn Sandberg, por me receber em seu laboratório e confiar em meu trabalho. Por todas as discussões, contribuições e oportunidade de crescimento como pesquisadora. A todos os membros do *Sandberg's Lab*, pelo acolhimento e ajuda durante meu período no laboratório, especialmente à Dra. Hong Ji e Dra. Crystal West.

À Dra Aline de Souza, gratidão pela amizade desde o LFC, e pela recepção e suporte não apenas no *Sandberg's Lab*, mas também na minha adaptação à Washington, DC. Sem suas contribuições científicas, ajudas práticas e apoio emocional este trabalho não teria sido concluído com sucesso.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (integrantes e ex-integrantes), pelo companheirismo, solidariedade, troca de conhecimentos, e por terem se tornado amigos além do LFC. Em especial à Sylvana, fiel companheira de lab e produtiva parceria, e Paulo por todas as contribuições para a execução deste trabalho, puxões de orelha e amizade.

Aos funcionários do LFC, Milton de Paula e Marly Lessa, pelos cuidados e dedicação tanto aos animais como aos alunos, sempre dispostos a ajudar.

Ao CCA pelo fornecimento de animais.

Aos colegas do NUPEB.

Às amigas, Paula, Ana e Priscila, pela convivência diária, disposição, força e apoio emocional, pelos momentos únicos vividos e também pelas discussões científicas multidisciplinares e conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca por aceitarem gentilmente o convite e contribuírem para a melhoria deste trabalho.

Esse trabalho jamais seria possível de ser realizado sem a participação de todos vocês.

Muito obrigada a todos!!!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

A privação de hormônios ovarianos está associada a disfunções em mulheres na pós-menopausa. Estudos em roedores têm revelado que a privação hormonal induz alterações no hipocampo e amígdala, e também na atividade do sistema renina angiotensina (SRA). A alta expressão de receptores AT_1 no hipocampo e na amígdala sugere o envolvimento do SRA na modulação de respostas emocionais e cognitivas. De fato, tem-se notado o efeito neuroprotetor dos bloqueadores de receptores de AT_1 (BRAs), no entanto, até onde sabemos, não há estudos avaliando os efeitos dos BRAs sobre as respostas cognitivas e emocionais resultantes da depleção de hormônios ovarianos. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da privação de hormônios ovarianos e do tratamento crônico com o BRA losartana sobre o comportamento do tipo ansiedade, depressão e memória de ratas ovariectomizadas. Inicialmente avaliamos o efeito do ciclo estral e de 3 semanas de ovariectomia (OVX) em ratas Fischer sobre o comportamento do tipo ansiedade e pânico avaliados no labirinto em T elevado (LTE), campo aberto (CA) e paradigma claro/escuro (PCE). Adiante, ratas Long Evans Sham e OVX foram tratadas com água natural ou losartana durante 10 semanas. A partir da quinta semana as ratas foram avaliadas no labirinto em cruz elevado (LCE), CA, reconhecimento de novo objeto (RNO), ameaça iminente (AI) e preferência por sacarose (PS). O encéfalo foi removido na 10ª semana para avaliação da expressão gênica de AT_1 no hipocampo. Nossos resultados mostram que o ciclo estral não influenciou o comportamento do tipo ansiedade e pânico. Já as ratas OVX apresentaram aumento da latência de esquiva inibitória (Esq1: $p = 0,038$; Esq2: $p = 0,032$, teste Mann-Whitney) e redução da fuga no LTE (Fuga 1: $p = 0,012$, teste t de Student), e menor tempo no compartimento claro do PCE ($p = 0,0417$, teste t de Student), que são respostas indicativas de ansiedade. A ovariectomia também induziu comportamento do tipo ansiedade no LCE e déficit de memória avaliada no RNO. O tratamento com losartana foi capaz de prevenir tais alterações no grupo OVX, exibindo respostas semelhantes aos grupos Sham-Veículo e Sham-Losartana (tempo: $F_{(1, 52)} = 7,78$; $p = 0,007$; entradas: $F_{(1, 52)} = 5$; $p = 0,02$; IR: $F_{(1, 55)} = 4,99$; $p = 0,03$, *two-way* ANOVA). O tratamento aumentou a expressão de RNAm de AT_1 no hipocampo ($F_{(1, 23)} = 4,74$; $p = 0,04$, *two-way* ANOVA) independente da cirurgia. Concluímos que o tratamento com losartana foi capaz de prevenir comportamento do tipo ansiedade e déficit de memória de curto prazo induzidos pela privação de hormônios ovarianos em ratas ovariectomizadas.

ABSTRACT

The loss of ovarian hormones is associated with the onset dysfunctions in postmenopausal women. Studies in rodents has reported that hormonal induces changes the hippocampus and amygdala, and also in renin angiotensin system (RAS) activity. The high expression of AT₁ receptors in the hippocampus and amygdala suggests the involvement of RAS in the modulation of emotional and cognitive responses. Indeed, the neuroprotective effect of AT₁ receptor blockers (ARBs) has been noted, however, in our knowledge, there are no studies assessing the effects of BRAs on the cognitive and emotional responses resulting from depletion of ovarian hormones. Thus, the aim of this study is to assess the effect of losartan chronic treatment on the anxiety-, depression-like behavior and short-term memory induced by loss of ovarian hormones in ovariectomized rats. Firstly, we assessed the effect of estrus cycle phase and 3 weeks of ovariectomy (OVX) on anxiety- and panic-like behavior of Fischer rats assessed in the elevated T maze (ETM), open field (OF) and dark/light paradigm (DLP). Afterwards, Long Evans rats Sham and OVX were treated with water or losartan along 10 weeks. Five weeks after post-surgery, rats were assessed in the elevated plus maze (EPM), OF, novel object recognition (NOR), looming threat (LT) and sucrose preference (SP) tests. Brain was collected in the 10th week for AT₁ gene expression the hippocampus. Our results reveals that the cycle did not influence anxiety- and panic-like behavior. On the other hand, OVX group showed increased inhibitory avoidance latency (Av1: $p = 0.038$; Av2: $p = 0.032$, Mann-Whitney test) and reduced escape latency in the ETM (Esc1: $p = 0.012$, Student's t test) and time exploring the light compartment of DLP ($p = 0.0417$, Student's t test), which are indicative responses of anxiety. Ovariectomy also induced anxiety-like behavior in EPM and declarative memory deficit assessed in NOR. Losartan treatment was able to prevent anxiety-like behavior and memory deficit in the OVX group, who exhibited responses similar to the Sham-Vehicle and Sham-Losartan groups (time: $F_{(1, 52)} = 7.78$, $p = 0.007$; entries: $F_{(1, 52)} = 5$, $p = 0.02$, IR: $F_{(1, 55)} = 4.99$, $p = 0.03$, two-way ANOVA). The treatment increased the expression of AT₁ mRNA in the hippocampus ($F_{(1, 23)} = 4.74$; $p = 0.04$, two-way ANOVA) independently of the surgery. We conclude that the losartan chronic treatment was able to prevent anxiety-like behavior and short-term memory deficit induced by loss of ovarian hormone in ovariectomized rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese dos hormônios ovarianos.....	12
Figura 2. Representação ilustrativa da localização da amígdala e do hipocampo no encéfalo humano e de roedores.....	16
Figura 3. Componentes do sistema renina angiotensina (SRA).....	22
Figura 4. Representação ilustrativa dos aparatos utilizados para a avaliação comportamental .	32
Figura 5. Esquema temporal dos protocolos experimental realizado destacando os procedimentos utilizados neste capítulo	34
Figura 6. Representação da forma adequada de manuseio dos animais durante o período de habituação ao experimentador.....	35
Figura 7. Avaliação do comportamento do tipo ansiedade e do tipo pânico em ratas intactas submetidas à testes no labirinto em T elevado em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro).....	38
Figura 8. Avaliação comportamental de ratas intactas submetidas ao teste do campo aberto em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro)	39
Figura 9. Avaliação do comportamento do tipo ansiedade em ratas intactas submetidas ao teste do paradigma claro/escuro em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro)	40
Figura 10. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade avaliado no labirinto em T elevado na 3ª semana pós-ovariectomia.....	42
Figura 11. Efeito da ovariectomia sobre a atividade locomotora e o comportamento do tipo ansiedade avaliados no campo aberto na 3ª semana pós-ovariectomia.....	42
Figura 12. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade avaliado no paradigma claro/escuro na 3ª semana pós-ovariectomia.....	43
Figura 13. Representação ilustrativa dos aparatos utilizados para a avaliação comportamental e cognitiva.....	50
Figura 14. Esquema temporal do protocolo experimental realizado destacando os procedimentos utilizados neste capítulo	54
Figura 15. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo ansiedade avaliado no labirinto em cruz elevado na 5ª semana pós-ovariectomia	58
Figura 16. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo ansiedade e atividade locomotora avaliados no campo aberto na 6ª semana pós-ovariectomia.....	60

Figura 17. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre a memória declarativa de curto prazo avaliada no teste de reconhecimento de novo objeto realizado na 6ª semana pós-ovariectomia.....	62
Figura 18. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre a reposta defensiva avaliada no teste de ameaça iminente realizado na 8ª semana pós-ovariectomia	64
Figura 19. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo depressão avaliado pelo teste de preferência por sacarose realizado na 9ª semana pós-ovariectomia	66
Figura 20. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) na expressão dos RNAm dos receptores AT1 na região hipocampal CA1 de ratas Sham e OVX avaliadas na 10ª semana pós-cirurgia	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do modelo de ovariectomia tratado com veículo (água) ou losartana (10 mg/kg/dia) por 10 semanas quanto à composição corporal, consumo alimentar e hídrico, peso uterino e pressão arterial média.....	56
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3 β HDS – 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
5-HIAA – 5-hidroxi-indolacético
17 β -HSD – 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase
AI – Ameaça iminente
Ang (1-7) – Angiotensina (1-7)
Ang (1-9) – Angiotensina (1-9)
Ang I – Angiotensina I
Ang II – Angiotensina II
AT₁ – Receptor de angiotensina II subtipo 1
BRA – Bloqueador de receptores AT₁
CA – Campo aberto
CA1 – Região CA1 do hipocampo
CA2 – Região CA2 do hipocampo
CA3 – Região CA3 do hipocampo
ECA – Enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II
ECA2 – Enzima conversor de angiotensina II em angiotensina (1-7)
Estradiol – 17 β -estradiol
Esq – Esquiva inibitória
FSH – Hormônio folículo estimulante
F – Fuga
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
i.c.v. – Intracerebroventricular
i.m. – Intramuscular
i.p. – Intraperitoneal
LH – Hormônio luteinizante
LCE – Labirinto em Cruz elevado
LTE – Labirinto em T elevado
Mas – Receptor de angiotensina (1-7)
OVX – Ratas submetidas à ovariectomia
PAM – Pressão arterial média
PCE – Paradigma claro/escuro

PS – Preferência por sacarose

RE – Receptor de estrógeno

RE α – Receptor de estrógeno subtipo α

RE β – Receptor de estrógeno subtipo β

RNO – Reconhecimento de novo objeto

SNC – Sistema nervoso central

Sham – Ratas submetidas à intervenção cirúrgica falsa

SRA – Sistema renina angiotensina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Hormônios ovarianos	12
1.2 Menopausa natural e menopausa cirúrgica	14
1.2.1 Modelo de ovariectomia	15
1.3 Distúrbios emocionais e cognitivos associados a privação de hormônios ovarianos .	15
1.3.1 Ansiedade e resposta defensiva	17
1.3.2 Depressão	19
1.3.3 Déficit de memória	20
1.4 Perturbação do sistema renina angiotensina pela privação de hormônios ovarianos	22
1.5 Efeito neuroprotetor de bloqueadores de receptores AT₁	23
1.6 Losartan: potencial opção terapêutica no tratamento de disfunções comportamentais e cognitivas na pós-menopausa	25
CAPÍTULO 1	27
2. OBJETIVO	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Modelo animal	28
3.2 Fármacos utilizados nos procedimentos cirúrgicos	28
3.3 Procedimento cirúrgico - Ovariectomia	29
3.4 Avaliação do ciclo estral	30
3.5 Aparatos utilizados para testes comportamentais	30
3.5.1 Labirinto em T elevado	30
3.5.2 Campo aberto	31
3.5.3 Paradigma claro/escuro	32
3.6 Delineamento experimental	33
3.6.1 Protocolos experimentais	33
3.6.2 Protocolo comportamental	34
3.7 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Influência do ciclo estral sobre respostas comportamentais associadas à ansiedade de ratas intactas avaliadas nas fases proestro e diestro	37
4.2 Efeito da depleção de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia sobre respostas comportamentais associadas à ansiedade avaliada em diferentes tipos de testes na 3ª semana pós-ovariectomia	40

CAPÍTULO 2	44
5.OBJETIVO	44
5.1 Objetivos específicos	44
6.MATERIAL E MÉTODOS	46
6.1 Modelo animal	46
6.2 Acompanhamento do peso corporal e ingestão alimentar	46
6.3 Fármacos e soluções	46
6.4 Procedimento cirúrgico - Ovariectomia	47
6.5 Testes comportamentais	47
6.5.1 Labirinto em cruz elevado	47
6.5.2 Campo aberto	48
6.5.3 Reconhecimento de novo objeto	48
6.5.4 Ameaça iminente	49
6.5.5 Preferência por sacarose	50
6.6 Avaliação do ciclo estral	51
6.7 Avaliação da pressão arterial média	51
6.8 Coleta de tecidos e cérebro	51
6.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	52
6.10 Delineamento experimental	53
6.10.1 Protocolo de tratamento	53
6.10.2 Protocolo experimental	53
6.11 Análise estatística	54
7.RESULTADOS	55
7.1 Caracterização do modelo de ovariectomia tratado com veículo ou losartana durante 10 semanas	55
7.2 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora	56
7.3 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre a memória de reconhecimento de objetos de curto prazo	60
7.4 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de resposta defensiva	63
7.5 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo depressão	64
7.5 Expressão gênica de receptores AT₁ na região hipocampal CA1 de ratas ovariectomizadas submetidas ou não ao tratamento crônico com losartana	66

8.DISSCUSSÃO	68
9.CONCLUSÃO	77
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios ovarianos

Os ovários são considerados a principal fonte de estrogênio e progesterona durante a vida reprodutiva das mulheres (Ter Horst, 2010), compreendida entre os 15 a 49 anos de idade (O.M.S., 2006). A biossíntese dos hormônios ovarianos se inicia a partir do colesterol, portanto, pertencem ao grupo dos esteróides, e o último substrato da via é o 17 β -estradiol (estradiol). Detalhadamente, o colesterol é primeiramente convertido em pregnenolona e em seguida em progesterona, que é o composto precursor de testosterona e androstenediona, e estas finalmente podem ser aromatizadas em estradiol (Taraborrelli, 2015) (Figura 1).

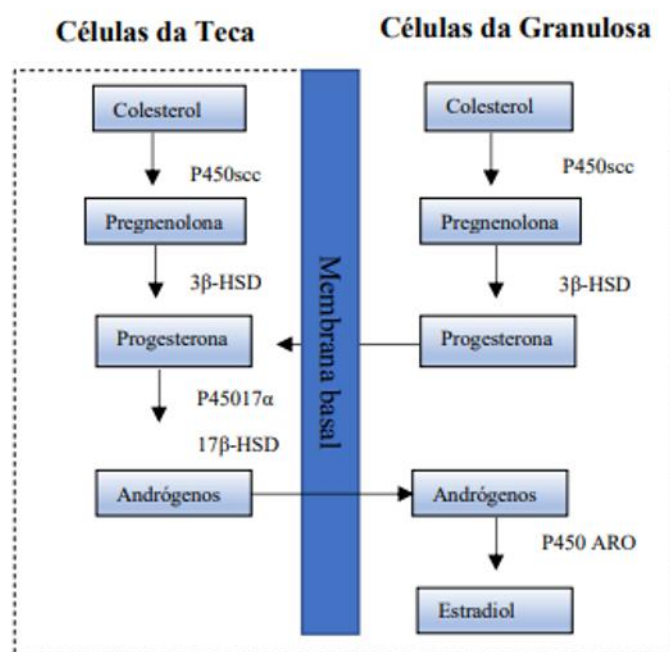


Figura 1. Biossíntese dos hormônios ovarianos. A produção do estradiol tem início com a síntese da pregnenolona a partir de moléculas circulantes de colesterol, catalisada pela enzima P450scc. A pregnenolona é então convertida em progesterona pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β HDS) tanto nas células tecais como da granulosa nos ovários. A progesterona produzida é convertida em andrógenos (testosterona e androstenediona) pela citocromo P450 17 α -hidroxilase e 17 β hidriesteroide desidrogenase (17 β -HSD) nas células tecais durante a fase folicular. A conversão do estradiol catalisada pela aromatase (P450ARO) na granulosa, adaptado de (Cui *et al.*, 2013).

Tais hormônios são sintetizados e secretados pelos folículos ovarianos e corpo lúteo a partir da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, e a regulação desse processo caracteriza o ciclo menstrual. Fatores hormonais e neuroendócrinos, incluindo a concentração dos próprios hormônios ovarianos, modulam positiva e negativamente o hipotálamo a secretar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimulando a hipófise a liberar hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e que por sua vez induzem os folículos ovarianos e o corpo lúteo a produzirem estrogênio e progesterona, respectivamente (Gruber *et al.*, 2002; Deroo e Korach, 2006; Ter Horst, 2010). O ciclo menstrual é composto por quatro fases, sendo a primeira metade do ciclo menstrual caracterizada por baixos (fase menstrual) e altos (fase folicular) níveis de estrogênio terminando na ovulação, que consiste no pico de FSH e LH. A segunda metade é composta pela fase luteal, que apresenta um pico de progesterona, e pela fase pré-menstrual, com redução nos níveis de estrogênio e progesterona (Draper *et al.*, 2018).

Os estrogênios são os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento e regulação da função reprodutora feminina, sendo encontrados naturalmente no plasma sob as formas estradiol, estrona e estriol. O estradiol é considerado o mais relevante, abundante e potente dentre os estrogênios circulantes, já o estriol e a estrona estão presentes em baixos níveis e apresentam menor atividade sobre os receptores estrogênicos (RE) (Ter Horst, 2010). Além da função reprodutora, o estrogênio participa de diversos processos funcionalmente independentes no organismo via circulação sanguínea (Tian *et al.*, 2013), incluindo nos sistema imunológico, muscular, ósseo, cardiovascular, e ainda atuam como neuromoduladores no sistema nervoso central (SNC) (Kuiper *et al.*, 1997; Bryant *et al.*, 2012).

A ação estrogênica é mediada pela ligação do hormônio à receptores expressos nesses tecidos, que se apresentam em duas isoformas clássicas denominadas receptores de estrógeno do tipo α (RE α) e de estrógeno do tipo β (RE β), com afinidade similar do estradiol por ambas (Kuiper *et al.*, 1997). Tais isoformas diferem em função e localização. O RE α está relacionado principalmente à atividade reprodutora com ampla distribuição no útero, ovários, rins e em regiões encefálicas como hipófise e hipotálamo. Já o RE β tem sido associado à funções cognitivas e comportamentais, expressos em maior concentração nos ovários, útero, pulmão, bexiga, ossos e também no encéfalo, incluindo hipocampo, córtex cerebral, amígdala, cerebelo e lócus ceruleus (Krezel *et al.*, 2001; Mitra *et al.*, 2003; Strauss e Barbieri, 2004; Tomihara *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2012). Atualmente sabe-se que o estradiol atua em vários processos anatômicos e neuroquímicos no encéfalo,

e por isso tem sido considerado como um importante neuromodulador do sistema nervoso central (SNC) (Thakur e Sharma, 2006).

1.2 Menopausa natural e menopausa cirúrgica

Com o processo de envelhecimento natural, por volta de 45 a 55 anos de idade, há uma redução gradual no número de folículos ovarianos até chegar ao esgotamento fisiológico irreversível destes, caracterizando o fim da vida reprodutora da mulher (cessação da ovulação e de ciclos menstruais), sendo este evento denominado menopausa (Barrett *et al.*, 2010; Rocca *et al.*, 2012). Em consequência à depleção ovariana, há um declínio gradativo na produção dos hormônios, ao passo que a concentração de LH e FSH tornam-se elevadas devido à falta de *feedback* negativo dos hormônios ovarianos (Barrett *et al.*, 2010). Por outro lado, a testosterona, ainda que em menor escala, continua a ser produzida pelas células estromais dos ovários e aromatizada em estradiol nos tecidos periféricos, contribuindo para uma concentração mínima de estrogênio circulante (Simpson e Davis, 2001; Rocca *et al.*, 2009). Este perfil é mantido durante os anos iniciais da pós-menopausa natural, enquanto que na fase tardia há redução de todos estes hormônios (Butler e Santoro, 2011). O hipoestrogenismo decorrente da falência ovariana resulta em diversas mudanças fisiológicas em tecidos hormônio-responsivos, como ossos, músculo, sistema cardiovascular e cérebro (Yanes e Reckelhoff, 2011; Oyola *et al.*, 2012; Lobo *et al.*, 2014), o que sugere o efeito protetor deste hormônio sobre as funções biológicas.

Contudo, a menopausa também pode ser resultante do procedimento cirúrgico de remoção bilateral dos ovários (ooforectomia), geralmente indicada clinicamente devido à processos malignos, disfunções ovarianas, ou como medida profilática em casos de tumorações benignas uterinas ou pélvicas, ou doenças como endometriose (Bassan, 1999; Rodriguez e Shoupe, 2015). Só nos Estados Unidos, cerca de 600.000 mulheres anualmente são submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral, sendo a maior parte delas mulheres em idade reprodutiva que conseqüentemente passam a experimentar precocemente os sintomas decorrentes da menopausa devido à perda do efeito protetor do estrogênio (Rocca *et al.*, 2009).

Fisiologicamente, o impacto causado pela menopausa cirúrgica é maior quando comparado à menopausa natural, uma vez que a ooforectomia induz a redução repentina e abrupta não só de estrogênio e progesterona, mas também de testosterona, resultando

em um declínio drástico na produção e biodisponibilidade de estradiol para tecidos dependentes, como por exemplo o encéfalo (Davison *et al.*, 2005), elevando ainda mais a vulnerabilidade às disfunções decorrentes da privação estrogênica. Como consequência, as mulheres submetidas à remoção cirúrgica do ovário vivenciam os sintomas da menopausa de forma mais precoce e mais severa do que aquelas que experimentam a perda progressiva da função ovariana naturalmente, incluindo risco aumentado de fraturas, doenças cardiovasculares, comprometimento cognitivo e transtornos emocionais, contribuindo para piora da qualidade de vida dessas mulheres e aumento da mortalidade (Rocca *et al.*, 2006; Rocca *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2009).

1.2.1 Modelo de ovariectomia

Modelos experimentais que mimetizam os efeitos da menopausa em roedores são amplamente utilizados na pesquisa pré-clínica, permitindo investigar os mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas decorrentes da privação hormonal e propor novas estratégias de tratamento/prevenção das comorbidades associadas. A técnica mais comumente empregada e melhor caracterizada na indução da menopausa experimental é a ovariectomia, que consiste na remoção bilateral dos ovários mimetizando a ooforectomia bilateral realizada em mulheres (Thompson *et al.*, 1995). Apesar de este modelo ser largamente utilizado em estudos que abordam a menopausa natural, ele é, na verdade, um modelo de menopausa cirúrgica, uma vez que a remoção dos ovários de fêmeas jovens resulta na interrupção repentina e abrupta da produção de todos os hormônios ovarianos, em contraste à perda gradual da função ovariana e redução progressiva dos níveis de estrogênios circulantes em animais naturalmente menopáusicos (Long *et al.*, 2018).

1.3 Distúrbios emocionais e cognitivos associados a privação de hormônios ovarianos

Dados epidemiológicos revelam que as mulheres são mais propensas a manifestar desordens neuropsíquicas, tais como ansiedade, depressão e outras alterações cognitivas, sendo a prevalência duas a três vezes maior que nos homens (Kessler *et al.*, 1993; Weissman e Olfson, 1995). Pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas têm

atribuído esta diferença sexo-específica à potente ação dos estrogênios no SNC, visto que o encéfalo é um dos órgãos mais afetados pela redução nos níveis deste hormônio (Mcewen, 2002; Walf e Frye, 2006).

Estudos pré-clínicos têm sugerido que o estrogênio exerce um efeito neuroprotetor no SNC, capaz de promover plasticidade sináptica, induzir sobrevivência neuronal e modular marcadores sinápticos que parecem ser relacionados à cognição (Mcewen, 2002; Gibbs e Gabor, 2003; Yang *et al.*, 2010). Além disso, trabalhos tem mostrado a influência do estrogênio sobre regiões encefálicas importantes para a aprendizagem, memória, emoções e o estado afetivo, tais como hipocampo e amígdala (Ter Horst, 2010; Dudai e Morris, 2013). O hipocampo é uma estrutura formada pelo giro denteado, região CA do hipocampo (subdivida em CA1, CA2 e CA3), e *subiculum*, enquanto a amígdala, ou complexo amigdalóide, é composta por diversos subnúcleos interconectados, sendo as regiões central, medial e basolateral as mais claramente definidas. Ambas as estruturas estão localizados no lobo temporal medial e são considerados como importantes componentes do sistema límbico (Figura 2), estando relacionadas à formação da memória, principalmente do tipo declarativa, e também participam diretamente da modulação de comportamentos emocionais e motivacionais (Izquierdo *et al.*, 1997; Kesner e Martinez, 2007; Koganezawa *et al.*, 2008).

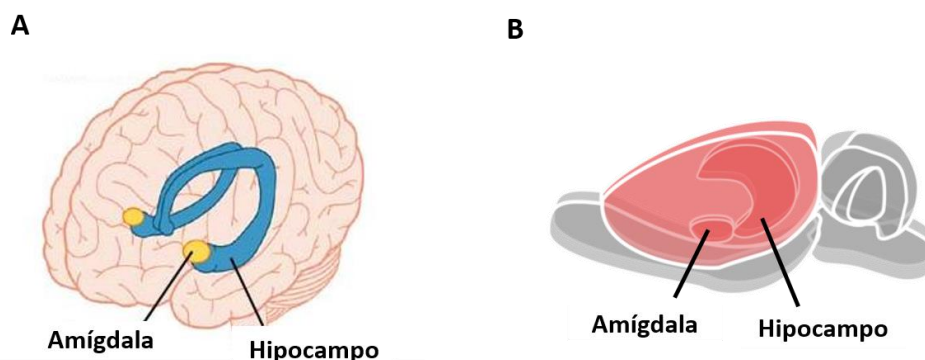


Figura 2. Representação ilustrativa da localização da amígdala e do hipocampo no encéfalo humano e de roedores. **A)** Amígdala e o hipocampo representados no encéfalo humano; **B)** amígdala e hipocampo representados no encéfalo de roedores.

Ensaio imunohistoquímicos apontam uma alta expressão de receptores de estrogênio de ambos os tipos (RE α e RE β) no hipocampo e na amígdala (Shughrue *et al.*, 1997; Mitra *et al.*, 2003). De fato, alterações neuroquímicas e estruturais vem sendo

observadas nesses núcleos em modelos de ovariectomia, incluindo a redução da densidade das espinhas dendríticas no hipocampo. Por outro lado, a administração periférica de estradiol nesse modelo aumenta a densidade sináptica e a atividade neuronal no hipocampo e na amígdala, e ainda eleva os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina que modula processos associados à plasticidade e memória (Nishizuka e Arai, 1982; Gould *et al.*, 1990; Woolley e Mcewen, 1993; Gibbs, 1999; Greco *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2013).

Além disso, sabe-se que o estrogênio participa do metabolismo da serotonina através da modulação da expressão da enzima triptofano hidroxilase e que neurônios serotoninérgicos originados no núcleo dorsal da rafe fazem projeções para o hipocampo, hipotálamo, amígdala e córtex pré-frontal, modulando respostas fisiológicas relacionadas à memória, humor, cognição, estresse e comportamento afetivo (Mcewen e Alves, 1999; Bethea *et al.*, 2002). Um estudo realizado por nosso grupo utilizando um modelo de restrição alimentar que induz a redução dos níveis de hormônios ovarianos mostrou que a infusão de estradiol no núcleo dorsal da rafe atenuou o comportamento associado à ansiedade nessas ratas (Campos *et al.*, 2019), enquanto Amin e cols., 2005 demonstraram que reposição de estradiol em ratas ovariectomizadas leva ao aumento da concentração de serotonina e seu metabólito 5-HIAA em várias áreas do encéfalo influenciando as respostas mediadas pelas regiões supracitadas (Amin *et al.*, 2005).

Tais achados sustentam a hipótese de que a deficiência estrogênica altera a neurotransmissão e função de núcleos reguladores dos processos cognitivos e emocionais, tornando as mulheres na pós-menopausa mais susceptíveis a desenvolver disfunções como ansiedade, depressão e déficit de memória. Considerando isto, esses distúrbios serão abordados com mais detalhes a seguir.

1.3.1 Ansiedade e resposta defensiva

A ansiedade pode ser considerada como um mecanismo de sobrevivência frente a ameaças quando ocorre de forma automática ou como sinal, sendo importante para o bom desempenho do indivíduo ao mobilizar sua adaptação ao ambiente no qual está exposto. Entretanto, quando manifestada de maneira excessiva, essa se torna patológica e não adaptativa, prejudicando a execução de tarefas básicas por envolver alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas (Graeff e Brandão, 1999). A ansiedade é

caracterizada por presença de preocupação constante, não-específica, muitas vezes irracional, ocorrendo em situações geralmente seguras (Paul e Lowry, 2013). Como resultado, o indivíduo apresenta comportamento mais cauteloso, aumento de vigilância como antecipação à ameaça futura, além de sintomas físicos, tais como tensão muscular, agitação, fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração e/ou perturbações do sono (A.P.A, 2013).

Modelos animais de ansiedade são largamente utilizados no estudo da neurobiologia desse transtorno, sendo o comportamento dos roedores classificado de acordo com o nível de ameaça a qual estão expostos. Assim, quando a ameaça é potencial, caracterizada pela incerteza do perigo e associada ao comportamento de ansiedade generalizada, o animal apresenta exploração cautelosa em direção à ameaça, como avaliação de risco e esquiva. Quando a ameaça é real, porém distal, o animal exhibe respostas defensivas de fuga ou congelamento (do inglês *freezing*; permanece imóvel), já quando o perigo é proximal, ocorrem tentativas explosivas de fuga ou agressão defensiva (estado de luta ou fuga), sendo ambos os comportamentos relacionados com a resposta de pânico (Blanchard *et al.*, 1993; Blanchard *et al.*, 2001). Diversas estruturas encefálicas participam da circuitaria da ansiedade, destacando-se a amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo, núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta periaquedutal (Graeff, 1981; Taugher *et al.*, 2014).

Estudos clínicos têm reportado que no período que antecede a menopausa (perimenopausa) – quando as concentrações dos hormônios ovarianos começam a decair mais intensamente – e adiante (menopausa e pós-menopausa), há um aumento significativo na incidência de ansiedade (Bromberger *et al.*, 2001). De maneira semelhante, Rocca e cols., 2008 realizaram um estudo de coorte e observaram que mulheres em idade fértil submetidas a cirurgia de ooforectomia apresentam risco aumentado a longo prazo de desenvolver ansiedade quando comparadas a mulheres da mesma idade com os ovários intactos (Rocca *et al.*, 2008), evidenciando o efeito neurofisiológico negativo causado pela privação dos hormônios ovarianos.

Efeitos similares têm sido observados em modelos de ovariectomia em roedores. Respostas comportamentais associadas à ansiedade foram detectadas em ratas após 2 a 10 semanas de ovariectomia, enquanto o tratamento com estradiol sistêmico, iniciado logo após o procedimento cirúrgico ou até 4 semanas depois, foi capaz de impedir tal resposta (Diaz-Veliz *et al.*, 1991; Lund *et al.*, 2005; Hiroi e Neumaier, 2006;

Pandaranandaka *et al.*, 2006; Donner e Handa, 2009; Daendee *et al.*, 2013; Hiroi *et al.*, 2016).

Sabendo que o hipocampo e a amígdala são regiões envolvidas na modulação da ansiedade, e ainda, que são alvo da ação dos estrogênios, as pesquisadoras Frye e Walf decidiram investigar se essas estruturas são recrutadas na modulação da ansiedade mediada por estradiol. Assim, elas avaliaram o comportamento de ratas ovariectomizadas após a administração de estradiol subcutaneamente, ou diretamente no hipocampo ou na amígdala e notaram que o comportamento do tipo ansiedade foi atenuado de forma similar por todas as vias de administração, confirmando a participação dessas regiões na modulação das respostas de ansiedade mediadas por estrogênio (Frye e Walf, 2004; Walf, A. A e Frye, C. A, 2005; Walf e Frye, 2006).

Por outro lado, resultados controversos têm sido obtidos acerca de alterações no comportamento associado à ansiedade dependente da fase do ciclo estral. Enquanto em alguns trabalhos foram encontradas diferenças entre as fases de maior e menor concentração de estrogênio (Diaz-Veliz *et al.*, 1997; Marcondes *et al.*, 2001), proestro e diestro respectivamente, em outros as fêmeas se comportaram de maneira semelhante em todos os estágios do ciclo (Nomikos e Spyraiki, 1988; Gouveia *et al.*, 2004).

1.3.2 Depressão

A depressão é considerada como um transtorno psiquiátrico heterogêneo, podendo ser causado por fatores biológicos, genéticos ou psicossociais (Kapczinski *et al.*, 2000). O distúrbio está associado à alterações psicológicas, comportamentais e fisiológicas (A.P.A., 2010), com sintomatologia caracterizada por perturbações no humor, anedonia, alterações cognitivas, motoras e das funções neurovegetativas, anorexia, ganho ou perda de peso, redução da libido e comprometimento dos ritmos circadianos normais (Hardman *et al.*, 2001). As regiões do cérebro envolvidas na neurobiologia da depressão incluem hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, que estão relacionadas à resposta exagerada à emoções negativas e culpa (Dusi *et al.*, 2015).

Young e cols., 2000 constataram que os níveis plasmáticos de estradiol são mais baixos, em torno de 30%, em mulheres diagnosticadas com depressão (Young *et al.*, 2000). Em conformidade, estudos longitudinais têm mostrado uma alta incidência de sintomas depressivos nas mulheres nos períodos perimenopausa e pós-menopausa (Avis e Mckinlay, 1995; Bebbington *et al.*, 1998), sendo estes ainda mais significativos em

mulheres submetidas à ooforectomia (Mckinlay *et al.*, 1987; Rocca *et al.*, 2008), indicando a participação do estrogênio nesse processo.

Com efeito, estudos em roedores tem reportado comportamento do tipo depressão em ratas ovariectomizadas, embora a resposta parece estar associada ao efeito da cessação estrogênica à longo prazo (Lagunas *et al.*, 2010; Gogos *et al.*, 2018). Em contrapartida, não só a administração sistêmica de estradiol como também central, especificamente no hipocampo e amígdala, produziram efeito antidepressivo nesse modelo (Frye e Walf, 2004; Walf, A. A e Frye, C. A., 2005; Walf, A. A. e Frye, C. A., 2005; Bastos *et al.*, 2015), atestando o efeito neuroprotetor do estrogênio quanto à modulação da depressão por estes núcleos.

1.3.3 Déficit de memória

A memória é definida como o processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações, e são moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e pelo estado de ânimo no qual a pessoa se encontra no momento, proporcionando experiências individualizadas e contribuindo para a personalidade de cada indivíduo (Izquierdo, 2002). A aquisição se refere à fase de aprendizagem, enquanto a formação e conservação são processos mais complexos que dependem do tipo de memória constituída, e por fim a evocação é a lembrança da informação armazenada (Squire *et al.*, 2004). No que se refere ao tipo de memória, elas podem ser classificadas quanto a duração (memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração) e ao conteúdo (memórias declarativas e memórias não declarativas). A memória de trabalho é imediata, a informação é mantida por apenas segundos ou poucos minutos e por isso essa memória é considerada como um gerenciador de informações para situações do dia-a-dia. Já as memórias de curta e longa duração armazenam a informação por horas e meses (até anos), respectivamente. A memória declarativa é caracterizada por recordações de fatos e eventos, enquanto a não declarativa está relacionada a habilidades e hábitos (Izquierdo, 2002; Bayley e Squire, 2003).

As memórias são formadas nos neurônios através da ativação de mecanismos de neurotransmissão complexos, e são armazenadas nessas redes neurais (Izquierdo, 2002). Diversas regiões encefálicas participam das diferentes etapas do processo de memória, destacando-se o hipocampo, que exerce um papel crucial nesse processo, bem como a

amígdala, córtex pré-frontal, córtex entorrinal, córtex perirrinal e cerebelo (Izquierdo *et al.*, 1997; Koganezawa *et al.*, 2008).

Atualmente, estudos clínicos e pré-clínicos têm apontado a importante função neuroprotetora dos estrogênios nos mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento cognitivo e demência, visto que o hipoestrogenismo está associado ao aumento do estresse oxidativo, perda sináptica e dendrítica, declínio na função neurotransmissora, apoptose e acúmulo de peptídeos β -amilóide (Hogervorst e Bandelow, 2010; Diaz Brinton, 2012), podendo levar à déficits de memória e cognição. Com efeito, piora cognitiva e comprometimento da memória são umas das principais queixas das mulheres na pós-menopausa (Sherwin, 1994), o que pode ser confirmado por estudos longitudinais que têm relatado um declínio cognitivo e de memória neste grupo (Goveas *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Karlamangla *et al.*, 2017).

Acosta e cols., 2009, ao comparar o modelo de menopausa natural induzida pelo composto *4-Vinylcyclohexene-diepoxide* com o de menopausa cirúrgica (ovariectomia) relataram diferenças nas funções cerebrais e piora na performance cognitiva das ratas ovariectomizadas (Acosta *et al.*, 2009). Esses dados sugerem que o tipo de menopausa (natural ou cirúrgica) pode interferir diretamente nos parâmetros avaliados e nas respostas observadas. Dessa forma, tais achados reforçam evidências já mencionadas sobre o risco aumentado e severidade dos sintomas menopáusicos em mulheres submetidas à ooforectomia durante a idade fértil, provavelmente devido a cessação abrupta e repentina da síntese endógena de estrogênios.

De fato, declínio cognitivo e déficit de memória tem sido reportados em avaliações à curto e longo prazo em mulheres ooforectomizadas em idade reprodutiva (Kritz-Silverstein e Barrett-Connor, 2002; Rocca *et al.*, 2007; Rocca *et al.*, 2008; Phung *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos mostram uma associação positiva entre Alzheimer e menopausa cirúrgica, enquanto o mesmo não foi visto em relação à menopausa natural (Nee e Lippa, 1999; Bove *et al.*, 2014). Estudos conduzidos em roedores revelam que a remoção cirúrgica dos ovários leva a uma performance piorada em testes de memória, além de alterar fatores relacionados à fisiopatologia da doença de Alzheimer, tais como aumento do acúmulo de β -amilóide, apoptose e astrogliose no hipocampo (Ding *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016). Em contrapartida, o tratamento sistêmico com estradiol, bem como a infusão deste no hipocampo de roedoras ovariectomizadas reverte tais alterações e melhora significativamente o desempenho em tarefas de memória

(Wallace *et al.*, 2006; Pike *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Bastos *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016; Djiogue *et al.*, 2018).

1.4 Perturbação do sistema renina angiotensina pela privação de hormônios ovarianos

O sistema renina angiotensina (SRA) é um dos principais mecanismos humorais responsáveis pelo controle cardiovascular e equilíbrio hidroeletrólítico, tendo um grande impacto sobre a pressão arterial (Hall *et al.*, 1990; Williamson *et al.*, 2017). Sabe-se que o SRA é formado por componentes que se contra regulam, e por essa razão é subdividido em duas principais vias classicamente rotuladas como eixo hipertensivo – composto por angiotensina (Ang) II, enzima conversora de Ang I em Ang II (ECA) e receptor de Ang II (AT₁) – e eixo anti-hipertensivo (ou hipotensivo) – formado por Ang (1-7), enzima conversora de Ang II em Ang II (1-7) (ECA2) e receptor de Ang (1-7) (Mas) (Santos *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2013) (Figura 3).

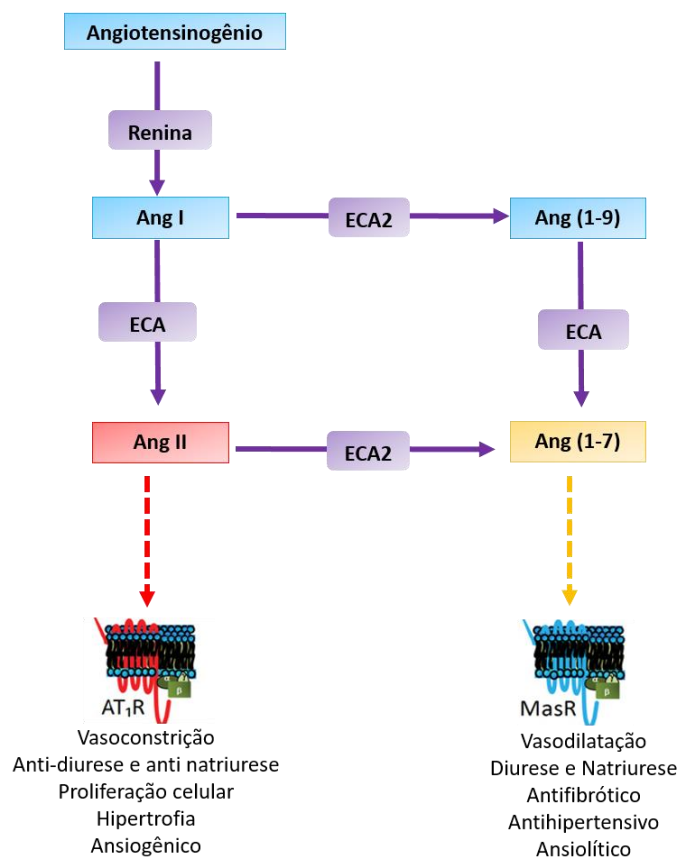


Figura 3. Componentes do sistema renina angiotensina (SRA). Esquema das vias conhecidas como hipertensiva (ECA, Ang II e AT₁) e anti-hipertensiva (ECA2, Ang 1-7 e Mas) e outros substratos intermediários (angiotensinogênio, renina e Ang 1-9) que integram o SRA. O angiotensinogênio é

convertido em Ang I através da renina. Por sua vez, a Ang I é convertida em Ang II pela ECA ou em Ang (1-9) pela ECA2. Tanto a Ang II como a Ang (1-9) podem ser convertidas em Ang (1-7) pela ECA 2 e ECA, respectivamente. As principais funções de cada receptor encontram-se descritas abaixo dos mesmos, permitindo notar as ações contra regulatórias resultantes da ativação de AT₁ por Ang II e Mas por Ang (1-7).

O desenvolvimento da hipertensão arterial parece sofrer influência da ação dos estrogênios sobre os componentes do SRA, uma vez que dados epidemiológicos mostram que a hipertensão ocorre mais precocemente em homens do que em mulheres na idade adulta, entretanto, este cenário é invertido na senescência, com maior prevalência de mulheres hipertensas em relação aos homens em idade correspondente (Roberts e Maurer, 1977; Burt *et al.*, 1995). Esta diferença entre gêneros tem sido associada ao efeito cardioprotetor do estrogênio, confirmando sua forte relação com os componentes cardiovasculares.

De fato, estudos em roedores já confirmaram a relação direta entre o estradiol e o SRA. Nesses trabalhos tem-se verificado expressão aumentada de ECA, AT₁ e renina em ratas ovariectomizadas (Schunkert *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1999; Harrison-Bernard *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2005; Tazumi *et al.*, 2016), levando ao aumento subsequente de Ang II e ativação dos receptores AT₁. Em contrapartida, a reposição de estradiol promove redução na expressão de ECA, AT₁, Ang II e renina, enquanto aumenta os níveis de ECA 2 e Ang (1-7), prevenindo a elevação da pressão nessas ratas (Schunkert *et al.*, 1997; Brosnihan *et al.*, 1999; Gallagher *et al.*, 1999; Harrison-Bernard *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos tem mostrado que a ovariectomia também é capaz de elevar os níveis de Ang II (Xue *et al.*, 2013), ECA e AT₁ no cérebro (Dean *et al.*, 2005), enquanto que a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) de estradiol aumentou a expressão de ECA 2, Ang (1-7) e Mas (Xue *et al.*, 2013), similarmente às respostas obtidas por tratamento periférico.

1.5 Efeito neuroprotetor de bloqueadores de receptores AT₁

Sabe-se que os componentes do SRA são produzidos localmente nos SNC, onde participam não somente da regulação de respostas autonômicas, como também sensoriais, imunes, comportamentais e cognitivas (Saavedra, 1992). De fato, estudos tem mostrado uma alta expressão de receptores AT₁ em regiões encefálicas envolvidas na modulação das respostas de ansiedade, depressão, emoção, estresse, aprendizado e memória, como

hipocampo e amígdala (Lenkei *et al.*, 1997). Além disso, dados consistentes têm apontado que a maior ativação dos componentes do eixo hipertensivo do SRA (Ang II/ECA/AT₁) produz efeitos ansiogênicos (Georgiev *et al.*, 1990; Voigt *et al.*, 1999; Braszko *et al.*, 2003), ao passo que o aumento da atividade do eixo anti-hipertensivo (Ang (1-7)/ECA2/Mas) previne/reverte o comportamento de ansiedade, sendo considerada, portanto, uma via ansiolítica (Bild e Ciobica, 2013; Kangussu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Dessa forma, sugere-se que os componentes do SRA também participam da neurobiologia das disfunções cognitivas e emocionais, no entanto, o mecanismo envolvido nesse processo ainda não está claro.

Atualmente tem-se reportado o efeito neuroprotetor dos bloqueadores de receptores de AT₁ (BRAs). Estes fármacos – losartana, telmisartana, candesartana, irbesartana, valsartana, olmesartana, eprosartana e azilsartana – foram inicialmente desenvolvidos com o propósito de inibir os efeitos patológicos da estimulação exacerbada dos receptores AT₁ na vasculatura periférica e assim normalizar a pressão arterial elevada (Aulakh *et al.*, 2007; Skrbic e Igetic, 2009). No entanto, vários estudos têm mostrado o perfil pleiotrófico dos BRAs em roedores e humanos, como efeitos ansiolíticos, antidepressivos, e redução do declínio cognitivo e da progressão do Alzheimer (Tedesco *et al.*, 1999; Saavedra *et al.*, 2006; Mechaieil *et al.*, 2011; Tota *et al.*, 2013; Ongali *et al.*, 2014).

A losartana, o BRA mais utilizado no meio clínico, tem demonstrado melhorar as funções cognitivas e transtornos emocionais, podendo emergir como uma potencial alternativa terapêutica para tais disfunções. Estudos clínicos mostraram que o losartana melhora a cognição em pacientes normotensos e hipertensos (Tedesco *et al.*, 1999; Mechaieil *et al.*, 2011). Além disso, o losartana administrado periférica e centralmente na amígdala ou no ventrículo lateral atenua o comportamento do tipo ansiedade e a disfunção cognitiva em animais previamente tratados com Ang II ou submetidos a um protocolo de estresse (Braszko *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Llano Lopez *et al.*, 2012; Ranjbar *et al.*, 2018). Tais evidências reforçam o envolvimento do SRA na modulação das respostas comportamentais e cognitivas, e ainda sugerem que os BRAs deveriam ser testados em ensaios clínicos controlados, sob o conceito de reposicionamento de fármaco (do inglês, *drug repurposing*), que é aplicado a medicamentos já bem estabelecidos no mercado buscando uma nova indicação terapêutica pela modulação do mesmo alvo (Swamidass, 2011).

1.6 Losartan: potencial opção terapêutica no tratamento de disfunções comportamentais e cognitivas na pós-menopausa

Apesar dos inúmeros estudos mencionados neste trabalho, bem como muitos outros na literatura, elucidarem os efeitos benéficos do tratamento com estradiol sobre funções cognitivas, emocionais e cardiovasculares, o tratamento de reposição hormonal ainda é controverso no meio clínico, visto que ele também está associado ao risco aumentado de câncer de mama, ovário e endométrio, sendo, portanto, ainda muito questionado em relação aos seus benefícios globais para a saúde e bem-estar da mulher na pós-menopausa (natural ou cirúrgica) (Collaborative Group, 1997; Wannmacher e Jn, 2004). Além disso, muitos autores acreditam na hipótese da “janela de oportunidade”, que afirma que há um período específico após a menopausa (natural ou cirúrgica) em que a terapia de reposição hormonal é eficaz, no entanto, ainda não há um consenso na literatura sobre o período exato em que essa janela se inicia e por quanto tempo dura, porém sabe-se que se o tratamento for iniciado após esse período ele pode ser ineficiente ou até mesmo deletério (Maki, 2006; Sherwin, 2009; Whitmer *et al.*, 2011). Por outro lado, os medicamentos ansiolíticos e antidepressivos existentes atualmente no mercado provocam efeitos colaterais que prejudicam a realização de atividades básicas e a qualidade de vida dos pacientes, tais como sonolência, comprometimento da memória, dependência química, e alguns indivíduos se tornam resistentes ao tratamento (Brambilla *et al.*, 2005; Uzun *et al.*, 2010; Ait-Daoud *et al.*, 2018). Assim, torna-se necessária a investigação de novas terapias, mais vantajosas e seguras para o tratamento de tal grupo.

No entanto, mesmo com a maior prevalência de transtornos emocionais e cognitivos em mulheres, bem como a maior relevância destes e de hipertensão em mulheres na senescência em comparação aos homens em idade correspondente, a grande maioria dos estudos experimentais continuam sendo conduzidos em machos. Inúmeros trabalhos já relataram que muitas das diferenças fisiológicas sexo-específicas são dependentes do estradiol, e a privação deste acarreta/intensifica muitas disfunções. De fato, até onde sabemos, não há estudos avaliando os efeitos dos BRAs sobre as respostas cognitivas e emocionais resultantes da depleção abrupta de hormônios ovarianos. Assim, uma investigação com enfoque nesta condição seria de grande relevância, uma vez que seus resultados poderão contribuir para a sugestão de uma opção terapêutica conjunta para diferentes disfunções causadas pela menopausa cirúrgica e natural, no qual o BRA poderia simultaneamente atuar no controle da hipertensão e também das disfunções

neuropsiquiátricas associadas, incluindo declínio cognitivo e de memória, ansiedade e depressão.

Assim, considerando que a depleção da produção endógena de hormônios ovarianos altera a homeostase do SRA, e também está associada ao déficit de cognitivo e transtornos emocionais como ansiedade e depressão em mulheres na pós-menopausa; e ainda, alterações nos componentes do SRA podem contribuir para o desenvolvimento de tais disfunções comportamentais; nós hipotetizamos que a privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia promove alterações no hipocampo e na amígdala, que são estruturas encefálicas cruciais envolvidas na modulação dos processos de memória e comportamentos emocionais, levando a disfunções como déficit de memória, ansiedade e depressão, e que o tratamento com losartana, um bloqueador de receptores AT₁, é capaz de prevenir o desenvolvimento de tais disfunções neste modelo.

CAPÍTULO 1

Neste capítulo abordaremos a influência de diferentes níveis circulantes de hormônios ovarianos – durante determinadas fases do ciclo estral e pós-ovariectomia – sobre alterações comportamentais associadas à ansiedade.

Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, na Universidade Federal de Ouro Preto.

2.OBJETIVO

Avaliar a influência das fases do ciclo estral e da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade em ratas fêmeas.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as alterações comportamentais associadas à ansiedade em ratas intactas submetidas a uma bateria de testes (labirinto em T elevado, campo aberto e paradigma claro/escuro) durante as fases proestro e diestro do ciclo estral;
- ✓ Avaliar o efeito da privação hormonal induzida por ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade avaliado em uma bateria de testes (labirinto em T elevado, campo aberto e paradigma claro/escuro).

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Para os experimentos do capítulo I foram utilizadas ratas adultas da linhagem Fischer pesando entre 200 e 240 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciências Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP) e conduzidos para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, onde permaneceram alojados coletivamente em gaiolas de polietileno (dimensões de 41cm x 34 cm x 17 cm). Após a transferência dos animais para o novo biotério, foi respeitado um período de cinco dias para a realização dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de experimentação os animais foram acondicionados sob temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o protocolo CEUA/UFOP nº2015/17, e de acordo com as diretrizes da Lei 11.794 (Lei Arouca) e do Guia de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório do *National Research Council*, EUA.

3.2 Fármacos utilizados nos procedimentos cirúrgicos

Solução de Cetamina + Xilazina (anestésico): Cetamina (Syntec do Brasil Ltda; Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda Hortolândia/São Paulo) e Xilazina (Dopaser - Solução Injetável; Laboratórios Caller AS, Barcelona/Espanha). Dose: Cetamina: 80 mg/kg; Xilazina: 7 mg/kg e volume de 0,1 mL/100 g de peso corporal, administrado por via intraperitoneal (i.p).

Pentabiótico Veterinário (antibiótico): Fort Dodge Animal Health, Hialeah, FL, EUA - Dose: 4.800UI de penicilina, 2 mg de estreptomicina e 2 mg de diidroestreptomicina por kg de peso. O volume injetado foi 0,1 mL/100 g de peso corporal por via intramuscular (i.m).

Cetoprofeno (Ketoflex 1% p/v; antiinflamatório): Mundo Animal, Pindamonhangaba, SP, Brasil - Dose: 0,03 mL/300 g de peso corporal no volume de 0,1 mL/300 g de animal, administrado i.m.

3.3 Procedimento cirúrgico - Ovariectomia

As ratas aleatoriamente selecionadas para compor os grupos OVX (ratas ovariectomizadas) e Sham (ratas submetidas à intervenção cirúrgica falsa) foram anestesiadas com solução de cetamina e xilazina por via i.p (volume de 0,1 mL/100 g de peso corporal). Após confirmação da ausência de reflexos interdigital, palpebral e corneal e de pinçamento da cauda, deu-se início aos procedimentos cirúrgicos. Tais sinais foram monitorados regularmente no decorrer da cirurgia, e quando necessário, a dose anestésica foi reforçada. A temperatura corporal das ratas foi mantida por meio do uso de manta térmica.

Animais OVX: os flancos direito e esquerdo foram tricotomizados e assepsiados. Com o animal em decúbito lateral fez-se uma pequena incisão (1 a 1,5 cm) através da pele e da musculatura lateral do abdome, entre o bordo superior da coxa e a última costela. Por meio desta incisão, o ovário foi identificado e exteriorizado, e a tuba uterina e artérias ováricas foram clampadas logo abaixo do ovário, a fim de evitar sangramentos. Em seguida os ovários foram removidos e as tubas uterinas reposicionadas na cavidade abdominal. Finalmente, as camadas muscular, telas subcutâneas e pele foram suturadas individualmente.

Animais Sham: similarmente, realizou-se a incisão da pele e musculatura na mesma localização dos OVX, entretanto os ovários foram apenas identificados, exteriorizados e logo após reposicionados novamente, sem remoção do mesmo, e por fim as camadas de tecido foram suturadas.

Ao final dos procedimentos os animais receberam injeção de cetoprofeno (volume de 0,1 mL/100 g de peso corporal) e uma dose profilática de antibiótico, ambas por i.m, para prevenção de inflamações e infecções. A seguir, foram realocados em gaiolas individuais mantidas sobre mantas térmicas para minimizar os efeitos hipotérmicos causados pelo anestésico. Somente após a recuperação completa dos efeitos anestésicos é que os animais foram alojados coletivamente novamente. Nenhum procedimento experimental foi realizado nas duas semanas seguintes, a fim de assegurar a recuperação das ratas e garantir a cessação da produção dos hormônios ovarianos.

3.4 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral das ratas intactas e sham foi avaliado durante duas semanas antecedentes ao início dos experimentos. Este acompanhamento fez-se necessário para garantir que todas as fêmeas utilizadas nesta etapa estavam mantendo o ciclo reprodutivo regular durante os dias em que foram submetidas aos testes comportamentais. A fase do ciclo foi determinada conforme descrito por Marcondes e colaboradores (Marcondes *et al.*, 2002). Os animais foram segurados pelo dorso e com a utilização de uma pipeta, inseriu-se a ponteira no orifício vaginal e coletou-se a secreção vaginal com 10 μ L de PBS. A secreção retirada foi colocada em uma lâmina higienizada e em seguida visualizada no microscópio na lente objetiva de 40x. As fases do ciclo são determinadas de acordo com tipo celular predominante. Nesse sentido, a predominância de células epiteliais é correspondente a fase proestro, células corniformes correspondem a fase estro, a presença majoritária de leucócitos indica a fase diestro, e quando os três tipos celulares aparecem em quantidade proporcional denomina-se metaestro.

Definimos proestro e metaestro/diestro como as fases de interesse neste capítulo, visto que são os períodos de maior e menor concentração de estrogênio no decorrer do ciclo, respectivamente (Butcher *et al.*, 1974). No entanto, devido aos resultados encontrados no Experimento 1, decidimos por utilizar no Experimento 2 apenas ratas Sham no metaestro/diestro. Assim, os animais foram submetidos aos testes comportamentais durante as fases específicas do ciclo de acordo com o protocolo experimental.

3.5 Aparatos utilizados para testes comportamentais

3.5.1 Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado (LTE) é um aparato que avalia dois comportamentos defensivos distintos: 1) esquiva inibitória, caracterizada pela reação de exploração cautelosa frente à ameaça potencial e associada à respostas de ansiedade generalizada; 2) fuga, considerada como a reação defensiva do animal frente ao perigo proximal e relacionada ao comportamento de pânico (Blanchard *et al.*, 1986; Brandao *et al.*, 2008). Tais testes são baseados no medo inato que os ratos apresentam de altura e espaços abertos (Montgomery, 1955), provavelmente por não conseguirem realizar tigmotaxia com suas

vibrissas (Treit *et al.*, 1993) quando estão explorando a parte aberta do labirinto. A capacidade de diferenciar estes dois tipos de ansiedade em um mesmo equipamento, utilizando o mesmo animal, em uma mesma sessão experimental, é considerado o diferencial desta versão do labirinto para testes de ansiedade (Zangrossi e Graeff, 2014).

O LTE é composto por três braços de dimensões iguais (50 cm x 12 cm), sendo um dos braços fechado por paredes de 40 cm de altura e outros dois abertos e perpendiculares a este. Para evitar quedas, os braços abertos são cercados por bordas de acrílico transparente de 1 cm. O LTE possui uma base medindo 50 cm de altura, para que o mesmo fique elevado em relação ao solo (Figura 4A).

O teste é composto por duas etapas. Na primeira é avaliado o comportamento de esquiva inibitória do animal em três exposições consecutivas ao braço fechado do LTE (basal, esquiva 1 e esquiva 2), no qual o animal é colocado na extremidade distal desse braço e afere-se o tempo de latência para sair dele. O aumento do tempo de latência da esquiva inibitória está relacionado ao comportamento do tipo ansiedade. Na segunda etapa do teste o animal é posicionado na extremidade distal de um dos braços abertos e o tempo de latência para sair desse braço é contabilizado em três exposições consecutivas (fuga 1, fuga 2 e fuga 3). Esta resposta é definida como fuga, e a redução da latência de fuga é associada ao comportamento do tipo pânico. As exposições de ambas as etapas tiveram tempo máximo de 300 segundos com intervalo de 30 segundos entre cada uma.

3.5.2 Campo aberto

O campo aberto (CA) é um aparato que permite a avaliação tanto da atividade locomotora espontânea, como de respostas associadas à ansiedade, devido ao medo natural dos roedores de espaços abertos e com dimensões maiores que o ambiente ao qual estão familiarizados (Prut e Belzung, 2003). Por esse motivo, a porção central da arena torna-se um local aversivo para esses animais. Adicionalmente, a avaliação da atividade locomotora é essencial após a realização de testes no LTE, para garantir que a latência aumentada ou diminuída nas repostas de esquiva inibitória e fuga são, de fato, por alterações comportamentais e não por algum comprometimento locomotor provocado pelo tratamento experimental (Zangrossi e Graeff, 2014). Assim, nesta etapa utilizamos uma arena quadrada de acrílico medindo 60 cm x 60 x 40 cm com a base subdividida em 16 quadrantes (Figura 4B). A atividade locomotora foi mensurada através da contabilização do número total de quadrados atravessados por cada rata, enquanto o

comportamento do tipo ansiedade foi relacionado à redução no número de entradas e o tempo gasto na parte central da arena durante os 5 minutos de teste.

3.5.3 Paradigma claro/escuro

O teste do paradigma claro/escuro (PCE) baseia-se no comportamento inato de aversão dos roedores a áreas iluminadas, e no conflito natural decorrente da exposição a um ambiente não-familiar. Tal conflito ocorre principalmente pela tendência natural dos roedores à exploração de ambientes novos em contraste à tendência inicial de evitar locais desconhecidos (neofobia). A atividade exploratória desses animais na PCE reflete um efeito combinado dessas duas tendências. Além disso, o aumento nas transições entre ambos os lados, sem um aumento espontâneo da atividade locomotora por meio de drogas, sugere um índice da atividade ansiolítica (Bourin e Hascoet, 2003).

O aparato utilizado é composto por dois compartimentos de acrílico, um feito com material transparente (claro) e outro feito com material preto e opaco (escuro). Os dois compartimentos são conectados por uma abertura de 11 cm, permitindo que os animais transitem de um lado para outro da caixa (Figura 4C). O teste foi iniciado no compartimento claro e os animais tiveram 300s para explorar todo o ambiente. O número de vezes que o animal atravessou de um compartimento ao outro e o tempo que permaneceu em cada um deles foi registrado, sendo o comportamento do tipo ansiedade associado a menor exploração da parte clara do aparato.

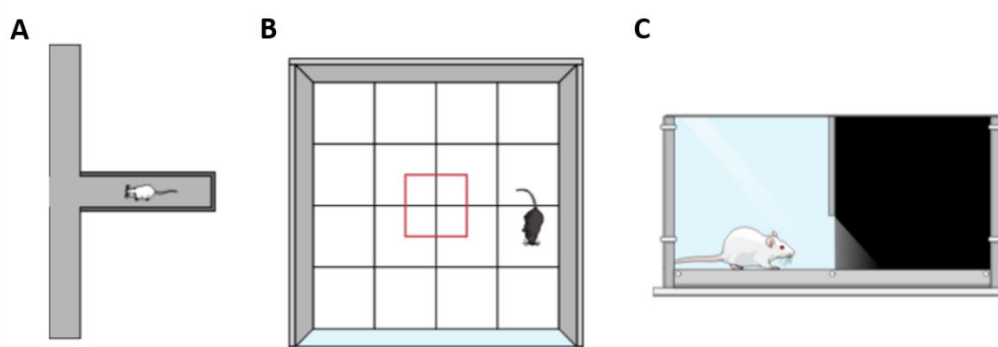


Figura 4. Representação ilustrativa dos aparatos utilizados para a avaliação comportamental. **A)** Labirinto em T elevado utilizado para avaliação dos comportamentos de esquivia inibitória e fuga; **B)** Campo aberto utilizado para avaliação de respostas de ansiedade e atividade locomotora; **C)** Paradigma claro/escuro utilizado na avaliação de comportamento do tipo ansiedade.

3.6 Delineamento experimental

Foram utilizados 31 animais, sendo estes divididos aleatoriamente em grupos Intacta-Proestro, Intacta-Diestro, Sham-Diestro e OVX. O ciclo estral dos dois primeiros grupos citados foi acompanhado durante duas semanas consecutivas e ao final deste tempo as ratas foram expostas à bateria de testes comportamentais que serão elucidados mais adiante. Já as ratas dos dois últimos grupos foram submetidas ao protocolo cirúrgico correspondente (Sham ou ovariectomia, respectivamente) e após 3 semanas foram avaliadas nos testes comportamentais. Assim como realizado com as ratas intactas, o ciclo do grupo Sham também foi acompanhado durante as duas semanas antecessoras aos testes. Para estes grupos, só foram consideradas adequadas para o estudo as ratas que apresentavam ciclo estral regular no período acompanhado.

3.6.1 Protocolos experimentais

Experimento 1 - *Avaliação comportamental de ratas intactas durante as fases proestro e diestro do ciclo estral:*

O ciclo estral das ratas foi acompanhado durante 2 semanas consecutivas. Ao final deste período, a bateria de testes comportamentais foi realizada quando estas ratas estavam nas fases proestro ou diestro (lembrando que consideramos diestro as ratas nas fases metaestro e diestro, por ambas corresponderem a fase não ovulatória – menor concentração de estradiol – do ciclo) (Figura 5A).

Experimento 2 - *Avaliação comportamental de ratas OVX e Sham durante as fases diestro do ciclo estral:*

Devido aos resultados obtidos no experimento anterior, em que não houve diferença comportamental dependentes da fase do ciclo em nenhum dos testes aplicados, optamos por utilizar apenas ratas Sham no metaestro/diestro neste experimento, por compreender 2 dias de ciclo não ovulatório, ao invés de optar por conduzir os testes durante o proestro, visto que o pico de estrogênio é observado em apenas 1 dia do ciclo. Assim, as ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico (Sham) ou ovariectomia (OVX) e após 3 semanas o desempenho das mesmas foi avaliado nos testes

comportamentais. Nas duas últimas semanas do período pós-cirúrgico, o ciclo estral das Sham foi acompanhado e os testes comportamentais foram realizado nos dias em que as ratas estavam na fase diestro (Figura 5B).

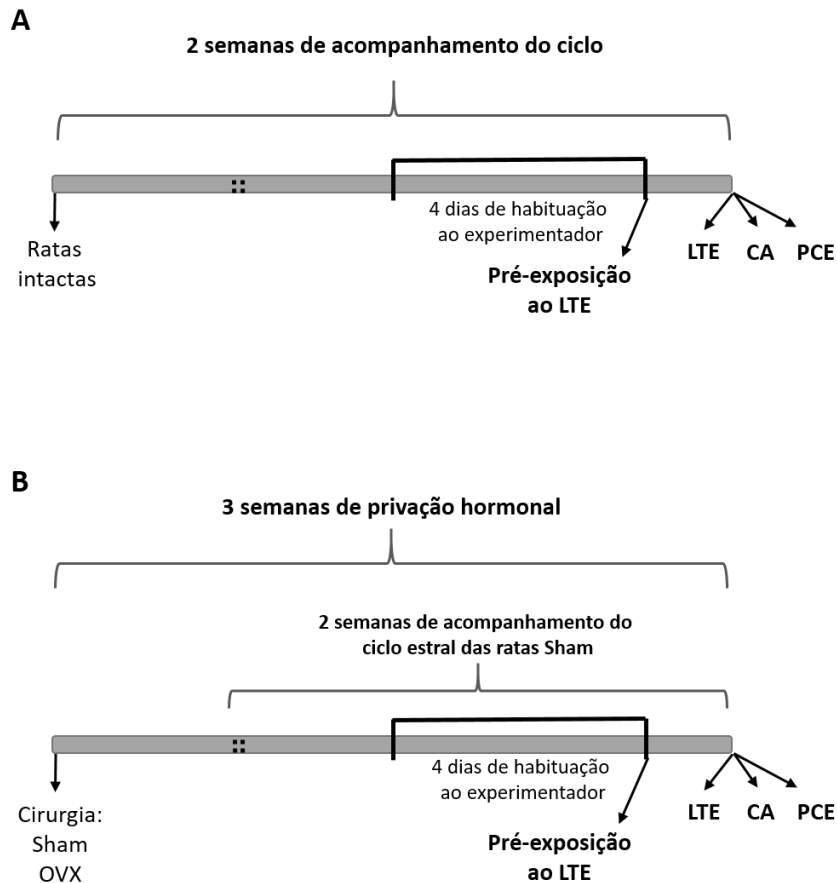


Figura 5. Esquema temporal dos protocolos experimental realizado destacando os procedimentos utilizados neste capítulo. **A)** O ciclo estral de ratas intactas foi acompanhado por 2 semanas. Ao final da segunda semana foram realizados os testes comportamentais; **B)** As ratas foram submetidas a cirurgia OVX ou cirurgia simulada (Sham) e após 3 semanas pós-cirurgia foram realizados os testes comportamentais. O ciclo estral das ratas Sham foi acompanhado durante as 2 semanas prévias a condução dos testes.

3.6.2 Protocolo comportamental

Os animais foram previamente habituados ao experimentador por 5 minutos durante quatro dias consecutivos antes do início dos procedimentos experimentais (Figura 6). Como os testes comportamentais são extremamente sensíveis e exigem rigoroso controle do ambiente, torna-se necessário habituar o animal ao experimentador para que

o contato entre eles durante os testes não interfira na resposta comportamental exibida pelo animal, o que alteraria os resultados.

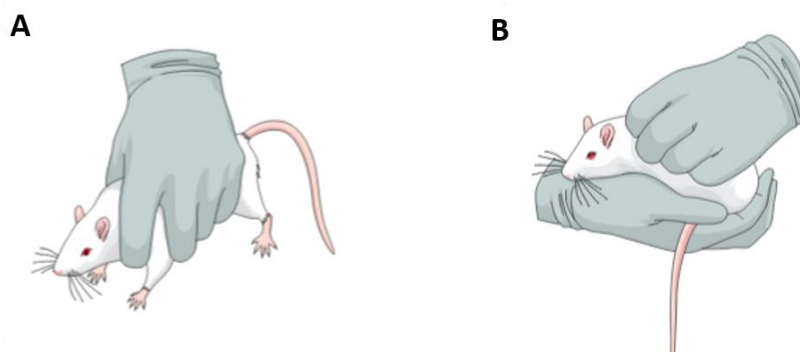


Figura 6. Representação da forma adequada de manuseio dos animais durante o período de habituação ao experimentador. **A)** ilustra como o animal deve ser segurado para que o mesmo não morda ou escape do experimentador durante a habituação e também durante a condução dos testes; **B)** ilustra como o animal deve ser acalmado para que o mesmo não entenda a manipulação como um risco.

No quarto dia de habituação ao experimentador, os animais foram pré-expostos a um dos braços abertos do LTE por 30 minutos. Para isso, uma barreira foi colocada no final da parte proximal do braço aberto, antes da plataforma central, isolando este braço e impedindo que a rata tivesse acesso ao restante do labirinto. Segundo a literatura, este procedimento foi adicionado ao protocolo do LTE pois este passo permite que os animais explorem o braço aberto previamente a condução do teste, o que melhora a resposta de fuga, evitando que o animal explore esta parte do aparato no momento do teste (Teixeira *et al.*, 2000; Zangrossi e Graeff, 2014).

No dia seguinte realizou-se os testes comportamentais, que foram conduzidos de forma consecutiva com intervalo de 30 segundos entre cada teste, conforme já descrito na literatura (Casarotto *et al.*, 2012; Strauss *et al.*, 2013; Vicente e Zangrossi, 2014). Dessa forma, o animal foi inicialmente exposto aos testes de esquiva inibitória e fuga no LTE. Após intervalo de 30 segundos, o mesmo animal foi avaliado no CA, e passados mais 30 segundos de intervalo, o animal foi submetido ao teste no CCE (Figura 5). Noventa minutos após o término do último teste os animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca, e os encéfalos foram coletados e armazenados para análises posteriores. Os testes foram realizados sob 300 lux de iluminação e os aparatos foram

higienizados com álcool 20% após a exposição de cada animal à sessão experimental, conforme Campos e cols., 2019.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos neste capítulo foram analisados estatisticamente através da comparação entre duas médias utilizando o teste *t* de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. As exposições ao LTE foram analisadas por one-way ANOVA de medidas repetidas, seguidas por *t* de Student, ou Mann-Whitney quando adequado, para avaliações entre grupos por exposição. Consideramos o nível de significância de 0,05 e todos os valores foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM).

4.RESULTADOS

4.1 Influência do ciclo estral sobre respostas comportamentais associadas à ansiedade de ratas intactas avaliadas nas fases proestro e diestro

Com o intuito de verificar a influência das flutuações de estrogênio no decorrer do ciclo estral sobre as respostas do tipo ansiedade e do tipo pânico, avaliamos o comportamento de ratas intactas no labirinto em T elevado, campo aberto e paradigma claro/escuro durante duas diferentes fases do ciclo, compreendidas em períodos de maior (proestro) e menor (diestro) concentração do hormônio.

Nesse sentido, a performance apresentada no LTE pelas ratas de ambos os grupos estudados mostrou não haver diferença quanto ao tempo de latência para deixar o braço fechado no teste de esquiva inibitória em análises intragrupo (Proestro: $F^{(1,01, 6,07)} = 4,98$; $p = 0,067$. Diestro: $F^{(1, 3)} = 4,76$; $p = 0,117$. One-way ANOVA) e entregrupos, (Basal: $12s \pm 6,19$ vs $7s \pm 0,71$, $p > 0,05$, teste t de Student; Esq1: $17,29s \pm 4,43$ vs $7.5s \pm 1,5$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney; Esq2: $129,6s \pm 52,31$ vs $170,8s \pm 75,05$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney) (Figura 7A). O mesmo padrão pôde ser observado em relação ao teste de fuga no mesmo aparato, no qual não foi encontrada diferença significativa nos tempos de saída do braço aberto dentro do mesmo grupo (Proestro: $F^{(1,26, 8,82)} = 1,99$; $p = 0,195$. Diestro: $F^{(1,15, 3,46)} = 0,383$; $p = 0,603$. One-way ANOVA), bem como entre os grupos em cada exposição (Fuga 1: $17,13s \pm 2,35$ vs $18,5s \pm 5,07$, $p > 0,05$, teste t de Student; Fuga 2: $20,63s \pm 7,37$ vs $25,5s \pm 3,6$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney; Fuga 3: $35,13s \pm 13,14$ vs $30s \pm 15,04$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney) (Figura 7B). Tais resultados indicam que variação de níveis de estrogênio durante o ciclo estral não interfere no comportamento do tipo ansiedade e pânico em ratas intactas.

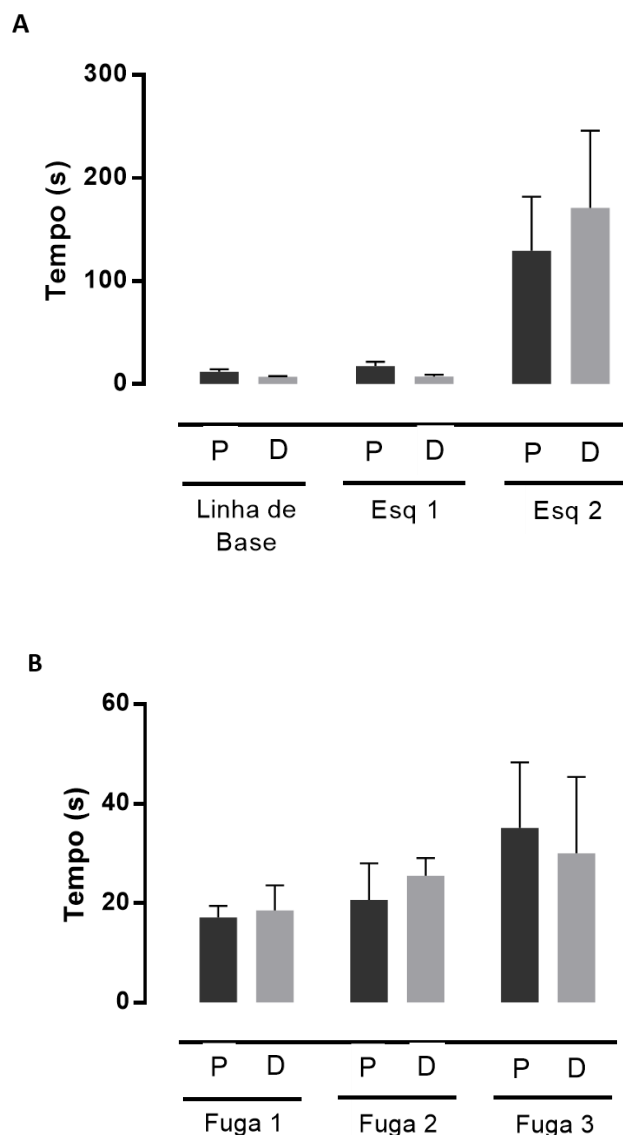


Figura 7. Avaliação do comportamento do tipo ansiedade e do tipo pânico em ratas intactas submetidas à testes no labirinto em T elevado em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro). **A)** Tempo de latência (s) da esquiiva inibitória em três exposições ao braço fechado do LTE (Basal, Esq 1 e Esq 2); **B)** Tempo de latência (s) de fuga em três exposições ao braço aberto do LTE (Fuga 1, 2 e 3). Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando os testes one-way ANOVA, *t* de student e Mann-Whitney, nível de significância $p < 0,05$. P: proestro ($n = 8$); D: diestro ($n = 4$).

Adicionalmente, as ratas dos grupos Proestro e Diestro apresentaram atividade locomotora semelhante ($59,6$ quadrados $\pm 6,01$ vs $51,75$ quadrados $\pm 16,35$, $p > 0,05$, teste *t* de Student) (Figura 8A). Além disso, não foi observado significância no número de quadrados centrais percorridos pelos os grupos no teste do CA ($7,43$ quadrados. $\pm 1,8$

vs $5 \text{ quad.} \pm 1,58$, $p > 0,05$, teste t de Student) (Figura 8B), sugerindo não haver influência da fase do ciclo estral sobre as respostas associadas à ansiedade.

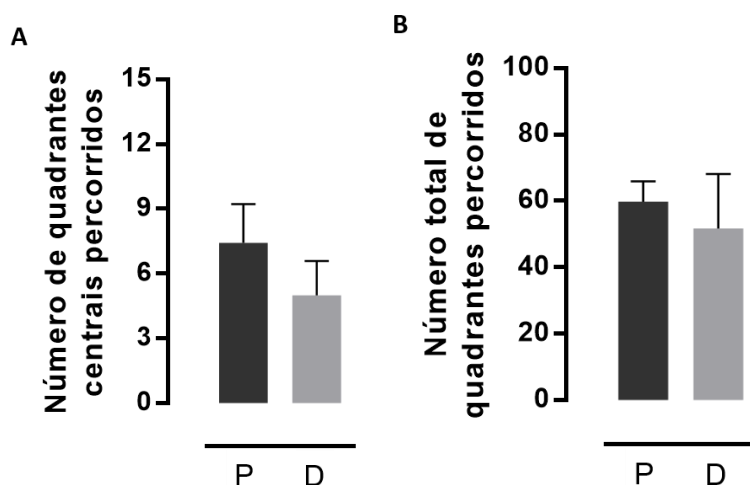


Figura 8. Avaliação comportamental de ratas intactas submetidas ao teste do campo aberto em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro). **A)** Número de quadrados totais percorridos; **B)** Número de quadrados centrais percorridos. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando teste t de Student, nível de significância $p < 0,05$. P: proestro ($n = 8$); D: diestro ($n = 4$).

Também não foram identificadas diferenças significativas no comportamento exibido no PCE entre as ratas nas fases proestro e diestro, uma vez que elas apresentaram frequência de entradas ($3 \text{ entradas} \pm 0,44$ vs $3,75 \pm 1,31$ entradas, $p > 0,05$, teste t de Student) (Figura 9A) e tempo de exploração semelhantes no compartimento claro do aparato ($34,86\text{s} \pm 13,38$ vs $45,5 \pm 23,31$, $p > 0,05$, teste t de Student) (Figura 9B), reforçando os resultados anteriores que sugerem, conjuntamente, que o ciclo estral não afeta o comportamento associado à ansiedade.

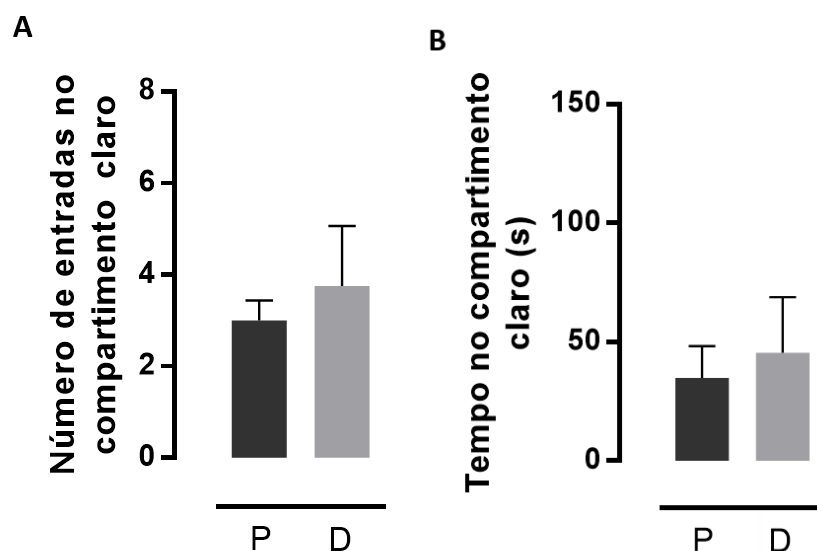


Figura 9. Avaliação do comportamento do tipo ansiedade em ratas intactas submetidas ao teste do paradigma claro/escuro em diferentes fases do ciclo estral (proestro e diestro). **A)** Número de entradas no compartimento claro do PCE; **B)** Tempo de exploração do compartimento claro do PCE. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando teste *t* de Student, nível de significância $p < 0,05$. P: proestro ($n = 8$); D: diestro ($n = 4$).

4.2 Efeito da depleção de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia sobre respostas comportamentais associadas à ansiedade avaliada em diferentes tipos de testes na 3ª semana pós-ovariectomia

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, optamos por avaliar o comportamento das ratas Sham apenas no Diestro (compreendido aqui neste trabalho pelas fases metaestro e diestro, que são os períodos do ciclo de menor concentração de estrogênio), uma vez que não encontramos diferença nas respostas comportamentais entre os grupos proestro e diestro em ratas intactas.

Assim, após análise estatística, notamos que as ratas OVX exibem comportamento do tipo ansiedade no teste de esQUIVA inibitória no LTE na terceira semana pós-ovariectomia quando comparadas às ratas Sham, visto que as OVX apresentaram maior tempo de latência para sair do braço fechado nas esQUIVAS 1 e 2 (Basal: $8,75s \pm 1,7$ vs $19,56s \pm 4,08$, $p > 0,05$, teste *t* de Student; Esq1: $7,25s \pm 2,02$ vs $83,11s \pm 41,37$, $p = 0,038$, teste Mann-Whitney; Esq2: $9s \pm 2,04$ vs $104,6s \pm 39,52$, $p = 0,032$, teste Mann-Whitney) (Figura 10A). Por outro lado, foi observado que as ratas OVX apresentaram menor no tempo de latência para deixar o braço aberto na primeira exposição ao teste de

fuga em comparação com o grupo Sham, indicando que a resposta de fuga também foi afetada pela privação de hormônios ovarianos (Fuga 1: $27,75s \pm 6,84$ vs $13,22s \pm 1,5$, $p = 0,012$, teste t de Student; Fuga 2: $24,25s \pm 14,7$ vs $12,11s \pm 1,92$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney; Fuga 3: $21,25s \pm 4,71$ vs $20,22 \pm 5,93$, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney) (Figura 10B). O teste one-way ANOVA mostrou não haver diferença entre as exposições dentro de cada grupo tanto na avaliação de esquiava inibitória (Sham: $F(1,871, 5,614) = 0,4175$; $p = 0,6654$. OVX: $F(1,992, 15,94) = 2,253$; $p = 13,76$), como no teste de fuga (Sham: $F(1,097, 3,29) = 0,2998$; $p = 0,6391$. OVX: $F(1,155, 9,239) = 2,39$; $p = 0,1549$).

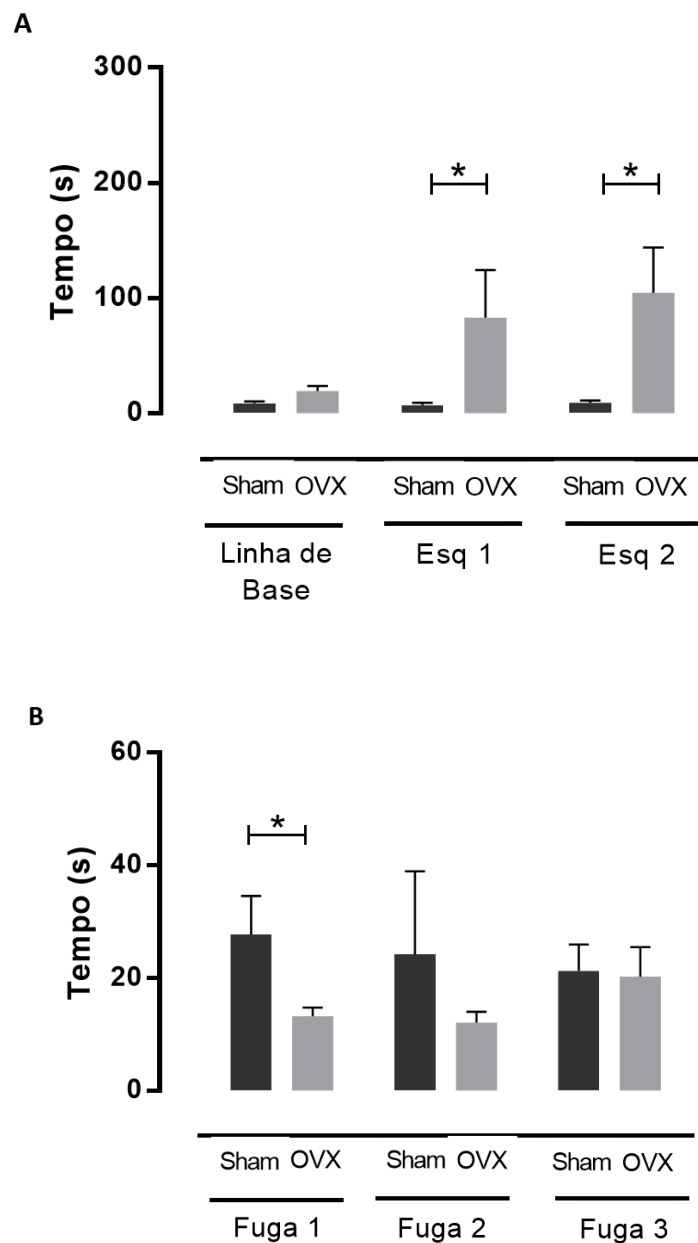


Figura 10. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade avaliado no labirinto em T elevado na 3ª semana pós-ovariectomia. **A)** Tempo de latência (s) da esquiva inibitória em três exposições ao braço fechado do LTE (Basal, Esq 1 e Esq 2); **B)** Tempo de latência (s) de fuga em três exposições ao braço aberto do LTE (Fuga 1, 2 e 3). Valores expressos em média \pm EPM. Valores expressos em média \pm EPM. *Diferença significativa entre os grupos na mesma tentativa, nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando os testes one-way ANOVA, *t* de Student e Mann-Whitney. Sham (n = 4); OVX (n = 7).

A privação de hormônios ovarianos não afetou a atividade locomotora das ratas OVX, sendo que estas apresentaram locomoção semelhante ao grupo Sham (72 quadrados \pm 16,65 vs 57,67 quadrados \pm 7,54, $p > 0,05$, teste *t* de Student) (Figura 11A). Além disso, as ratas de ambos os grupos exibiram comportamento similar no que se refere à exploração da porção central do CA, não havendo diferença significativa no número de quadrados centrais atravessados pelos grupos em questão (6,75 quadrados \pm 3,33 vs 7,33 quadrados \pm 1,84, $p > 0,05$, teste *t* de Student) (Figura 11B).

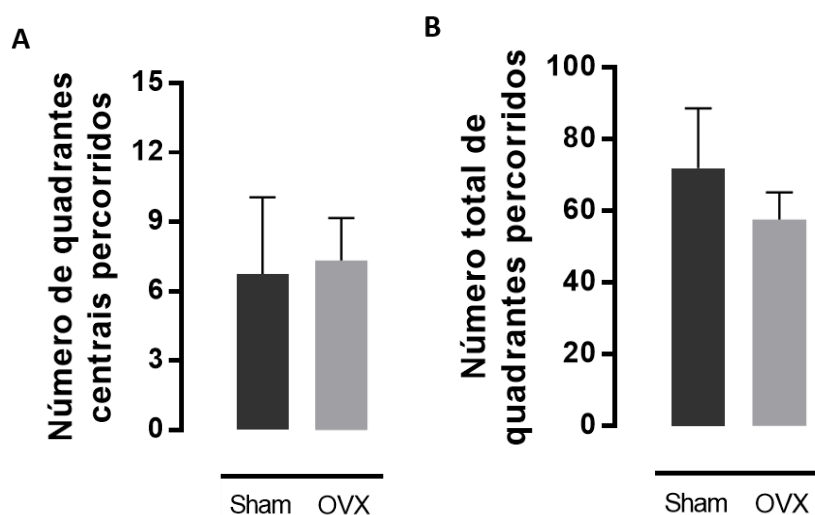


Figura 11. Efeito da ovariectomia sobre a atividade locomotora e o comportamento do tipo ansiedade avaliados no campo aberto na 3ª semana pós-ovariectomia. **A)** Número de quadrados totais percorridos; **B)** Número de quadrados centrais percorridos. Valores expressos em média \pm EPM. *Diferença significativa entre os grupos, nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando teste *t* de Student. Sham (n = 4); OVX (n = 7).

Em relação à exposição ao PCE, não houve diferença no número de entradas no compartimento claro do paradigma entre os grupos Sham e OVX (6 entradas \pm 1,22 vs 3,22 entradas \pm 0,66, $p > 0,05$, teste Mann-Whitney) (Figura 12A). No entanto, as ratas OVX na 3ª semana pós-ovariectomia exploraram por menos tempo a parte clara do aparato, o que é um indicativo de comportamento do tipo ansiedade (91,4s \pm 39,61 vs 24,44s \pm 5,16, $p = 0,0417$, teste t de Student) (Figura 12B).

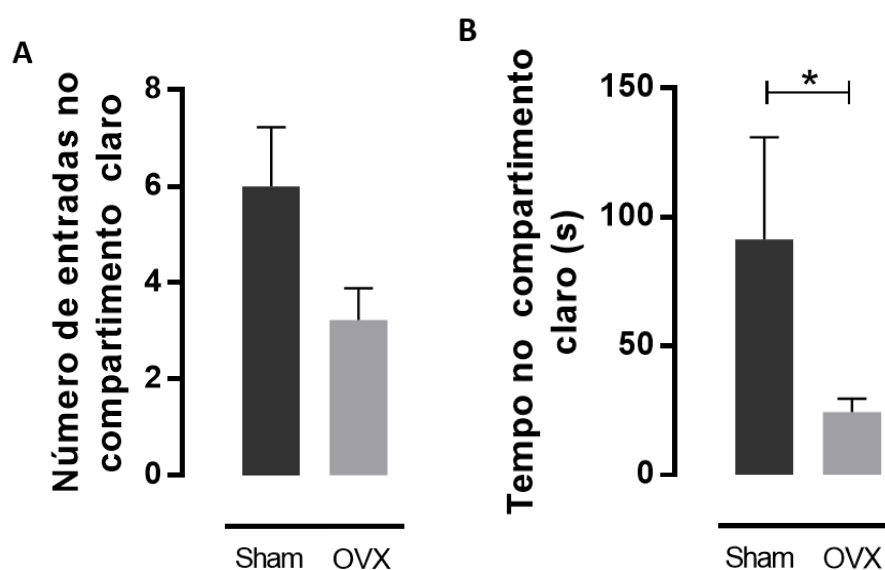


Figura 12. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento do tipo ansiedade avaliado no paradigma claro/escuro na 3ª semana pós-ovariectomia. **A)** Número de entradas no compartimento claro do PCE; **B)** Tempo de exploração do compartimento claro do PCE. Valores expressos em média \pm EPM do número de quadrados atravessados. *Diferença significativa entre os grupos, nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando os testes Mann-Whitney e t de Student. Sham ($n = 4$); OVX ($n = 7$).

A avaliação conjunta destes resultados sugere que a privação de hormônios ovarianos, entre eles o estrogênio, por 3 semanas está relacionada ao aumento de respostas defensivas, como aquelas relacionadas a ansiedade e fuga/pânico.

CAPÍTULO 2

Neste capítulo abordaremos o efeito da privação de hormônios ovarianos e do tratamento crônico com losartana sobre comportamentos do tipo ansiedade, depressão e memória de curto prazo em ratas ovariectomizadas.

Os protocolos experimentais foram realizados no *Center for the Study of Sex Differences in Health, Aging and Disease* na *Georgetown University* - EUA.

5.OBJETIVO

Avaliar o perfil de comportamento associado à ansiedade, depressão e memória de curto prazo em ratas ovariectomizadas, bem como o efeito do bloqueio dos receptores AT₁ por meio do tratamento crônico com losartana sobre estas respostas no modelo de ovariectomia.

5.1 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar o modelo de ovariectomia quanto a variáveis fisiológicas, incluindo peso corporal e ingestão alimentar na primeira e na décima semana pós-ovariectomia, e peso uterino e tecido adiposo parametrial, retroperitoneal e inguinal na décima semana de pós-ovariectomia;
- ✓ Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores AT₁, por meio do tratamento crônico com losartana, sobre o peso corporal e ingestão alimentar na primeira e na décima semana pós-ovariectomia, e peso uterino e tecido adiposo parametrial, retroperitoneal e inguinal na décima semana de pós-ovariectomia;
- ✓ Avaliar a eficiência da dose de losartana administrada através da mensuração da pressão arterial média na décima semana pós-ovariectomia;

- ✓ Avaliar o efeito da ovariectomia e do bloqueio dos receptores AT₁ por meio do tratamento crônico com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo ansiedade e resposta defensiva mensurado por diferentes tipos de testes;
- ✓ Avaliar o efeito da ovariectomia e do bloqueio dos receptores AT₁ por meio do tratamento crônico com losartana em ratas ovariectomizadas sobre a memória declarativa de curto prazo;
- ✓ Avaliar o efeito da ovariectomia e do bloqueio dos receptores AT₁ por meio do tratamento crônico com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo depressivo;
- ✓ Avaliar a expressão gênica de receptores AT₁ na região hipocampal CA1 de ratas ovariectomizadas submetidas ao não ao tratamento crônico com losartana.

6.MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Modelo animal

Para os experimentos do capítulo II foram utilizadas ratas da linhagem Long Evans comprados da Harlan/Envigo (Indianápolis, EUA) com três meses de idade. Os animais foram alojados em pares na *Division of Comparative Medicine (DCM)* da *Georgetown University*, sob temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração, durante todo o período de experimentação. Após o recebimento dos animais, foi respeitado um período de cinco dias para a realização dos procedimentos cirúrgicos. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)*, sob protocolo nº 2017-0068, e de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

6.2 Acompanhamento do peso corporal e ingestão alimentar

O peso dos animais foi mensurado individualmente uma vez por semana, iniciando a pesagem no dia em que foi realizado o procedimento cirúrgico e finalizando no dia da eutanásia, contabilizando dez semanas de acompanhamento. De maneira similar, a ingestão alimentar foi avaliada durante este mesmo período de tempo, no entanto, foi mensurada duas vezes na semana sendo os valores obtidos referentes ao consumo total da dupla de ratas por gaiola. Desse modo, os valores individuais de consumo dos animais foram determinados pela média de consumo da gaiola e estimados individualmente pela ingestão a cada 100g de peso corporal.

6.3 Fármacos e soluções

Isoflurano (anestésico): Isoflurane USP; Piramal Healthcare, Medak, Andhra Pradesh, India. Dose: 3% para indução e 2,5% para manutenção, administrado por via inalatória.

Carprofeno (analgésico): Rimadyl; Zoetis, Parsippany, NJ. Dose: 5 mg/kg de peso corporal; administrado por via subcutânea (s.c).

Losartana: Sigma, St. Louis, MO, EUA. Dose: 10 mg/kg/dia, concentração: 0,1 g/L dissolvidos na água de beber.

6.4 Procedimento cirúrgico - Ovariectomia

As ratas foram divididas aleatoriamente em grupo OVX e Sham e anestesiadas com isoflurano (3% para indução e 2,5% para manutenção, por via inalatória). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados como descrito no item 3.3 do Capítulo I.

Ao final da cirurgia os animais receberam injeção de carprofeno (na dose de 5 mg/kg de peso corporal; por via s.c) e foram monitorados pelas próximas 72h, para verificação de sinais relacionados à dor, inflamação e infecção. A temperatura corporal foi mantida por meio de uma placa aquecedora durante a cirurgia e por uma manta térmica até a cessação dos efeitos da anestesia.

Nenhum procedimento experimental foi realizado nas quatro semanas seguintes, a fim de assegurar a recuperação das ratas, e garantir não só a depleção dos hormônios ovarianos, como os efeitos do tratamento com losartana.

6.5 Testes comportamentais

6.5.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) está entre os testes mais empregados na investigação de modelos de ansiedade. O teste é baseado no mesmo princípio do LTE – explora o medo inato que os roedores apresentam de espaços abertos e altos. No entanto, o teste no LCE avalia mais especificamente o conflito gerado entre a tendência natural de roedores em explorar ambientes novos e a aversão que eles exprimem de lugares altos e abertos (Pellow *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 2013).

O aparato utilizado é constituído por quatro braços, sendo dois abertos e dois outros envoltos por paredes laterais (50 cm x 10 cm x 40 cm; Bioseb In Vivo Research Instruments) formando uma cruz, e elevado 50 cm do chão (Figura 13A). O teste foi conduzido como descrito por Pellow e cols., 1985, no qual os animais foram expostos ao LCE por 5 minutos para livre exploração. Nesse contexto, o comportamento do tipo ansiedade foi detectado a partir da exploração reduzida nos braços abertos, mensurada através da porcentagem de número de entradas e tempo gasto explorando estes braços; e

a distância total percorrida durante o teste foi utilizada como indicativo de atividade locomotora.

6.5.2 Campo aberto

Embora as dimensões da arena utilizada nesta etapa (90 cm x 90 cm x 40 cm) (Figura 13B) seja um pouco diferente daquela empregada no capítulo I (60 cm x 60 cm x 40 cm), o teste do CA foi executado no presente capítulo com a mesma finalidade empregada no capítulo anterior, isto é, com o propósito de avaliar a atividade locomotora e respostas associadas à ansiedade quanto à exploração da porção central da arena.

Assim, os animais foram mantidos durante 5 minutos na arena, sob iluminação de 115 lux. A distância total percorrida por cada rata, assim como o número de entradas e o tempo gasto na porção central do aparato foram mensurados com o auxílio do software EthoVision XT (Noldus Information Technology).

6.5.3 Reconhecimento de novo objeto

O teste de reconhecimento de novo objeto (RNO) baseia-se no comportamento inato exibido por roedores em explorar ambientes e contextos novos, nesse sentido, a exploração preferencial de um objeto novo em relação a outro previamente conhecido indica que o animal lembrou do evento, fornecendo uma medida de memória de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988). Por ser um paradigma de memória que avalia um comportamento espontâneo do animal, o RNO é considerado um teste não invasivo, que não requer exposição a estímulos aversivos, como restrição hídrica ou alimentar, nem sessões de treinamento prévio por longos períodos, permitindo a obtenção de informação rápida e apresentando-se como um bom paradigma para avaliação de memória declarativa de curto prazo (Ennaceur e Delacour, 1988; Dere *et al.*, 2007).

O protocolo de RNO utilizado neste trabalho consistiu em três fases: habituação, treino e teste. Todas as etapas foram realizadas na mesma arena em que o teste de CA foi conduzido. A fase de habituação consiste na exposição dos animais à arena vazia para livre exploração e teve duração de 10 minutos por 3 dias consecutivos. As fases de treino e teste ocorreram no dia seguinte à última habituação. No treino, foram colocados dois objetos idênticos dentro da arena e os animais puderam explorar o contexto por 10

minutos. Após 60 minutos de intervalo, os animais foram expostos novamente ao contexto por 5 minutos, porém um dos objetos foi substituído por um novo (desconhecido), constituindo a fase teste (Figura 13C). O tempo de exploração de cada objeto durante as fases treino e teste foram aferidos e o resultado do teste de RNO foi obtido através da seguinte fórmula: Tempo de exploração do objeto novo/ Tempo total de exploração dos dois objetos. Valores acima de 0,5 indicam a preferência pelo novo objeto. Consideramos como comportamento exploratório quando o animal tocava o objeto com as patas, vibrissas ou focinho.

6.5.4 Ameaça iminente

Roedores apresentam uma característica inata em detectar possíveis condições ameaçadoras a partir de estímulos visuais (Wei *et al.*, 2015). Baseado nisso, o teste de ameaça iminente (AI) avalia a reação defensiva gerada em resposta à um estímulo considerado potencialmente perigoso. No caso dos roedores esse estímulo pode ser induzido por uma sombra crescente acima do animal, simulando um objeto ou predador se aproximando, provocando resposta de congelamento (*freezing*) ou tentativas de fuga (pulos, *flight*) (Yilmaz e Meister, 2013; Aguilar *et al.*, 2018).

O aparato utilizado é formado por uma câmara cilíndrica transparente (43.5 cm × 18.5 cm) acoplada a uma tela de computador posicionada acima da mesma. O teste começa com a tela completamente cinza (23 lux), e após 120 segundos desta condição basal o estímulo de ameaça iminente é iniciado, que consiste em um ponto preto gerado na tela cinza que expande e retrai por 15 vezes durante 22 segundos, seguido pela fase pós-estímulo em que a tela volta a ser totalmente cinza pelos 60 segundos finais do teste (Figura 13D), como previamente descrito por Aguilar e cols., 2018 (Aguilar *et al.*, 2018). O tempo em congelamento e o número de pulos em cada fase do teste foram contados manualmente. Consideramos que os animais apresentavam resposta de congelamento quando manifestavam comportamentos como ausência total de movimento do corpo, atitude atenta, cabeça erguida, costas arqueadas, retração das orelhas, olhos abertos e piloereção.

6.5.5 Preferência por sacarose

A perda da capacidade de sentir prazer, denominada anedonia, é uma característica do comportamento depressivo que pode ser facilmente avaliada em roedores através do teste de preferência por sacarose (PS) (Gogos *et al.*, 2018). O protocolo utilizado neste trabalho foi realizado de acordo com Aguilar e cols., 2018, que consiste na livre oferta de duas soluções (água natural e sacarose 1%), por 2 horas durante 5 dias. Para isso, os animais foram remanejados para gaiolas individuais contendo duas garrafas posicionadas de forma aleatória, uma com água e a outra com a solução de sacarose (200 mL cada), e findada as 2 horas de teste os animais retornaram às gaiolas originais. No último dia de teste os animais foram submetidos a 2 horas de restrição hídrica previamente à execução do teste de PS (Figura 13E). A preferência por sacarose foi mensurada de acordo com a seguinte equação: consumo total de sacarose (ml) / consumo total de sacarose (ml) + consumo total de água (ml). O consumo reduzido de sacarose é um indicativo de anedonia em roedores.

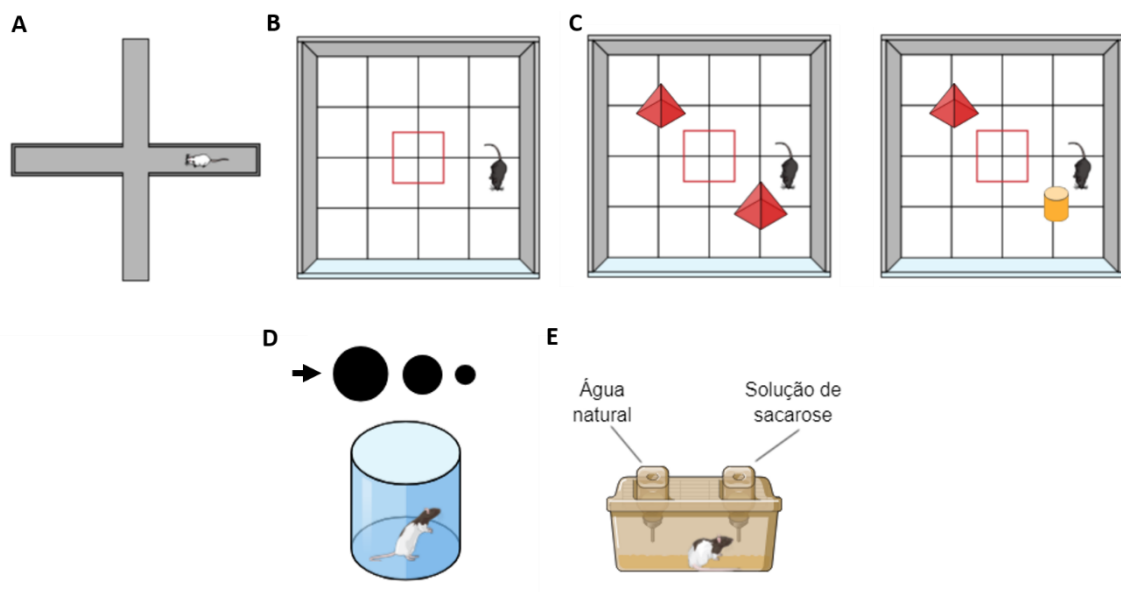


Figura 13. Representação ilustrativa dos aparatos utilizados para a avaliação comportamental e cognitiva. **A)** Labirinto em cruz elevado utilizado para avaliação do comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora; **B)** Campo aberto utilizado para avaliação de respostas de ansiedade e atividade locomotora; **C)** Reconhecimento de novo objeto utilizado na avaliação de memória declarativa de curto prazo; **D)** Ameaça iminente utilizado para avaliações defensivas de congelamento e fuga; **E)** Preferência por sacarose utilizado na avaliação do comportamento do tipo anedonia.

6.6 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral das ratas foi verificado logo após a finalização de cada sessão experimental, sendo a fase do ciclo determinada conforme descrito por Marcondes e colaboradores (Marcondes *et al.*, 2002). O procedimento foi realizado como descrito no item 3.4. Apenas as ratas que se encontravam no estro foram incluídas nas análises dos testes relacionados à ansiedade (LCE, CA e AI).

6.7 Avaliação da pressão arterial média

A pressão arterial foi mensurada com o intuito de confirmar a eficiência da dose de losartana utilizada nos grupos tratados. Dessa forma, a pressão arterial foi medida de forma aguda imediatamente antes do início dos procedimentos terminais.

Assim, os animais foram anestesiados com isoflurano (3% para indução e 2,5% para manutenção, por via inalatória) e posicionados em uma placa aquecedora para manutenção da temperatura corporal ideal. Foi realizada uma pequena incisão na região inguinal, os vasos femorais foram identificados e separados do nervo femoral. Um cateter de polietileno foi inserido na artéria femoral até alcançar a aorta abdominal. Os valores da pressão arterial foram coletados a cada minuto durante 40 minutos consecutivos com o auxílio de um analisador de pressão arterial (Digi-Med, Louisville, KY). A partir dos valores obtidos, calculou-se a pressão arterial média (PAM) de cada animal. Em seguida, as ratas foram eutanasiadas para coleta de tecidos.

6.8 Coleta de tecidos e cérebro

Após o procedimento de eutanásia, o encéfalo foi removido e mantido em gelo seco por alguns minutos para o processo de congelamento rápido, sendo, logo em seguida, armazenado em freezer a -80°C para análises posteriores.

Já o útero e os tecidos adiposos parametrial, retroperitoneal e inguinal foram coletados para pesagem. Os valores aferidos foram calculados para comparação do peso do tecido relativo à 100g de peso corporal do animal.

6.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Os cérebros previamente armazenados a -80°C foram seccionados em um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) em cortes coronais com espessura de $300\ \mu\text{m}$. Os cortes foram posicionados em lâminas de histologia mantidas constantemente em contato com gelo seco para manutenção da temperatura. Com um auxílio de um *punch*, um instrumento cirúrgico de corte com a borda de $1,5\ \text{mm}$ de diâmetro, coletamos a região CA1 do hipocampo, que foram armazenadas em temperatura de -80°C até a realização dos ensaios. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em tubos de $2\ \text{mL}$ contendo microesferas de cerâmica (MP biomedical). A extração dos RNAs totais da região CA1 foi realizada utilizando o kit de isolamento de RNA RNAqueous™-Micro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A primeira cadeia de cDNA foi preparada a partir de $500\ \text{ng}$ de RNA total utilizando o kit iScript cDNA (BioRad, Hercules, CA). O RNA total foi acrescido a um mix contendo transcriptase reversa RNase H +, vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV), oligo (dT) e hexâmetros randômicos. A quantificação de RNAs específicos foi realizada através da reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção de sequência Step One Plus ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Os reagentes utilizados na reação PCR consistiram em água RNase-free, TaqMan Fast Advance Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e $300\ \text{nM}$ do primer e $10\ \mu\text{M}$ probe, a seguir: Primer - Forward rAT1R-CR-330F: $5^{\prime}\text{-CAACCTCTACGCCAGTGTGTTTC-3}^{\prime}$; Reverse rAT1R-CR-470R: $5^{\prime}\text{-CCAGCCATCAGCCAGATGA-3}^{\prime}$; **Probe:** rAT_{1a} CR-382T; Fam-CTGGCCATCGTCCACCCAATGAAGT-Tamra e amostras de cDNA. Reações de PCR sem transcriptase reversa e sem modelo foram incluídas para controlar a contaminação por DNA genômico. Utilizou-se a curva padrão com o DNA do plasmídeo rAT1raR para determinar o número de cópias de DNA nas amostras do CA1 hipocampal. Os dados foram expressos em números de cópias de DNA $\times 10^6$ e normalizados para μg de RNA total em cada amostra.

6.10 Delineamento experimental

6.10.1 Protocolo de tratamento

Logo após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, deu-se início ao protocolo de tratamento, que se estendeu até o dia da eutanásia, totalizando dez semanas de tratamento. Assim, as ratas OVX e Sham foram divididas de forma aleatória entre grupo Veículo, que recebeu água de beber natural, e grupo Losartana, que recebeu uma solução contendo água natural e losartana na concentração de 0,1 g/L, conforme descrito previamente (Ji *et al.*, 2007). A solução foi recalculada e preparada a cada 3-4 dias, baseada na seguinte fórmula: peso corporal (g)/ (ingestão hídrica diária média x 100) (Silva *et al.*, 2016), com o propósito de garantir a ingestão da dose de 10 mg/kg/dia de losartana para todos os animais.

6.10.2 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi iniciado 5 semanas após a realização dos procedimentos cirúrgicos. As ratas foram habituadas ao experimentador por 5 minutos durante 5 dias consecutivos na semana anterior ao início do primeiro teste comportamental. Nos dias da execução dos testes, os animais foram transportados para a sala experimental com 60 minutos de antecedência. O protocolo experimental teve duração de 5 semanas e foi composto por 5 testes comportamentais, conduzidos na seguinte ordem: labirinto em cruz elevado, campo aberto, reconhecimento de novo objeto, ameaça iminente e preferência por sacarose. Foi estabelecido um intervalo de no mínimo 2 dias entre os testes, a fim de reduzir interferências causadas por estresse de um teste para outro. Na décima semana de pós-cirúrgico foi executado o protocolo para aferição da pressão arterial e logo em seguida as ratas foram eutanasiadas para remoção do útero, tecidos adiposos e encéfalo. Este último foi armazenado e posteriormente foram realizados os ensaios moleculares (Figura 14).

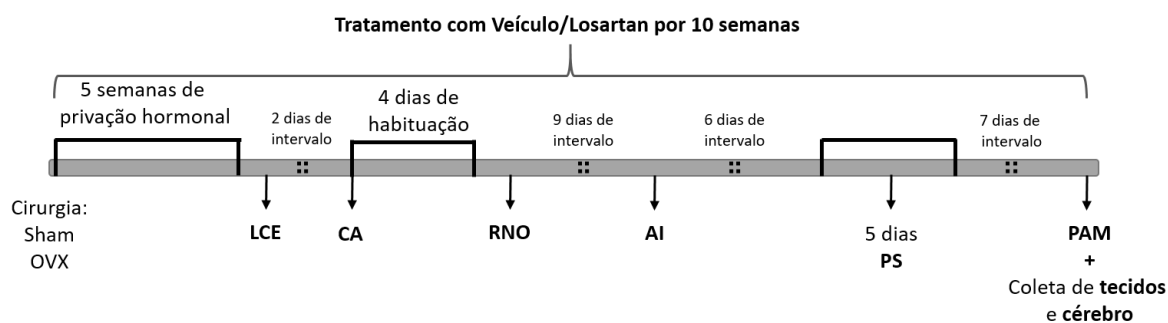


Figura 14. Esquema temporal do protocolo experimental realizado destacando os procedimentos utilizados neste capítulo. Os animais foram submetidos a cirurgia OVX ou cirurgia simulada (Sham) e tratados com veículo (água natural) ou losartana por 10 semanas. Após 5 semanas, o protocolo comportamental foi iniciado, com duração de 5 semanas. Na décima semana, a pressão arterial média foi aferida e em seguida os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos e cérebro. Os cérebros foram armazenados para análises moleculares posteriores.

Os testes no labirinto em cruz elevado, campo aberto e reconhecimento de novo objeto foram realizados sob 115 lux de iluminação e analisados com o auxílio do software EthoVision XT (Noldus Information Technology). O teste de ameaça iminente foi executado sob 23 lux (como foi detalhado no tópico 6.6 *Ameaça iminente*), já o teste preferência por sacarose foi conduzido mesma sala em que eram alojados no *Division of Comparative Medicine* da *Georgetown University*, durante o ciclo claro. Os aparatos foram higienizados com álcool 70% após a exposição de cada animal durante as sessões de teste.

6.11 Análise estatística

Os dados obtidos neste capítulo foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Considerou-se a cirurgia (Sham ou OVX) como fator independente e o tratamento (veículo ou losartana) como fator dependente. O nível de significância adotado foi menor que 0,05 e todos os valores para testes foram expressos com média \pm EPM.

7.RESULTADOS

7.1 Caracterização do modelo de ovariectomia tratado com veículo ou losartana durante 10 semanas

A fim de caracterizar o modelo de estudo e verificar o efeito de 10 semanas de privação de hormônios ovarianos sobre algumas variáveis fisiológicas, bem como se o tratamento com losartana durante o mesmo período de tempo previne tais alterações neste modelo, avaliamos a composição corporal, peso uterino, ingestão alimentar, e pressão arterial dos grupos Sham e OVX tratados com veículo (água natural) ou losartana (10 mg/kg/dia) (Tabela 1).

Todos os animais utilizados neste capítulo foram recebidos com 12 semanas de idade e peso similar. No entanto, após 10 semanas pós-ovariectomia estes animais ganharam cerca de 70g de peso corporal, enquanto o grupo Sham ganhou aproximadamente 30g, independente de terem recebido tratamento com losartana ou não. O mesmo padrão foi notado em relação aos tecidos adiposos retroperitoneal e inguinal, em que as ratas OVX tratadas com veículo ou losartana exibiram maior acúmulo destes tecidos em relação as ratas Sham de ambos os grupos de tratamento. Interessantemente, as ratas Sham e OVX tratadas com losartana apresentaram consumo alimentar aumentado na primeira semana pós-cirurgia em relação aos grupos veículo correspondentes, entretanto ao final das 10 semanas o grupo OVX-Losartana estava ingerindo uma quantidade significativamente menor de ração quando comparado ao Sham-Losartana.

Os grupos Sham- e OVX-Veículo apresentaram pressão arterial média semelhantes ao final das 10 semanas pós-cirurgia, ao passo que o tratamento com 10 mg/kg/dia de losartana durante o mesmo tempo foi capaz de reduzir este parâmetro tanto em Sham como em OVX, indicando a eficácia da dose administrada. Além disso, a redução do peso uterino nas ratas ovariectomizadas confirma a depleção de hormônios ovarianos nestas fêmeas, uma vez que o peso uterino é um método empregado como indicador da concentração de hormônios ovarianos.

Variáveis fisiológicas analisadas	Veículo		Losartana	
	Sham	OVX	Sham	OVX
<i>Peso corporal (inicial)</i>	258,8g ± 19,07	265,1g ± 17,95	252,0g ± 9,04	264,0g ± 6,66
<i>Peso corporal (final)</i>	289,6g ± 24,8	338,3g ± 28,45 ^a	280,0g ± 11,28	327,7g ± 14,99 ^b
<i>Ingestão alimentar (inicial)</i>	40,0g ± 3,68	41,0g ± 2,5	44,5g ± 3,12 ^c	45,4g ± 4,57 ^d
<i>Ingestão alimentar (final)</i>	39,1g ± 2,73	34,4g ± 2,09	43,8g ± 5,53	33,66g ± 1,94 ^b
<i>Peso uterino</i>	0,15g ± 0,04	0,03g ± 0,006 ^a	0,14g ± 0,3	0,03g ± 0,004 ^b
<i>Tecido adiposo parametrial</i>	1,33g ± 0,23	1,25g ± 0,32	1,41g ± 0,35	1,4g ± 0,31
<i>Tecido adiposo retroperitoneal</i>	0,8g ± 0,25	1,08g ± 0,31 ^a	0,83g ± 0,21	1,17g ± 0,28 ^b
<i>Tecido adiposo inguinal</i>	1,12g ± 0,24	1,58g ± 0,48 ^a	1,37g ± 0,2	1,9g ± 0,49 ^a
<i>Pressão arterial Média</i>	102,7g ± 10,18	98,13g ± 4,89	90,18g ± 5,74 ^c	88,27g ± 3,76 ^d

Tabela 1. Caracterização do modelo de ovariectomia tratado com veículo (água) ou losartana (10 mg/kg/dia) por 10 semanas quanto à composição corporal, consumo alimentar e hídrico, peso uterino e pressão arterial média. Os valores de ingestão alimentar, peso uterino, e tecidos adiposos estão apresentados em médias relativas à 100 g de peso corporal dos animais. Valores expressos em média ± EPM. Os dados foram analisados usando two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0.05$. a: Sham-Veículo vs OVX-Veículo; b: Sham- Losartana vs OVX-Losartana; c: Sham-Veículo vs Sham-Losartana; d: OVX-Veículo vs OVX-Los.

7.2 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo ansiedade e atividade locomotora

Com o intuito de avaliar o comportamento do tipo ansiedade, a atividade locomotora e a resposta defensiva, as ratas em estudo foram submetidas aos testes no LCE e CA, nas semanas 5 e 6 de pós-cirúrgico, respectivamente.

O protocolo experimental foi iniciado pelo teste no LCE, realizado na 5ª semana pós-ovariectomia. Neste teste o grupo OVX-Veículo exibiu uma menor exploração dos braços abertos em comparação ao grupo Sham-Veículo, enquanto o tratamento com losartana durante as 5 semanas foi capaz de prevenir tal redução nos dois parâmetros avaliados: porcentagem de tempo ($F_{(1, 52)} = 7,78$; $p = 0,007$, *two-way* ANOVA) (Figura 14A) e porcentagem de entradas ($F_{(1, 52)} = 5$; $p = 0,02$, *two-way* ANOVA) (Figura 15B) no braço aberto do aparato. O teste estatístico ANOVA de duas vias mostrou haver interação entre os fatores cirurgia e tratamento na porcentagem de entradas ($F_{(1, 52)} = 5,8$; $p = 0,02$), mas não em relação ao tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos ($F_{(1, 52)} = 3,18$; $p > 0,05$), como também não houve interferência da cirurgia sobre ambos os parâmetros avaliados (entradas: $F_{(1, 52)} = 2,88$, $p > 0,05$; tempo: $F_{(1, 52)} = 1,59$; $p > 0,05$). O pós-teste de Tukey revelou diferença significativa entre os grupos Sham-Veículo e OVX-Veículo, e entre OVX-Veículo e OVX-Losartana nas porcentagens de tempo ($p = 0,049$; $p = 0,011$) e entradas ($p = 0,035$; $p = 0,012$), ao passo que não foram observadas diferenças na exploração de ambos os parâmetros entre Sham-Veículo e OVX-Losartana (tempo: $p > 0,05$; entradas: $p > 0,05$), o que indica que o tratamento com losartana preveniu o comportamento do tipo ansiedade exibido por ratas após 5 semanas de ovariectomia. A Figura 15C mostra que a distância percorrida pelos grupos foi estatisticamente semelhante, portanto os procedimentos prévios (cirurgia e/ou tratamento) animais não induziram alterações locomotoras que pudessem interferir na resposta exibida no LCE.

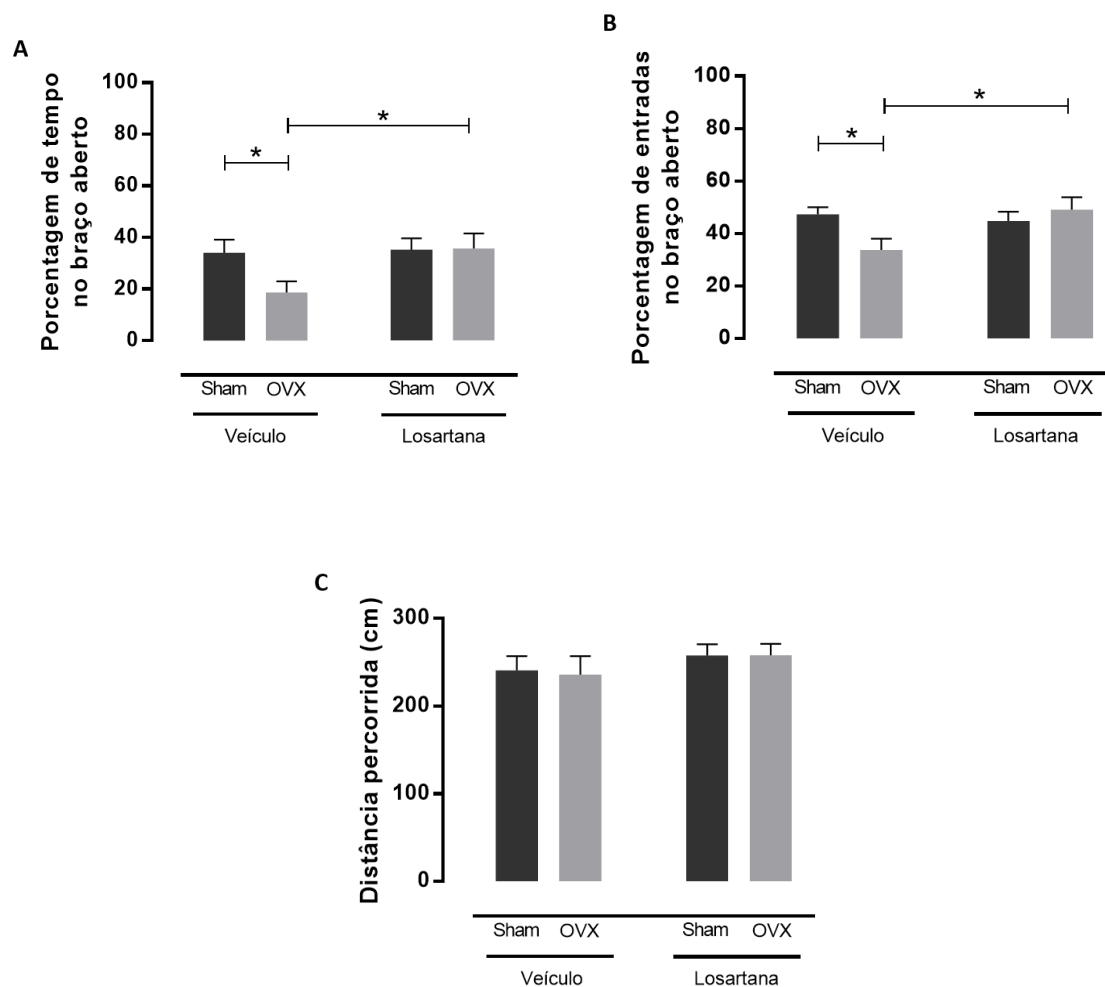


Figura 15. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo ansiedade avaliado no labirinto em cruz elevado na 5ª semana pós-ovariectomia. **A)** Porcentagem de tempo explorando os braços abertos em relação ao tempo de exploração total em todos os braços do LCE (braços abertos + fechados); **B)** Porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas em todos os braços do LCE (braços abertos + fechados); **C)** Distância total percorrida (cm) durante o teste. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; *nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo (n = 17); OVX-Veículo (n = 17); Sham-Losartana (n = 12); OVX-Losartana (n = 12).

Na 6ª semana pós-ovariectomia as ratas foram avaliadas no teste do CA, no qual não foram detectados efeitos no tratamento, cirurgia, bem como na interação entre esses dois fatores em nenhum dos parâmetros avaliados, isto é, tempo explorando a parte central da arena (Tratamento: $F_{(1, 40)} = 3,47$; $p > 0,05$. Cirurgia: $F_{(1, 40)} = 0,44$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 40)} = 1,71$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 16A), número de entradas na porção central (Tratamento: $F_{(1, 54)} = 0,06$; $p > 0,05$. Cirurgia: $F_{(1, 54)} = 0,26$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 54)} = 0,45$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 16B) e distância percorrida total

durante os 5 minutos de teste (Tratamento $F_{(1, 40)} = 0,56$; $p > 0,05$. Cirurgia: $F_{(1, 40)} = 0,19$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 40)} = 0,63$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 16C). Estes resultados indicam que a atividade locomotora mensurada através da distância percorrida e a resposta relacionada à ansiedade avaliada pela exploração central do CA não foram afetadas pela ovariectomia e tratamento com losartana.

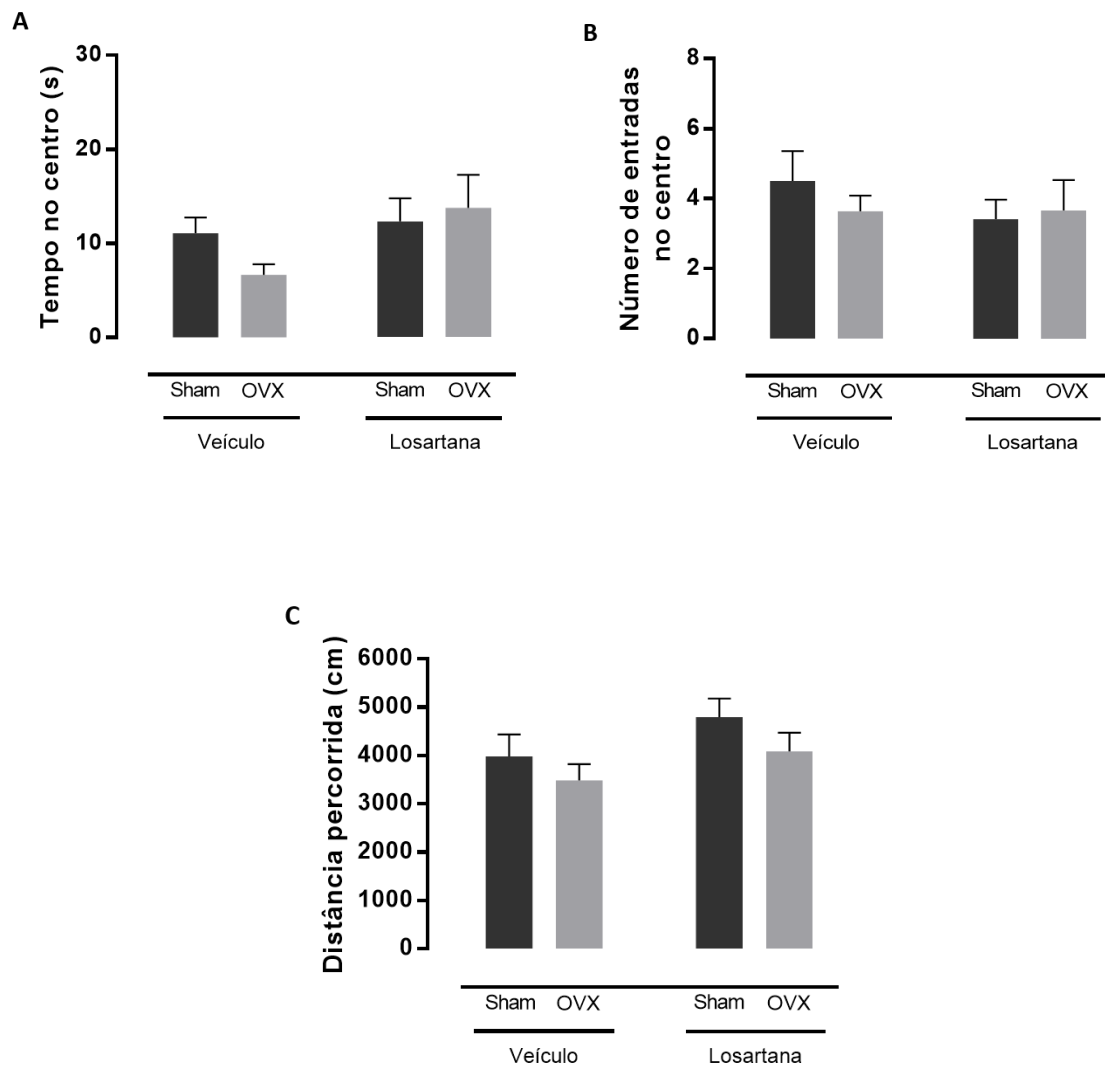


Figura 16. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo ansiedade e atividade locomotora avaliados no campo aberto na 6ª semana pós-ovariectomia. **A)** Tempo gasto explorando a porção central da arena do CA; **B)** Frequência de entradas na parte central da arena do CA; **C)** Distância total percorrida (cm) durante o teste. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo (n = 17); OVX-Veículo (n = 17); Sham-Losartana (n = 12); OVX-Losartana (n = 12).

7.3 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre a memória de reconhecimento de objetos de curto prazo

A memória de curto prazo foi avaliada por meio do teste de reconhecimento de novo objeto conduzido após 6 semanas de pós-cirúrgico/tratamento. Para verificar se as

intervenções previamente realizadas ao teste (cirurgia e/ou tratamento) alteraram a capacidade exploratória das fêmeas, comparamos o tempo total de exploração durante as fases de treino e teste no RNO (Figura 17A). O teste estatístico *two-way* ANOVA mostrou não haver diferença nos tempos de exploração de cada objeto entre os grupos avaliados durante o treino em relação aos fatores cirurgia ($F_{(1, 54)} = 0,14$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{(1, 54)} = 1,99$; $p > 0,05$) e na interação entre eles ($F_{(1, 54)} = 0,06$; $p > 0,05$), ao passo que a sessão teste sofreu efeito do tratamento ($F_{(1, 55)} = 4,51$; $p = 0,038$), mas não da cirurgia ($F_{(1, 55)} = 2,27$; $p > 0,05$) e da interação entre estes fatores ($F_{(1, 55)} = 1,36$; $p > 0,05$). No entanto, o pós-teste de Tukey não detectou diferenças significantes entre os grupos.

A memória das ratas ovariectomizadas tratadas ou não com losartana foi avaliada pelo Índice de Reconhecimento (IR) obtido através do desempenho de cada grupo na sessão teste do RNO. Os IRs foram analisados por *two-way* ANOVA, que revelou efeitos da cirurgia ($F_{(1, 55)} = 4,13$; $p = 0,047$) e do tratamento ($F_{(1, 55)} = 4,99$; $p = 0,03$), mas não da interação de ambos ($F_{(1, 55)} = 3,53$; $p > 0,05$). Apenas as ratas OVX-Veículo exibiram IR menor que 0,5, que é um indicativo de comprometimento da memória (Figura 17B). Associadamente, o pós-teste de Tukey mostrou que o IR destas ratas é diferente daquele apresentado pelas Sham-Veículo ($p = 0,017$) e a também das OVX tratadas com losartana ($p = 0,025$). Em contraste, as OVX-Losartana apresentarem IR semelhante ao das Sham-Veículo ($p > 0,05$), sugerindo que o tratamento impediu o déficit de memória as OVX.

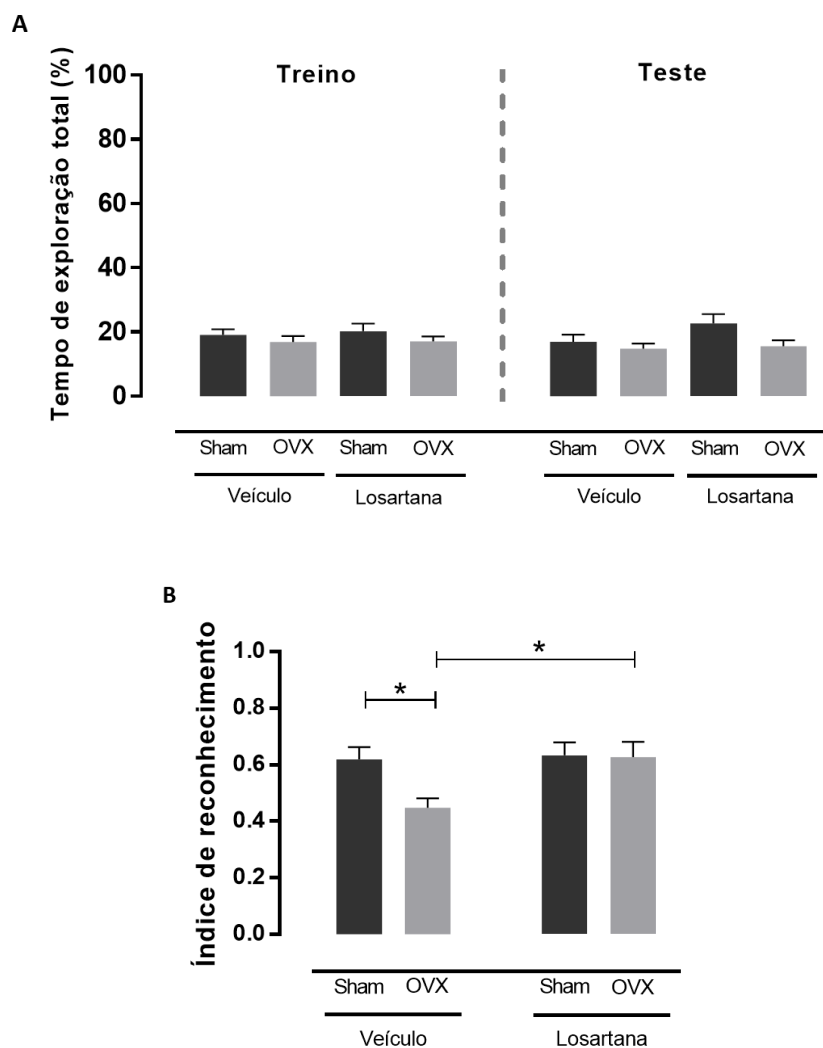


Figura 17. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre a memória declarativa de curto prazo avaliada no teste de reconhecimento de novo objeto realizado na 6^a semana pós-ovariectomia. **A)** Porcentagem de tempo de exploração de cada objeto durante as fases treino e teste; **B)** Índice de Reconhecimento do novo objeto expresso pelo tempo de exploração do novo objeto dividido pela soma do tempo explorando o objeto conhecido e o novo. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; *nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo (n = 17); OVX-Veículo (n = 18); Sham-Losartana (n = 12); OVX-Losartana (n = 12).

7.4 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de resposta defensiva

Com o propósito de investigar a resposta defensiva, como congelamento e tentativas de fuga, expomos as ratas ao teste de ameaça iminente na 8ª semana pós-cirurgia. Nossos resultados apontam que somente o tratamento teve efeito sobre a resposta de congelamento na fase pós-estímulo (Tratamento: $F_{(1, 37)} = 5,24$; $p = 0,023$. Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 0,26$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 0,34$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA), entretanto o pós-teste de Tukey não identificou nenhuma diferença entre os grupos (Figura 18A). Além disso, não houve interferência de nenhum dos fatores – cirurgia, tratamento, e a interação entre ambos – sobre a resposta de congelamento nas fases basal (Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 2,33$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{(1, 37)} = 0,3$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 0,13$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) e estímulo (Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 0,003$; $p > 0,05$. Tratamento: $F_{(1, 37)} = 1,32$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 0,08$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA), bem como sobre as tentativas de fuga (manifestadas por pulos) em relação aos mesmos fatores avaliados (Basal – Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 0,004$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{(1, 37)} = 0,02$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 0,33$; $p > 0,05$. Estímulo – Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 1,65$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{(1, 37)} = 1,65$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 1,65$; $p > 0,05$. Pós-estímulo – Cirurgia: $F_{(1, 37)} = 0,07$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{(1, 37)} = 1,05$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 37)} = 0,66$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 18B).

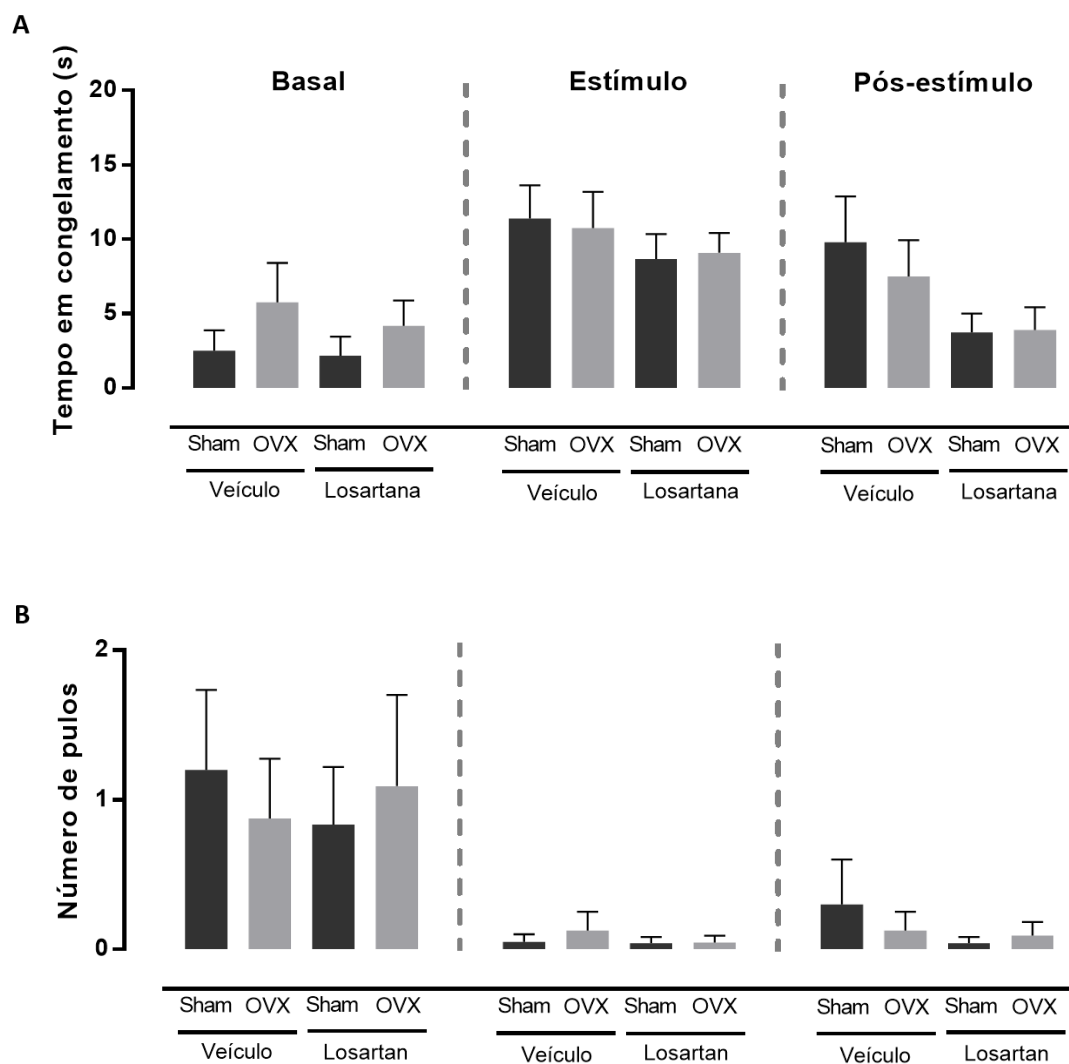


Figura 18. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre a reposta defensiva avaliada no teste de ameaça iminente realizado na 8ª semana pós-ovariectomia. **A)** Tempo em congelamento (*freezing*) durante as fases basal (duração de 120s), estímulo (duração de 22s) e pós-estímulo (duração de 60s); **B)** Número de pulos (tentativas de fuga, *flight*) durante as fases basal, estímulo e pós-estímulo. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo ($n = 10$); OVX-Veículo ($n = 8$); Sham-Losartana ($n = 12$); OVX-Losartana ($n = 11$).

7.5 Efeito da privação de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia e do tratamento com losartana em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento do tipo depressão

Por fim, as ratas foram submetidas ao teste de preferência por sacarose na 9ª semana de pós-cirúrgico. A razão de preferência por sacarose obtida no teste sugere que

o comportamento do tipo anedonia não foi afetado pela ovariectomia ($F_{(1, 39)} = 1,43$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA), nem pelo tratamento com losartana ($F_{(1, 39)} = 0,0003$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA), como também não foi pela interação entre ambos os fatores ($F_{(1, 39)} = 0,003$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 19A). Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas no volume de sacarose consumido (Cirurgia: $F_{(1, 38)} = 0,007$; $p > 0,05$. Tratamento: $F_{(1, 38)} = 0,007$; $p > 0,05$. Interação: $F_{(1, 38)} = 0,68$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 19B), porém o tratamento interferiu no volume de água ingerido (Tratamento: $F_{(1, 39)} = 7,406$; $p = 0,01$; *two-way* ANOVA), o que não foi detectado pelo pós-teste de Tukey, como também não foi afetado pela ovariectomia (Cirurgia: $F_{(1, 39)} = 0,012$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) ou pela interação desses fatores (Interação: $F_{(1, 39)} = 0,12$; $p > 0,05$; *two-way* ANOVA) (Figura 19C). Estes resultados indicam que nenhum dos grupos experimentais exibem comportamento do tipo depressivo.

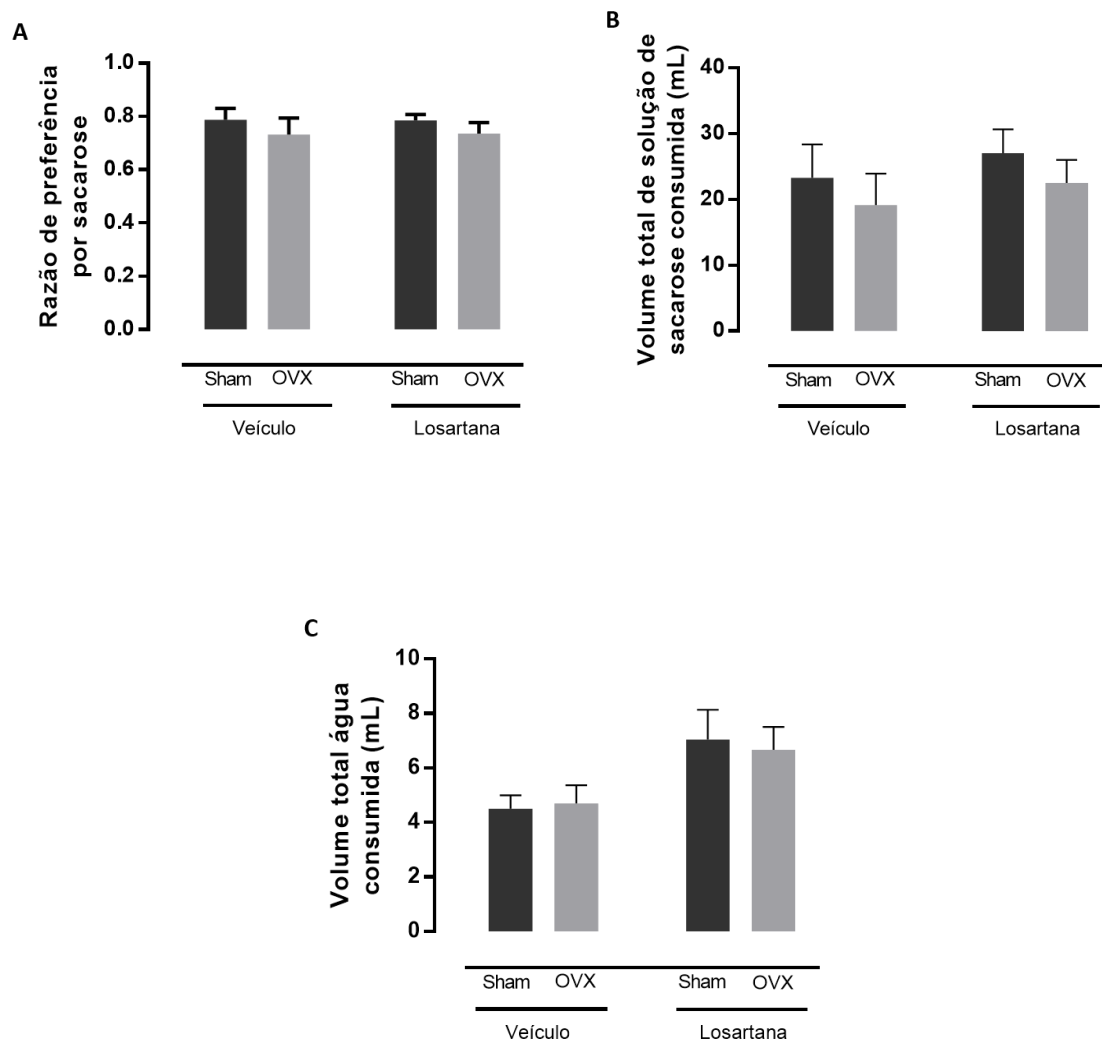


Figura 19. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) em ratas ovariectomizadas sobre o comportamento de tipo depressão avaliado pelo teste de preferência por sacarose realizado na 9^a semana pós-ovariectomia. **A)** Razão da preferência por sacarose considerando o total de consumo dos 5 dias de teste; **B)** Volume total de solução de sacarose consumida durante os 5 dias de teste; **C)** Volume total de água natural consumida durante os 5 dias de teste. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo ($n = 10$); OVX-Veículo ($n = 10$); Sham-Losartana ($n = 11$); OVX-Losartana ($n = 12$).

7.5 Expressão gênica de receptores AT₁ na região hipocampal CA1 de ratas ovariectomizadas submetidas ou não ao tratamento crônico com losartana

O tratamento com losartana aumentou a expressão de RNAm dos receptores AT₁ na área CA1 do hipocampo ($F_{(1, 23)} = 4,74$; $p = 0,04$, *two-way* ANOVA) independente da cirurgia. No entanto, ovariectomia não teve efeito sobre a expressão gênica destes receptores na região avaliada ($F_{(1, 23)} = 1,72$; $p > 0,05$, *two-way* ANOVA), assim como

também não houve efeito da interação entre os fatores cirurgia e tratamento ($F_{(1, 23)} = 0,1$; $p > 0,05$, *two-way* ANOVA) (Figura 20).

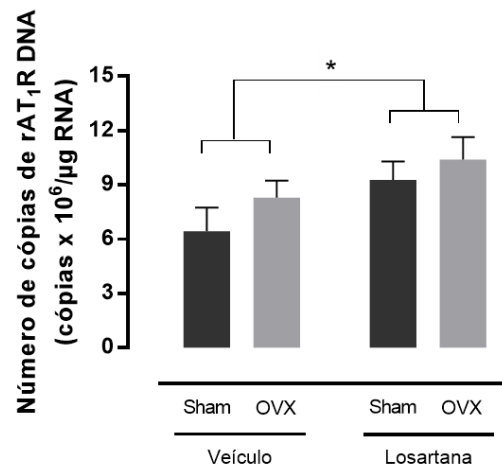


Figura 20. Efeito da ovariectomia e do tratamento com losartana (10 mg/kg/dia) na expressão dos RNAm dos receptores AT1 na região hipocampal CA1 de ratas Sham e OVX avaliadas na 10^a semana pós-cirurgia. Valores expressos em média \pm EPM. Os dados foram analisados usando *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey; *nível de significância $p < 0.05$. Sham-Veículo ($n = 6$); OVX-Veículo ($n = 7$); Sham-Losartana ($n = 7$); OVX-Losartana ($n = 7$).

8.DISSCUSSÃO

Neste trabalho nós investigamos o efeito da privação de hormônios ovarianos sobre a memória e comportamentos associados à ansiedade, depressão e respostas defensivas em ratas ovariectomizadas, bem como o envolvimento do SRA nesse processo, mais especificamente, o bloqueio dos receptores AT₁ por meio do tratamento crônico com losartana na neurobiologia destas disfunções. Assim, notamos primeiramente que as flutuações hormonais durante o ciclo estral de ratas jovens intactas não influenciou o comportamento do tipo ansiedade e pânico. A partir disso, avaliamos o efeito de 3 a 9 semanas de pós-ovariectomia sobre diferentes respostas comportamentais avaliadas. Nossos resultados mostram que as ratas ovariectomizadas exibiram comportamento do tipo ansiedade, do tipo pânico e déficit de memória declarativa de curto prazo, mas não apresentaram comportamento associado à depressão e resposta defensiva exacerbada. Interessantemente, e no nosso conhecimento pela primeira vez reportado, o tratamento crônico com losartana, um bloqueador de receptores AT₁, foi eficiente em prevenir tais alterações induzidas pela ovariectomia. No entanto, a ovariectomia não afetou a expressão gênica de receptores AT₁ na região CA1 hipocampal, uma importante estrutura moduladora dos processos cognitivos e emocionais.

Estudos epidemiológicos apontam que alterações de humor e sintomas de ansiedade em mulheres podem ocorrer durante o ciclo menstrual, sendo mais comumente manifestados no período que antecede a menstruação, o qual é caracterizado por baixos níveis de estrogênio (Toufexis *et al.*, 2006; Ter Horst, 2010). Em roedores tais achados são ainda inconsistentes. Enquanto alguns pesquisadores relatam aumento do comportamento do tipo ansiedade avaliado no LCE durante as fases metaestro e diestro (Diaz-Veliz *et al.*, 1997; Frye *et al.*, 2000; Marcondes *et al.*, 2001; Sayin *et al.*, 2014), outros encontraram respostas contrárias em testes realizados no mesmo aparato (Sadeghipour *et al.*, 2007; Nin *et al.*, 2012), e alguns outros ainda afirmam não haver diferenças dependentes da fase do ciclo estral (Nomikos e Spyraiki, 1988; Fernandez-Guasti *et al.*, 1999; Soares-Rachetti Vde *et al.*, 2016). Sabendo disso, nós optamos por avaliar, antes de mais nada, o comportamento associado à ansiedade de ratas intactas que apresentavam ciclo estral regular, a fim de verificar a influência de diferentes níveis circulantes de estrogênio – aqui avaliados durante as fases proestro e diestro, que, segundo Butcher e cols., 1974, são as fases de pico e menor concentração de estrogênio,

respectivamente – avaliada em diferentes testes de ansiedade. Nossos resultados indicam que o ciclo estral não influenciou o comportamento das ratas expostas a nenhum dos testes propostos, ou seja, os grupos Proestro e Diestro exibiram comportamento semelhante em relação à esquiva inibitória e fuga avaliados no LTE, número de quadrados totais e centrais percorridos no CA, e exploração do compartimento claro do PCE, corroborando os estudos em que não foi observado efeito do ciclo estral sobre as respostas de ansiedade (Nomikos e Spyraiki, 1988; Fernandez-Guasti *et al.*, 1999; Soares-Rachetti Vde *et al.*, 2016).

Em contrapartida, notamos aumento da latência de esquiva inibitória e redução da latência de fuga no LTE, bem como redução do tempo gasto no componente aversivo do PCE já na terceira semana de ovariectomia. Este padrão de resposta foi constatado também nas ratas expostas ao LCE 5 semanas após a ovariectomia, as quais exibiram redução na exploração dos braços abertos do aparato. Em conformidade, outros autores já relataram respostas semelhantes na tarefa de fuga no LTE, e no perfil de exploração do LCE e PCE após 4 semanas de ovariectomia (Pandaranandaka *et al.*, 2009; Fedotova *et al.*, 2017). Recentemente, Gogos e cols., 2018 mostraram que já na segunda semana pós-ovariectomia há quantidades indetectáveis de estradiol circulante e uma redução considerável nos níveis séricos de progesterona e testosterona. Nesse sentido, tais dados associados aos nossos indicam que alterações comportamentais do tipo ansiedade podem ser manifestadas em poucas semanas de privação hormonal. Diante disso, acreditamos que a depleção repentina e abrupta de hormônios esteróides leva a alterações comportamentais mais evidentes, ao passo que, as flutuações hormonais durante o ciclo estral, que são fisiológicas e menos intensas, induzem respostas mais brandas, justificando, em partes, a inconsistência acerca da influência do ciclo estral sobre as respostas de ansiedade.

Por outro lado, assim como foi visto em nossos modelos com 3 e 6 semanas pós-ovariectomia, outros grupos de pesquisadores também não identificaram diferenças significativas entre animais Sham e OVX no teste do CA (Pandaranandaka *et al.*, 2009; Fedotova *et al.*, 2017; Gogos *et al.*, 2018). Entretanto, Wada e cols., 2018 mostraram redução da exploração central do CA por ratas após 8 semanas de ovariectomia, nos permitindo presumir que o teste do CA possivelmente é menos eficiente em detectar variações comportamentais relacionadas à ansiedade decorrentes de curto prazo de depleção hormonal.

A resposta defensiva tem sido associada a uma variação do comportamento do tipo ansiedade exibido pelo roedor quando este se encontra em uma condição considerada potencialmente ameaçadora. Assim, nossos resultados revelam que a privação de hormônios ovarianos por 8 semanas não exacerbou a resposta defensiva dessas ratas frente à uma ameaça iminente, visto que os grupos Sham e OVX responderam ao teste de forma similar. Analogamente, Aguilar e cols., 2018 mostraram que ratas Sprague-Dawley intactas submetidas ao mesmo protocolo experimental apresentam um perfil de respostas de congelamento semelhante àquele exibido pelas ratas Long Evans do presente estudo comparando as três fases do teste, o que reforça que o comportamento não foi afetado pelo declínio hormonal. Entretanto, devido ao fato de termos observado menor tempo de latência de fuga no LTE em ratas Fischer na terceira semana pós-ovariectomia, esperávamos encontrar uma resposta defensiva aumentada também nas ratas Long Evans na oitava semana pós ovariectomia. Esta discrepância entre os dados pode estar relacionada a diferenças entre as linhagens e/ou ao tempo de ovariectomia.

Embora haja uma vasta quantidade de trabalhos avaliando o efeito neuroprotetor do estradiol, por meio de protocolos de reposição hormonal, sobre a função cognitiva, aprendizado e memória em modelos de ovariectomia, poucos estudos vêm sendo realizados com foco no real efeito da privação hormonal sobre a memória desses animais, avaliada através da comparação direta entre fêmeas intactas e ovariectomizadas. Por essa razão, são ainda pouco consistentes os dados encontrados na literatura no que se refere aos efeitos causados por curtos e longos períodos de depleção hormonal sobre o processo de memória. Neste trabalho nós verificamos que 6 semanas de privação hormonal foi capaz de induzir déficit de memória declarativa de curto prazo, avaliada através da tarefa de RNO, isto é, o grupo OVX demonstrou não ter reconhecido durante a sessão teste o objeto previamente apresentado na sessão treino, ao passo que o grupo Sham o reconheceu. Nossos resultados corroboram dados reportados por Wallace e cols., 2006 e Gogos e cols., 2018 mostrando já haver comprometimento da memória de reconhecimento em ratas com tempo de privação hormonal inferior a 6 semanas, enquanto Fonseca e cols., 2013 e Bastos e cols., 2015 notaram déficit de memória de reconhecimento apenas após 12 semanas de ovariectomia.

O comportamento do tipo depressão também tem sido fortemente associado à depleção endógena de hormônios ovarianos, principalmente após períodos de privação hormonal prolongada (Lagunas *et al.*, 2010; Gogos *et al.*, 2018; Wada *et al.*, 2018). Nesse contexto, ratas com 9 semanas pós-ovariectomia foram submetidas ao teste de PS. Nossos

resultados mostraram que as ratas OVX não apresentaram déficit anedônico em comparação as ratas Sham, indicando que o declínio hormonal não promoveu respostas do tipo depressivas nesses animais. É interessante notar que em outros trabalhos também não foram encontradas diferenças significativas entre grupos Sham e OVX em privação hormonal de curto e longo prazo no teste de PS, no entanto, quando os mesmos animais foram avaliados em modelos de desespero comportamental, como nado forçado e teste de suspensão pela cauda, evidenciou-se a resposta associada à depressão em roedoras ovariectomizadas (Bastos *et al.*, 2015; Gogos *et al.*, 2018). Diante disso, a preferência por sacarose pode não ser considerada uma ferramenta adequada para avaliar as respostas depressivas no modelo de ovariectomia.

Sabe-se que a privação de hormônios ovarianos causa uma perturbação no SRA, estando associada à produção aumentada de Ang II e maior expressão de receptores AT₁ não só em tecidos periféricos, mas também no SNC, elevando o risco de desenvolvimento de hipertensão em mulheres pós-menopáusicas (Schunkert *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2009). Além disso, o aumento nos níveis circulantes de Ang II e a alteração da responsividade dos receptores AT₁ vem sendo relacionados à sintomas depressivos, estresse e Alzheimer (Baghai *et al.*, 2002; Johnson e Grippo, 2006; Frasure-Smith *et al.*, 2009; Saavedra, 2016). Nesse sentido, bloqueadores de receptores AT₁ amplamente utilizados no tratamento de hipertensão têm sido investigados também quanto a seu fator neuroprotetor. No entanto, no nosso conhecimento, não há estudos avaliando o efeito de BRAs sobre distúrbios emocionais e cognitivos em fêmeas/mulheres, muito menos quando essas disfunções são resultantes da privação hormonal. Assim, considerando que a privação de hormônios ovarianos induz déficit de memória e aumento da ansiedade, como mostrado por nossos resultados, e que níveis elevados de Ang II e sensibilidade aumentada de receptores AT₁ também estão associados a doenças neuropsiquiátricas e cognitivas, nós avaliamos se o BRA losartana exerce efeito neuroprotetor também em fêmeas ovariectomizadas.

Efetivamente, nossos resultados mostram que a administração crônica de doses baixas de losartana (10 mg/kg/dia) iniciada logo em seguida à remoção dos ovários foi capaz de prevenir as alterações comportamentais e cognitivas induzidas pela privação dos hormônios ovarianos. Como o tratamento foi realizado por via oral, as alterações no SNC provavelmente ocorreram devido a capacidade do fármaco em atravessar a barreira hematoencefálica permitindo sua atuação central (Li *et al.*, 1993). É importante notar que a losartana não afetou o comportamento do grupo Sham em nenhum dos testes aplicados,

assim como também não alterou o comportamento do grupo OVX avaliados nos testes do CA, AI e PS, associados à ansiedade, resposta defensiva e depressão, respectivamente, que se mantiveram semelhantes aos animais Sham-Veículo e Sham-Losartana. De certa forma este era um resultado esperado e que pode ser considerado positivo, uma vez que é um indicador de que a losartana não induz disfunções comportamentais nos animais controle (Sham), assim como também não promove alterações no comportamento das ratas com privação hormonal que não manifestaram comportamento anômalo quando tratadas com veículo.

Após 5 semanas de ovariectomia concomitantemente ao tratamento com losartana, o grupo OVX apresentou aumento da exploração dos braços abertos do LCE exibindo comportamento similar nesta tarefa não só ao do grupo Sham tratado com losartana, como também ao do grupo Sham-Veículo, o que sugere que o comportamento do tipo ansiedade em ratas OVX foi evitado pelo bloqueio dos receptores AT₁. Respostas semelhantes já foram observadas em machos após a administração sistêmica dos BRAs losartana ou candesartana, sendo estas respostas comparadas ao efeito ansiolítico obtido por benzodiazepínicos (Kaiser *et al.*, 1992; Srinivasan *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2006; Ranjbar *et al.*, 2018). Além disso, a administração de losartana diretamente na amígdala ou no ventrículo lateral também atenuou o comportamento do tipo ansiedade em machos (Braszko *et al.*, 2003; Llano Lopez *et al.*, 2012), assim como a microinjeção de losartana no hipotálamo dorsomedial causou efeito panicolítico em modelo de pânico induzido por lactato (Shekhar *et al.*, 2006), sugerindo que os receptores AT₁ modulam as respostas de ansiedade mediadas pela amígdala e de pânico mediadas pelo hipotálamo dorsomedial.

Analogamente, a performance das ratas OVX no teste de RNO foi significativamente melhorada pelo bloqueio dos receptores AT₁, sendo semelhante a performance realizada pelo grupo Sham-Losartana e também pelo grupo Sham-Veículo, o que nos permite sugerir que o losartana foi eficiente em prevenir o déficit de memória declarativa de curto prazo exibido por ratas na sexta semana de privação de hormônios ovarianos. Nossos dados corroboram estudos realizados em machos, que avaliaram não só o efeito dos BRAs losartana e telmisartana administrados periféricamente (Wincewicz e Braszko, 2014; Wincewicz e Braszko, 2015; Wincewicz *et al.*, 2016; Aghaei *et al.*, 2017), como também a administração de losartana e candesartana centralmente no ventrículo lateral (Bild *et al.*, 2013; Tota *et al.*, 2013). Em todos estes trabalhos notou-se a eficiência dos BRAs em melhorar a memória de reconhecimento, memória espacial e memória de trabalho de ratos submetidos a protocolos de estresse ou previamente tratados

com Ang II. Adicionalmente, Ongali e cols., 2014 mostraram que o tratamento crônico com losartana protegeu a função cognitiva em modelo de Alzheimer em que camundongos transgênicos superexpressam a proteína precursora de amiloide humana.

Estudos tem apontado que a ação neuroprotetora dos BRAs é observada independentemente do efeito do medicamento sobre a pressão arterial do indivíduo, uma vez que a administração de doses baixas de BRAs, que normalmente não são suficientes para reduzir a pressão arterial sistêmica, tem produzido resultados benéficos em modelos de ansiedade e declínio cognitivo (Wang *et al.*, 2007; Danielyan *et al.*, 2010; Ongali *et al.*, 2014; Villapol e Saavedra, 2015). Embora nós tenhamos estabelecido uma dose baixa para o tratamento com losartana no presente trabalho, a dose adotada foi capaz de reduzir a PAM tanto no grupo OVX como no grupo Sham tratados com losartana. Diferentemente do que ocorre em machos, foi observado em estudo prévio em ratas normotensas que o tratamento com losartana reduz PAM em fêmeas (Berg, 2016). Além disso, a aferição da PAM foi realizada em procedimento terminal, sob influência do anestésico isoflurano, o que pode ter contribuído para a queda da pressão em decorrência ao efeito combinado das duas substâncias, uma vez que as duas apresentam efeitos hipotensores (Aulakh *et al.*, 2007; Skrbic e Igc, 2009; Nolan, 2012).

A fim de avaliar se o tratamento crônico com losartana influencia variáveis fisiológicas classicamente alteradas na ovariectomia, nós avaliamos o ganho de peso e a ingestão alimentar durante as 10 semanas de privação hormonal, assim como mensuramos o acúmulo de tecido adiposo na décima semana pós-cirurgia. Assim, verificamos que as ratas OVX ganharam significativamente mais peso corporal do que as ratas Sham, independentemente do tratamento submetido, o que na literatura tem sido relacionado ao menor gasto energético devido à hipoatividade e maior ingestão alimentar apresentados por ratas ovariectomizadas, incluindo um estudo realizado em ratas Long Evans (Richard *et al.*, 1987; Witte *et al.*, 2010). Entretanto, nossos resultados se contrapõem a estes achados, visto que o grupo Sham-Losartana apresentou aumento da ingestão alimentar nas últimas semanas pós-cirurgia em relação ao grupo OVX-Losartana, sugerindo que o losartana pode estar associado ao aumento do apetite em ratas com níveis normais de hormônios ovarianos, porém o consumo aumentado não foi acompanhado por um aumento do peso corporal. Além disso, as ratas OVX exibiram maior acúmulo dos tecidos adiposos parametrial e inguinal, fator que também não foi alterado pelo tratamento com losartana. Este resultado apresenta conformidade com dados clínicos e pré-clínicos que mostram que o declínio da produção endógena de estrogênio induz modificações na

distribuição de gordura, com maior acúmulo na região visceral (Ferrara *et al.*, 2002; Dos Reis *et al.*, 2003). Diante disso, nós acreditamos que o aumento do peso corporal e do tecido adiposo visceral não acompanhado por aumento da ingestão alimentar em ratas OVX pode estar relacionado a alterações metabólicas induzidas pela depleção estrogênica, uma vez que este hormônio participa da regulação de vias metabólicas (Jackson *et al.*, 2013; Velarde, 2013), e tais modificações não foram influenciadas pelo tratamento com losartana. A cessação da atividade ovariana resulta em atrofia uterina e considerável redução do peso deste órgão, sendo, portanto, um resultado esperado e que confirma o sucesso da privação dos hormônios ovarianos no nosso modelo.

Ademais, a atividade locomotora não foi afetada pela ovariectomia ou pelo tratamento com losartana. Tal dado nos sugere que as respostas obtidas nos testes conduzidos neste trabalho foram, portanto, resultantes de alterações à nível central induzidas pela privação de hormônios ovarianos e prevenidas pela ação da losartana, e não promovidas pela hiper ou hipoatividade decorrentes da cirurgia ou do tratamento.

Sabe-se que o hipocampo, estrutura encefálica crucial na modulação e integração de respostas emocionais, de aprendizado e de memória, expressa quantidades consideráveis tanto de receptores AT₁ como de REs (Lenkei *et al.*, 1997; Shughrue *et al.*, 1997), e por esse motivo é uma região vulnerável à variações dos níveis de estrogênio e Ang II circulantes. De fato, a privação de hormônios ovarianos está associada à redução de espinhas dendríticas nos neurônios das regiões CA1 e CA3 do hipocampo (Gould *et al.*, 1990; Wallace *et al.*, 2006; Mendell *et al.*, 2017), enquanto o tratamento com estradiol eleva a densidade sináptica no hipocampo (Woolley e Mcewen, 1992). Além disso, tem sido reportado que a privação estrogênica induz aumento sistêmico e central dos componentes Ang II, ECA e AT₁ em roedoras ovariectomizadas (Schunkert *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1999; Harrison-Bernard *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2005; Tazumi *et al.*, 2016), e que receptores AT₁ estão envolvidos no bloqueio da potenciação de longa duração e da função colinérgica no hipocampo (Barnes *et al.*, 1990). Por outro lado, (Sohn *et al.*, 2013) mostraram que os BRAs induzem aumento da sinalização sináptica hipocampal, aumentando a plasticidade neuronal nesta região, o que pode estar relacionado a melhora cognitiva e da memória promovida por essas drogas.

Diante disso, nós avaliamos se a ovariectomia e o tratamento crônico com losartan alteraram a expressão gênica de receptores AT₁ na região hipocampal CA1 após 10 semanas de privação de hormônios ovarianos e bloqueio dos receptores AT₁ em ratas ovariectomizadas. Nossos resultados mostram que a ovariectomia não afetou a expressão

gênica de receptores AT₁, enquanto que o tratamento com losartan elevou os níveis de RNAm de tal receptor, fato observado tanto no grupo Sham como no OVX tratados. Esta resposta é um indicativo do eficiente bloqueio central dos receptores AT₁ por este fármaco, uma vez que a redução da ativação de receptores pode resultar em uma *upregulation* deste receptor como uma resposta compensatória a atividade reduzida do mesmo na célula (Martyn *et al.*, 1992).

Embora a ovariectomia não tenha elevado os níveis de RNAm de receptores AT₁, nós acreditamos que as respostas do tipo ansiedade e déficit de memória apresentados pelo grupo OVX não tratado podem ser resultantes de um aumento nos níveis circulantes de Ang II induzido pela privação de hormônios ovarianos e não de receptores AT₁. O bloqueio dos receptores AT₁ impede a ação deste peptídeo no hipocampo das ratas prevenindo as alterações comportamentais e cognitivas manifestadas neste modelo. Em um estudo ainda não publicado realizado por nosso grupo não foi possível detectar a concentração de Ang II no hipotálamo inteiro de ratas devido ao tamanho da amostra ser considerado pequeno, mesmo quando avaliada pelo método de Fingerprint® (espectrometria de massa), uma técnica de alta sensibilidade. Nesse contexto, tal hipótese não pôde ser confirmada, visto que o volume da região CA1 é muito menor que do hipotálamo total, o que inviabiliza a detecção de Ang II na nossa amostra.

Além disso, sabendo que nem todo RNAm é traduzido em proteína funcional, a avaliação da expressão de receptores AT₁ é fundamental, bem como a localização dos mesmos por meio de técnicas como autorradiografia de receptor, não só na área hipocampal CA1, como também nas demais regiões do hipocampo e em estruturas encefálicas como amígdala e córtex pré-frontal, que também podem estar envolvidas na modulação dos processos de memória e respostas de ansiedade induzidas pela privação de hormônios ovarianos. Uma outra hipótese seria que o bloqueio de receptores AT₁ pela da losartana pode estar ativando outras vias do SRA, como maior responsividade dos receptores AT₂ ou conversão aumentada de Ang II em Ang 1-7 e consequente ativação de receptores Mas.

Considerando os pontos abordados acima, nós acreditamos que a privação de hormônios ovarianos modifica a responsividade dos receptores do SRA e REs no hipocampo e em outras estruturas como amígdala e córtex pré-frontal, levando a alterações morfológicas e neuroquímicas nessas estruturas, o que induz aumento das respostas de ansiedade e comprometimento da memória. Em contrapartida, o mecanismo

de ação da losartana impede que tais alterações ocorram nessas estruturas encefálicas prevenindo o desenvolvimento destas disfunções neuropsiquiátricas e cognitivas.

Como mencionado anteriormente, o efeito neuroprotetor do estradiol sobre as funções cognitivas e emocionais vem sendo extensivamente descrito na literatura. No entanto, a aplicação clínica da terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa ainda é controversa, uma vez que esse tratamento tem se mostrado eficaz apenas quando iniciado durante a “janela de oportunidade”, em que não se sabe ainda por quanto tempo ela dura e quando exatamente ela começa no caso da menopausa natural, e além disso estudos tem reportado que quando iniciada tardiamente, a reposição de estrogênio pode ser ineficiente ou maléfica. Diante disso, tem-se buscado alternativas terapêuticas mais eficientes para o tratamento dessas condições. No presente trabalho, nós mostramos o efeito neuroprotetor do tratamento oral preventivo com losartana sobre o déficit de memória e comportamento do tipo ansiedade em ratas ovariectomizadas. Considerando isto, a losartana poderia ser considerada como uma opção em potencial no tratamento de ansiedade e déficits de memória decorrentes da privação de hormônios ovarianos em mulheres pós-menopáusicas, uma vez que este medicamento é bem tolerado por pacientes hipertensivos, apresentando poucos e brandos efeitos colaterais, e que pode ser empregado como terapia simultânea para hipertensão e distúrbios neuropsiquiátricos, o que trará benefícios clínicos e econômicos para estas mulheres, melhorando a qualidade de vida das mesmas.

9.CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho concluimos que privação de hormônios ovarianos induz comportamento do tipo ansiedade e déficit de memória declarativa de curto prazo em ratas ovariectomizadas, e que o tratamento crônico com losartana previne que tais alterações ocorram, provavelmente devido a uma modificação na responsividade dos receptores do SRA em estruturas encefálicas que participam da modulação destas respostas.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.P.A. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.

A.P.A. **Practice guideline for the treatment of patients with major depressive disorder**. Washington, DC: American Psychiatric Association 2010.

ACOSTA, J. I. et al. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4248-59, Sep 2009. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470706> >.

AGHAEI, I. et al. Nitric oxide pathway presumably does not contribute to antianxiety and memory retrieval effects of losartan. **Behav Pharmacol**, v. 28, n. 6, p. 420-427, Sep 2017. ISSN 1473-5849 (Electronic)

0955-8810 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28541956> >.

AGUILAR, B. L. et al. Genetically Epilepsy-Prone Rats Display Anxiety-Like Behaviors and Neuropsychiatric Comorbidities of Epilepsy. **Front Neurol**, v. 9, p. 476, 2018. ISSN 1664-2295 (Print)

1664-2295 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29997563> >.

AIT-DAOUD, N. et al. A Review of Alprazolam Use, Misuse, and Withdrawal. **J Addict Med**, v. 12, n. 1, p. 4-10, Jan/Feb 2018. ISSN 1935-3227 (Electronic)

1932-0620 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28777203> >.

AMIN, Z.; CANLI, T.; EPPERSON, C. N. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 4, n. 1, p. 43-58, Mar 2005. ISSN 1534-5823 (Print)

1534-5823 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886402> >.

AULAKH, G. K.; SODHI, R. K.; SINGH, M. An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators. **Life Sci**, v. 81, n. 8, p. 615-39, Aug 2 2007. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692338> >.

AVIS, N. E.; MCKINLAY, S. M. The Massachusetts Women's Health Study: an epidemiologic investigation of the menopause. **J Am Med Womens Assoc (1972)**, v. 50, n. 2, p. 45-9, 63, Mar-Apr 1995. ISSN 0098-8421 (Print)

0098-8421 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722206> >.

BAGHAI, T. C. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis dysregulation in patients with major depression is influenced by the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene. **Neurosci Lett**, v. 328, n. 3, p. 299-303, Aug 16 2002. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147330> >.

BARNES, J. M. et al. Angiotensin II inhibits cortical cholinergic function: implications for cognition. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 16, n. 2, p. 234-8, Aug 1990. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697379> >.

BARRETT, K. et al. **Ganong's Review of Medical Physiology** 2010.

BASSAN, R. Cardiovascular changes and cardiac morbidity of menopause. Effects of hormone replacement therapy. **Arq Bras Cardiol**, v. 72, n. 1, p. 85-98, Jan 1999. ISSN 0066-782X (Print)

0066-782X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347915> >.

BASTOS, C. P. et al. Object recognition memory deficit and depressive-like behavior caused by chronic ovariectomy can be transitorily recovered by the acute activation of hippocampal estrogen receptors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 57, p. 14-25, Jul 2015. ISSN 1873-3360 (Electronic)

0306-4530 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867995> >.

BAYLEY, P.; SQUIRE, L. **The medial temporal lobe and declarative memory**. International Congress Series: 245-259 p. 2003.

BEBBINGTON, P. E. et al. The influence of age and sex on the prevalence of depressive conditions: report from the National Survey of Psychiatric Morbidity. **Psychol Med**, v. 28, n. 1, p. 9-19, Jan 1998. ISSN 0033-2917 (Print)

0033-2917 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9483679> >.

BERG, T. alpha2-Adrenoreceptor Constraint of Catecholamine Release and Blood Pressure Is Enhanced in Female Spontaneously Hypertensive Rats. **Front Neurosci**, v. 10, p. 130, 2016. ISSN 1662-4548 (Print)

1662-4548 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065790> >.

BETHEA, C. L. et al. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. **Front Neuroendocrinol**, v. 23, n. 1, p. 41-100, Jan 2002. ISSN 0091-3022 (Print)

0091-3022 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906203> >.

BILD, W.; CIOBICA, A. Angiotensin-(1-7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. **J Affect Disord**, v. 145, n. 2, p. 165-71, Feb 20 2013. ISSN 1573-2517 (Electronic)

0165-0327 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22868060> >.

BILD, W. et al. Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 43, p. 79-88, Jun 3 2013. ISSN 1878-4216 (Electronic)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266710> >.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 205-18, May 2001. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378177> >.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **J Comp Psychol**, v. 100, n. 2, p. 101-7, Jun 1986. ISSN 0735-7036 (Print)

0021-9940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3720282> >.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, Dec 20 1993. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907880> >.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600702> >.

BOVE, R. et al. Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. **Neurology**, v. 82, n. 3, p. 222-9, Jan 21 2014. ISSN 1526-632X (Electronic)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336141> >.

BRAMBILLA, P. et al. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. **Pharmacopsychiatry**, v. 38, n. 2, p. 69-77, Mar 2005. ISSN 0176-3679 (Print)

0176-3679 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744630> >.

BRANDAO, M. L. et al. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 1, p. 1-13, Mar 17 2008. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054397> >.

BRASZKO, J. J.; KULAKOWSKA, A.; WINNICKA, M. M. Effects of angiotensin II and its receptor antagonists on motor activity and anxiety in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 271-81, Jun 2003. ISSN 0867-5910 (Print)

0867-5910 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832727> >.

BROMBERGER, J. T. et al. Psychologic distress and natural menopause: a multiethnic community study. **Am J Public Health**, v. 91, n. 9, p. 1435-42, Sep 2001. ISSN 0090-0036 (Print)

0090-0036 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527777> >.

BROSNIHAN, K. B. et al. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 4, p. 373-81, Apr 1999. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347798> >.

BRYANT, C.; JUDD, F. K.; HICKEY, M. Anxiety during the menopausal transition: a systematic review. **J Affect Disord**, v. 139, n. 2, p. 141-8, Jul 2012. ISSN 1573-2517 (Electronic)

0165-0327 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783260> >.

BURT, V. L. et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension**, v. 25, n. 3, p. 305-13, Mar 1995. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7875754> >.

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704-8, Jun 1974. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4857496> >.

BUTLER, L.; SANTORO, N. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. **Steroids**, v. 76, n. 7, p. 627-35, Jun 2011. ISSN 1878-5867 (Electronic)

0039-128X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419147> >.

CAMPOS, G. V. et al. Estrogen receptor beta activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. **Behav Brain Res**, v. 357-358, p. 57-64, Jan 14 2019. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29567265> >.

CASAROTTO, P. C.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H., JR. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. **Behav Pharmacol**, v. 23, n. 1, p. 80-8, Feb 2012. ISSN 1473-5849 (Electronic)

0955-8810 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139606> >.

CLARK, J. A. et al. Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1051-63, Nov 2012. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796107> >.

COLLABORATIVE GROUP, O. H. F. I. B. C. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Lancet**, v. 350, n. 9084, p. 1047-59, Oct 11 1997. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213546> >.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends Mol Med**, v. 19, n. 3, p. 197-209, Mar 2013. ISSN 1471-499X (Electronic)

1471-4914 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348042> >.

DAENDEE, S.; THONGSONG, B.; KALANDAKANOND-THONGSONG, S. Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 86-93, Jun 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499705> >.

DANIELYAN, L. et al. Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Rejuvenation Res**, v. 13, n. 2-3, p. 195-201, Apr-Jun 2010. ISSN 1557-8577 (Electronic)

1549-1684 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370487> >.

DAVISON, S. L. et al. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 7, p. 3847-53, Jul 2005. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827095> >.

DEAN, S. A. et al. 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 3, p. R759-66, Mar 2005. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550614> >.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, n. 5, p. 673-704, 2007. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368764> >.

DEROO, B. J.; KORACH, K. S. Estrogen receptors and human disease. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 561-70, Mar 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511588> >.

DIAZ-VELIZ, G. et al. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, n. 3, p. 637-42, Nov 1997. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9329052> >.

DIAZ-VELIZ, G. et al. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. **Physiol Behav**, v. 50, n. 1, p. 61-5, Jul 1991. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1946732> >.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571-8, Aug 2012. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22778227> >.

DING, F. et al. Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female transgenic model of familial Alzheimer's. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59825, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555795> >.

DJIOGUE, S. et al. Memory and exploratory behavior impairment in ovariectomized Wistar rats. **Behav Brain Funct**, v. 14, n. 1, p. 14, Jul 16 2018. ISSN 1744-9081 (Electronic)

1744-9081 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30012162> >.

DONNER, N.; HANDA, R. J. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 705-18, Oct 6 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559077> >.

DOS REIS, C. M. et al. Body composition, visceral fat distribution and fat oxidation in postmenopausal women using oral or transdermal oestrogen. **Maturitas**, v. 46, n. 1, p. 59-68, Sep 25 2003. ISSN 0378-5122 (Print)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963170> >.

DRAPER, C. F. et al. Menstrual cycle rhythmicity: metabolic patterns in healthy women. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14568, Oct 1 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30275458> >.

DUDAI, Y.; MORRIS, R. G. Memorable trends. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 742-50, Oct 30 2013. ISSN 1097-4199 (Electronic)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183024> >.

DUSI, N. et al. Brain Structural Effects of Antidepressant Treatment in Major Depression. **Curr Neuropharmacol**, v. 13, n. 4, p. 458-65, 2015. ISSN 1875-6190 (Electronic)

1570-159X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412065> >.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3228475> >.

FEDOTOVA, J. et al. Modulating Effects of Cholecalciferol Treatment on Estrogen Deficiency-Induced Anxiety-Like Behavior of Adult Female Rats. **Folia Med (Plovdiv)**, v. 59, n. 2, p. 139-158, Jun 1 2017. ISSN 0204-8043 (Print)

0204-8043 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704190> >.

FERNANDEZ-GUASTI, A. et al. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 63, n. 1, p. 13-20, May 1999. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340518> >.

FERRARA, C. M. et al. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 9, p. 4166-70, Sep 2002. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213866> >.

FONSECA, C. S. et al. Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. **Neurobiol Learn Mem**, v. 101, p. 19-25, Mar 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298786> >.

FRASURE-SMITH, N. et al. The relationships among heart rate variability, inflammatory markers and depression in coronary heart disease patients. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 8, p. 1140-7, Nov 2009. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635552> >.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 3, p. 587-96, Nov 2000. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164090> >.

FRYE, C. A.; WALF, A. A. Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 2, p. 306-13, Apr 2004. ISSN 0735-7044 (Print)

0735-7044 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113256> >.

GALLAGHER, P. E. et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 323-8, Jan 1999. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931124> >.

GEORGIEV, V. et al. Effect of angiotensin II on the Vogel conflict paradigm and on the content of dopamine and noradrenaline in rat brain. **Acta Physiol Pharmacol Bulg**, v. 16, n. 1, p. 32-7, 1990. ISSN 0323-9950 (Print)

0323-9950 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2392952> >.

GIBBS, R. B. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. **Brain Res**, v. 844, n. 1-2, p. 20-7, Oct 9 1999. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536257> >.

GIBBS, R. B.; GABOR, R. Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. **J Neurosci Res**, v. 74, n. 5, p. 637-43, Dec 1 2003. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635215> >.

GOGOS, A. et al. Differential effects of chronic 17beta-oestradiol treatment on rat behaviours relevant to depression. **J Neuroendocrinol**, v. 30, n. 11, p. e12652, Nov 2018. ISSN 1365-2826 (Electronic)

0953-8194 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30311279> >.

GOULD, E. et al. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. **J Neurosci**, v. 10, n. 4, p. 1286-91, Apr 1990. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2329377> >.

GOUVEIA, A., JR. et al. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behav Processes**, v. 67, n. 2, p. 167-71, Sep 30 2004. ISSN 0376-6357 (Print)

0376-6357 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240054> >.

GOVEAS, J. S. et al. Depressive Symptoms and Longitudinal Changes in Cognition: Women's Health Initiative Study of Cognitive Aging. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 27, n. 2, p. 94-102, Jun 2014. ISSN 0891-9887 (Print)

0891-9887 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24584465> >.

GRAEFF, F.; BRANDÃO, M. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5. ed. São Paulo: Lemos: 1999.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res**, v. 14, n. 4-5, p. 239-65, Oct 1981. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6124290> >.

GRECO, B. et al. Response of ERalpha-IR and ERbeta-IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. **Horm Behav**, v. 43, n. 4, p. 444-53, Apr 2003. ISSN 0018-506X (Print)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788290> >.

GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **N Engl J Med**, v. 346, n. 5, p. 340-52, Jan 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821512> >.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C.; MIZELLE, H. L. Role of the renin-angiotensin system in control of sodium excretion and arterial pressure. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 591, p. 48-62, 1990. ISSN 0302-2994 (Print)

0302-2994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2220409> >.

HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's**. 10th ed. New York: McGraw-Hill: 2001.

HARRISON-BERNARD, L. M.; SCHULMAN, I. H.; RAIJ, L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1157-63, Dec 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610098> >.

HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behav Brain Res**, v. 166, n. 1, p. 93-100, Jan 6 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154649> >.

HIROI, R. et al. Benefits of Hormone Therapy Estrogens Depend on Estrogen Type: 17beta-Estradiol and Conjugated Equine Estrogens Have Differential Effects on Cognitive, Anxiety-Like, and Depressive-Like Behaviors and Increase Tryptophan Hydroxylase-2 mRNA Levels in Dorsal Raphe Nucleus Subregions. **Front Neurosci**, v. 10, p. 517, 2016. ISSN 1662-4548 (Print)

1662-453X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008302> >.

HOGERVORST, E.; BANDELOW, S. Sex steroids to maintain cognitive function in women after the menopause: a meta-analysis of treatment trials. **Maturitas**, v. 66, n. 1, p. 56-71, May 2010. ISSN 1873-4111 (Electronic)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202765> >.

HU, Z. et al. Ovarian hormones ameliorate memory impairment, cholinergic deficit, neuronal apoptosis and astrogliosis in a rat model of Alzheimer's disease. **Exp Ther Med**, v. 11, n. 1, p. 89-97, Jan 2016. ISSN 1792-0981 (Print)

1792-0981 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26889223> >.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I. et al. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 4, p. 786-93, Apr 1997. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153585> >.

JACKSON, K. C. et al. Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 3, p. R206-17, Feb 2013. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193112> >.

Jl, H. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. **Exp Physiol**, v. 93, n. 5, p. 648-57, May 2008. ISSN 0958-0670 (Print)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296494> >.

Jl, H. et al. 17beta-estradiol deficiency reduces potassium excretion in an angiotensin type 1 receptor-dependent manner. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 1, p. H17-22, Jul 2007. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449550> >.

JOHNSON, A. K.; GRIPPO, A. J. Sadness and broken hearts: neurohumoral mechanisms and comorbidity of ischemic heart disease and psychological depression. **J Physiol Pharmacol**, v. 57 Suppl 11, p. 5-29, Nov 2006. ISSN 1899-1505 (Electronic)

0867-5910 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244936> >.

KAISER, F. C. et al. Antianxiety properties of the angiotensin II antagonist, DUP 753, in the rat using the elevated plus-maze. **Neuroreport**, v. 3, n. 10, p. 922-4, Oct 1992. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1358253> >.

KANGUSSU, L. M. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Behav Brain Res**, v. 257, p. 25-30, Nov 15 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016839> >.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

KARLAMANGLA, A. S. et al. Evidence for Cognitive Aging in Midlife Women: Study of Women's Health Across the Nation. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169008, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045986> >.

KESNER, R.; MARTINEZ, J. **Neurobiology of Learning and Memory**. 1a Edition. Academic Press, 2007.

KESSLER, R. C. et al. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **J Affect Disord**, v. 29, n. 2-3, p. 85-96, Oct-Nov 1993. ISSN 0165-0327 (Print)

0165-0327 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300981> >.

KOGANEZAWA, N. et al. Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. **Neurosci Res**, v. 61, n. 2, p. 172-81, Jun 2008. ISSN 0168-0102 (Print)

0168-0102 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407365> >.

KREZEL, W. et al. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12278-82, Oct 9 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593044> >.

KRITZ-SILVERSTEIN, D.; BARRETT-CONNOR, E. Hysterectomy, oophorectomy, and cognitive function in older women. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 1, p. 55-61, Jan 2002. ISSN 0002-8614 (Print)

0002-8614 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028247> >.

KUIPER, G. G. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-70, Mar 1997. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048584> >.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 68, n. 2, p. 175-183, Sep-Oct 2013. ISSN 1873-488X (Electronic)

1056-8719 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684951> >.

LAGUNAS, N. et al. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. **Horm Behav**, v. 58, n. 5, p. 786-91, Nov 2010. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691693> >.

LENKEI, Z. et al. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 4, p. 383-439, Oct 1997. ISSN 0091-3022 (Print)

0091-3022 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9344632> >.

LI, Z.; BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat **Brain Research Bulletin**, v. 30, p. 33-39, 1993.

LLANO LOPEZ, L. H. et al. Anxiolytic-like effect of losartan injected into amygdala of the acutely stressed rats. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 1, p. 54-63, 2012. ISSN 1734-1140 (Print)

1734-1140 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580520> >.

LOBO, R. A. et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, v. 17, n. 5, p. 540-56, Oct 2014. ISSN 1473-0804 (Electronic)

1369-7137 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969415> >.

LONG, T. et al. Comparison of transitional vs surgical menopause on monoamine and amino acid levels in the rat brain. **Mol Cell Endocrinol**, v. 476, p. 139-147, Nov 15 2018. ISSN 1872-8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29738870> >.

LUND, T. D. et al. Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 797-807, Feb 2005. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514081> >.

MAKI, P. M. Hormone therapy and cognitive function: is there a critical period for benefit? **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 1027-30, 2006. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488547> >.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov 2002. ISSN 1519-6984 (Print)

1519-6984 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12659010> >.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav**, v. 74, n. 4-5, p. 435-40, Nov-Dec 2001. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790402> >.

MARTYN, J. A. et al. Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. Effects on neuromuscular blockers. **Anesthesiology**, v. 76, n. 5, p. 822-43, May 1992. ISSN 0003-3022 (Print)

0003-3022 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1575351> >.

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 357-84, 2002. ISSN 0079-9963 (Print)

0079-9963 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017552> >.

MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 279-307, Jun 1999. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368772> >.

MCKINLAY, J. B.; MCKINLAY, S. M.; BRAMBILLA, D. The relative contributions of endocrine changes and social circumstances to depression in mid-aged women. **J Health Soc Behav**, v. 28, n. 4, p. 345-63, Dec 1987. ISSN 0022-1465 (Print)

0022-1465 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3429805> >.

MECHAEIL, R. et al. Cognitive enhancement following acute losartan in normotensive young adults. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 217, n. 1, p. 51-60, Sep 2011. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484242> >.

MENDELL, A. L. et al. Expansion of mossy fibers and CA3 apical dendritic length accompanies the fall in dendritic spine density after gonadectomy in male, but not female, rats. **Brain Struct Funct**, v. 222, n. 1, p. 587-601, Jan 2017. ISSN 1863-2661 (Electronic)

1863-2661 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283589> >.

MITRA, S. W. et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2055-67, May 2003. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697714> >.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 4, p. 254-60, Aug 1955. ISSN 0021-9940 (Print)

0021-9940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13252152> >.

NEE, L. E.; LIPPA, C. F. Alzheimer's disease in 22 twin pairs--13-year follow-up: hormonal, infectious and traumatic factors. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 10, n. 2, p. 148-51, Mar-Apr 1999. ISSN 1420-8008 (Print)

1420-8008 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10026389> >.

NIN, M. S. et al. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **Eur J Pharmacol**, v. 684, n. 1-3, p. 95-101, Jun 5 2012. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487059> >.

NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 22, p. 7024-6, Nov 1982. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6960361> >.

NOLAN, J. P. **Anaesthesia and neuromuscular block**. 11th. 2012.

NOMIKOS, G. G.; SPYRAKI, C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 691-6, Jul 1988. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3419550> >.

O.M.S. **Reproductive health indicators**. RESEARCH, D. O. R. H. A. Geneva, Switzerland: Organização Mundial da Saúde: 68 p. 2006.

ONGALI, B. et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. **Neurobiol Dis**, v. 68, p. 126-36, Aug 2014. ISSN 1095-953X (Electronic)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807206> >.

OYOLA, M. G. et al. Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor-beta (ERbeta) activation by a selective ERbeta agonist in female mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 837-46, Feb 2012. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186418> >.

PANDARANANDAKA, J.; POONYACHOTI, S.; KALANDAKANOND-THONGSONG, S. Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. **Physiol Behav**, v. 87, n. 4, p. 828-35, Apr 15 2006. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545402> >.

PANDARANANDAKA, J.; POONYACHOTI, S.; KALANDAKANOND-THONGSONG, S. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. **Behav Brain Res**, v. 198, n. 1, p. 142-8, Mar 2 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046994> >.

PAUL, E. D.; LOWRY, C. A. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 12, p. 1090-106, Dec 2013. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704363> >.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480> >.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor alpha. **Neurobiol Learn Mem**, v. 114, p. 1-9, Oct 2014. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726465> >.

PHUNG, T. K. et al. Hysterectomy, oophorectomy and risk of dementia: a nationwide historical cohort study. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 30, n. 1, p. 43-50, 2010. ISSN 1421-9824 (Electronic)

1420-8008 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689282> >.

PIKE, C. J. et al. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 2, p. 239-58, Jul 2009. ISSN 1095-6808 (Electronic)

0091-3022 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427328> >.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700> >.

RANJBAR, H. et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan attenuates locomotor, anxiety-like behavior, and passive avoidance learning deficits in a sub-chronic stress model. **Iran J Basic Med Sci**, v. 21, n. 8, p. 856-862, Aug 2018. ISSN 2008-3866 (Print)

2008-3866 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30186574> >.

RICHARD, D.; ROCHON, L.; DESHAIES, Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. **Am J Physiol**, v. 253, n. 5 Pt 2, p. R740-5, Nov 1987. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3688275> >.

RIVERA, C. M. et al. Increased cardiovascular mortality after early bilateral oophorectomy. **Menopause**, v. 16, n. 1, p. 15-23, Jan-Feb 2009. ISSN 1530-0374 (Electronic)

1072-3714 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034050> >.

ROBERTS, J.; MAURER, K. Blood pressure levels of persons 6-74 years. United States, 1971-1974. **Vital Health Stat 11**, n. 203, p. i-v, 1-103, Sep 1977. ISSN 0083-1980 (Print)

0083-1980 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/607560> >.

ROCCA, W. A. et al. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. **Neurology**, v. 69, n. 11, p. 1074-83, Sep 11 2007. ISSN 1526-632X (Electronic)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761551> >.

ROCCA, W. A. et al. Survival patterns after oophorectomy in premenopausal women: a population-based cohort study. **Lancet Oncol**, v. 7, n. 10, p. 821-8, Oct 2006. ISSN 1470-2045 (Print)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012044> >.

ROCCA, W. A. et al. Long-term risk of depressive and anxiety symptoms after early bilateral oophorectomy. **Menopause**, v. 15, n. 6, p. 1050-9, Nov-Dec 2008. ISSN 1530-0374 (Electronic)

1072-3714 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724263> >.

ROCCA, W. A. et al. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. **Menopause**, v. 19, n. 3, p. 272-7, Mar 2012. ISSN 1530-0374 (Electronic)

1072-3714 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993082> >.

ROCCA, W. A. et al. Long-term effects of bilateral oophorectomy on brain aging: unanswered questions from the Mayo Clinic Cohort Study of Oophorectomy and Aging. **Womens Health (Lond)**, v. 5, n. 1, p. 39-48, Jan 2009. ISSN 1745-5065 (Electronic)

1745-5065 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19102639> >.

RODRIGUEZ, M.; SHOUBE, D. Surgical Menopause. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 44, n. 3, p. 531-42, Sep 2015. ISSN 1558-4410 (Electronic)

0889-8529 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316241> >.

SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr Rev**, v. 13, n. 2, p. 329-80, May 1992. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1618166> >.

SAAVEDRA, J. M. Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 2, p. 259-79, Mar 2016. ISSN 1573-6830 (Electronic)

0272-4340 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26993513> >.

SAAVEDRA, J. M. et al. A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1 receptor and benzodiazepine binding. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1123-34, Jun 2006. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16205776> >.

SADEGHIPOUR, H. R. et al. Nitric oxide involvement in estrous cycle-dependent changes of the behavioral responses of female rats in the elevated plus-maze test. **Behav Brain Res**, v. 178, n. 1, p. 10-7, Mar 12 2007. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207542> >.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMOES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol**, v. 93, n. 5, p. 519-27, May 2008. ISSN 0958-0670 (Print)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310257> >.

SAYIN, A. et al. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 180-7, Sep 2014. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24933337> >.

SCHUNKERT, H. et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. **Circulation**, v. 95, n. 1, p. 39-45, Jan 7 1997. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994414> >.

SHEKHAR, A. et al. Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. **J Neurosci**, v. 26, n. 36, p. 9205-15, Sep 6 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957077> >.

SHERWIN, B. B. Sex hormones and psychological functioning in postmenopausal women. **Exp Gerontol**, v. 29, n. 3-4, p. 423-30, May-Aug 1994. ISSN 0531-5565 (Print)

0531-5565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925760> >.

SHERWIN, B. B. Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection? **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 11, p. 620-7, Nov 2009. ISSN 1759-5037 (Electronic)

1759-5037 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844249> >.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 388, n. 4, p. 507-25, Dec 1 1997. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9388012> >.

SILVA, F. C. et al. Chronic Treatment with Ivabradine Does Not Affect Cardiovascular Autonomic Control in Rats. **Front Physiol**, v. 7, p. 305, 2016. ISSN 1664-042X (Print)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507948> >.

SIMPSON, E. R.; DAVIS, S. R. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4589-94, Nov 2001. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606422> >.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1945-50, Oct 2009. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595728> >.

SOARES-RACHETTI VDE, P. et al. Short term, low dose fluoxetine blocks estrous cycle-linked changes in responsiveness to diazepam in female rats. **J Psychopharmacol**, v. 30, n. 10, p. 1062-8, Oct 2016. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956868> >.

SOHN, Y. I. et al. Antihypertensive drug Valsartan promotes dendritic spine density by altering AMPA receptor trafficking. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 439, n. 4, p. 464-70, Oct 4 2013. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012668> >.

SQUIRE, L.; STARK, C.; CLARK, R. **The medial temporal lobe.** Annual Review of Neuroscience. 27: 279-306 p. 2004.

SRINIVASAN, J.; SURESH, B.; RAMANATHAN, M. Differential anxiolytic effect of enalapril and losartan in normotensive and renal hypertensive rats. **Physiol Behav**, v. 78, n. 4-5, p. 585-91, Apr 2003. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782212> >.

STRAUSS, C. V.; VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H., JR. Activation of 5-HT1A receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 103-10, Jun 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499701> >.

STRAUSS, J.; BARBIERI, R. **Reproductive endocrinology**. 5a Edition: Elsevier saunders. 2004.

SWAMIDASS, S. J. Mining small-molecule screens to repurpose drugs. **Brief Bioinform**, v. 12, n. 4, p. 327-35, Jul 2011. ISSN 1477-4054 (Electronic)
1467-5463 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715466> >.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 94 Suppl 161, p. 8-16, Nov 2015. ISSN 1600-0412 (Electronic)
0001-6349 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358238> >.

TAUGHER, R. J. et al. The bed nucleus of the stria terminalis is critical for anxiety-related behavior evoked by CO₂ and acidosis. **J Neurosci**, v. 34, n. 31, p. 10247-55, Jul 30 2014. ISSN 1529-2401 (Electronic)
0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080586> >.

TAZUMI, S. et al. Effects of estrogen replacement on stress-induced cardiovascular responses via renin-angiotensin system in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 311, n. 5, p. R898-R905, Nov 1 2016. ISSN 1522-1490 (Electronic)
0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511283> >.

TEDESCO, M. A. et al. Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life in hypertensive patients. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 11 Pt 1, p. 1130-4, Nov 1999. ISSN 0895-7061 (Print)
0895-7061 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604491> >.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-6, Apr 2000. ISSN 0091-3057 (Print)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764908> >.

TER HORST, G. J. Estrogen in the limbic system. **Vitam Horm**, v. 82, p. 319-38, 2010. ISSN 0083-6729 (Print)
0083-6729 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472146> >.

THAKUR, M. K.; SHARMA, P. K. Aging of brain: role of estrogen. **Neurochem Res**, v. 31, n. 11, p. 1389-98, Nov 2006. ISSN 0364-3190 (Print)
0364-3190 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061165> >.

THOMPSON, D. D. et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 125S-133S, Oct 1995. ISSN 8756-3282 (Print)

1873-2763 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579908> >.

TIAN, Z. et al. Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2218-33, Oct 2013. ISSN 1873-3360 (Electronic)

0306-4530 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669322> >.

TOMIHARA, K. et al. Effect of ER-beta gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. **Physiol Behav**, v. 96, n. 2, p. 300-6, Feb 16 2009. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996135> >.

TOTA, S. et al. Effect of angiotensin II on spatial memory, cerebral blood flow, cholinergic neurotransmission, and brain derived neurotrophic factor in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 226, n. 2, p. 357-69, Mar 2013. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192311> >.

TOUFEXIS, D. J.; MYERS, K. M.; DAVIS, M. The effect of gonadal hormones and gender on anxiety and emotional learning. **Horm Behav**, v. 50, n. 4, p. 539-49, Nov 2006. ISSN 0018-506X (Print)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904674> >.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 463-9, Feb 1993. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446680> >.

UZUN, S. et al. Side effects of treatment with benzodiazepines. **Psychiatr Danub**, v. 22, n. 1, p. 90-3, Mar 2010. ISSN 0353-5053 (Print)

0353-5053 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305598> >.

VELARDE, M. C. Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. **Physiol Genomics**, v. 45, n. 3, p. 106-9, Feb 4 2013. ISSN 1531-2267 (Electronic)

1094-8341 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249996> >.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H., JR. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 127-35, Apr 2014. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275045> >.

VILLAPOL, S.; SAAVEDRA, J. M. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. **Am J Hypertens**, v. 28, n. 3, p. 289-99, Mar 2015. ISSN 1941-7225 (Electronic)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25362113> >.

VOIGT, J. P. et al. Hippocampal 5-HT and NE release in the transgenic rat TGR(mREN2)27 related to behavior on the elevated plus maze. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 4, p. 279-85, Jun 1999. ISSN 0924-977X (Print)

0924-977X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422887> >.

WADA, T. et al. Impact of central and peripheral estrogen treatment on anxiety and depression phenotypes in a mouse model of postmenopausal obesity. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0209859, 2018. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30589890> >.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1288-301, Jul 2005. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756306> >.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 9, p. 1598-609, Sep 2005. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15798780> >.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1097-111, Jun 2006. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554740> >.

WALLACE, M. et al. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. **Brain Res**, v. 1126, n. 1, p. 176-82, Dec 18 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934233> >.

WANG, J. et al. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3393-402, Nov 2007. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965777> >.

WANG, L. et al. Increasing brain angiotensin converting enzyme 2 activity decreases anxiety-like behavior in male mice by activating central Mas receptors. **Neuropharmacology**, v. 105, p. 114-123, Jun 2016. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767952> >.

WANNMACHER, L.; JN, L. Terapia de reposição hormonal na menopausa: evidências atuais. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, p. 6, 2004.

WEI, P. et al. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. **Nat Commun**, v. 6, p. 6756, Apr 9 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854147> >.

WEISSMAN, M. M.; OLFSON, M. Depression in women: implications for health care research. **Science**, v. 269, n. 5225, p. 799-801, Aug 11 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638596> >.

WHITMER, R. A. et al. Timing of hormone therapy and dementia: the critical window theory revisited. **Ann Neurol**, v. 69, n. 1, p. 163-9, Jan 2011. ISSN 1531-8249 (Electronic)

0364-5134 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21280086> >.

WILLIAMSON, C. R. et al. Comparative Analysis of Renin-Angiotensin System (RAS)-Related Gene Expression Between Hypertensive and Normotensive Rats. **Med Sci Monit Basic Res**, v. 23, p. 20-24, Jan 31 2017. ISSN 2325-4416 (Electronic)

2325-4394 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138124> >.

WINCEWICZ, D.; BRASZKO, J. J. Telmisartan attenuates cognitive impairment caused by chronic stress in rats. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 3, p. 436-41, Jun 2014. ISSN 1734-1140 (Print)

1734-1140 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905520> >.

WINCEWICZ, D.; BRASZKO, J. J. Angiotensin II AT1 receptor blockade by telmisartan reduces impairment of spatial maze performance induced by both acute and chronic stress. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 16, n. 3, p. 495-505, Sep 2015. ISSN 1752-8976 (Electronic)

1470-3203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622157> >.

WINCEWICZ, D. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade by telmisartan prevents stress-induced impairment of memory via HPA axis deactivation and up-regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 148, p. 108-18, Sep 2016. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375198> >.

WITTE, M. M. et al. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. **Gen Comp Endocrinol**, v. 166, n. 3, p. 520-8, May 1 2010. ISSN 1095-6840 (Electronic)

0016-6480 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067798> >.

WOOLLEY, C. S.; MCEWEN, B. S. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. **J Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 2549-54, Jul 1992. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613547> >.

WOOLLEY, C. S.; MCEWEN, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. **J Comp Neurol**, v. 336, n. 2, p. 293-306, Oct 8 1993. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245220> >.

XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 4, p. R804-17, Apr 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178125> >.

XUE, B.; JOHNSON, A. K.; HAY, M. Sex differences in angiotensin II- and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n. 5, p. R459-63, Sep 2013. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23883676> >.

YANES, L. L.; RECKELHOFF, J. F. Postmenopausal hypertension. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 7, p. 740-9, Jul 2011. ISSN 1941-7225 (Electronic)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509049> >.

YANG, L. C. et al. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e9851, May 7 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20479872> >.

YILMAZ, M.; MEISTER, M. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. **Curr Biol**, v. 23, n. 20, p. 2011-5, Oct 21 2013. ISSN 1879-0445 (Electronic)

0960-9822 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120636> >.

YOUNG, E. A. et al. Alteration in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in depressed women. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 12, p. 1157-62, Dec 2000. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115329> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 397-406, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657635> >.