



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – SBFis/UNESP**

THAINÁ DAGUANE ESPERANÇA

**Efeito da terapia hormonal de longa duração com
estrogênio sobre comportamento cognitivo e funcional de
ratas Wistar senescentes**

ARAÇATUBA

2023

THAINÁ DAGUANE ESPERANÇA

**Efeito da terapia hormonal de longa duração com
estrogênio sobre comportamento cognitivo e funcional de
ratas Wistar senescentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima

ARAÇATUBA

2023

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

E77e Esperança, Thainá Daguane.
 Efeito da terapia hormonal de longa duração com
 estrogênio sobre comportamento cognitivo e funcional
 de ratas Wistar senescentes / Thainá Daguane
 Esperança. - Araçatuba, 2023
 90 f. : il. ; tab., graf.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
 Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
 Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles
 Coorientadora: Profa. Fernanda Barbosa Lima

 1. Envelhecimento 2. Estrogênio 3. Hipocampo
 4. Locus Coeruleus I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thainá Daguane Esperança

Efeito da terapia hormonal de longa duração com estrogênio sobre comportamento cognitivo e funcional de ratas Wistar senescentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima

Aprovado em: 06/07/2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles - Orientadora

Instituição: FOA/UNESP

Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima – Coorientadora

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Manuella Pinto Kaster

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 08. 11. 1996, Buritama – SP.

Filiação: Mauriceia Cristina Daguane de Oliveira
Valei Esperança

2016/2019: Curso de Graduação em Fisioterapia na Universidade Paulista – UNIP – Araçatuba – SP.

2020/2023: Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.

DEDICATÓRIA

Primeiramente acima de tudo e todos, agradeço a Deus por nunca me desamparar, seja nos momentos mais felizes ou difíceis de minha vida se faz presente, sempre me fortalecendo, protegendo e abençoando.

Ao meu companheiro Ígor, que tantas provações passamos juntos, abrindo mão de inúmeras coisas para que eu pudesse realizar meus sonhos, sendo ele meu maior fã, que incansavelmente me fortifica. Mesmo não sendo da área, me ajudou nos estudos varando noites, preocupando-se sempre para que eu não pegasse no sono e garantindo que eu tivesse estudado todo o necessário e estivesse pronta para provas, seminários, aulas, apresentações e afins. Além de inúmeras vezes ter colocado a mão na massa para que minhas coisas ficassem prontas em excelente qualidade, cada detalhe pensado com carinho sempre visando meu melhor. Não tenho palavras suficientes para agradecer tamanho companheirismo, carinho, fé e amor para comigo, muito obrigada.

A minha família, aqueles que realmente torcem pelo meu bem e sucesso. Em especial meus pais, irmãos, primos e tios maternos, sogros, cunhados e meus amados sobrinhos. Sou eternamente grata por todos os conselhos, suporte, compreensão e pelas inúmeras vezes que, mesmo despercebidos, alegravam-me e davam o fomento necessário para continuar meu caminho.

Aos meus avós paternos, que me acolheram desde pequena em sua casa e me criaram até então, mesmo muitas vezes não entendendo o que eu estava fazendo jamais me julgaram, querendo sempre minha felicidade mesmo frente demasiados problemas. Em especial, vó Santa (*in memoriam*), que recentemente foi levada para junto de Deus, mesmo tendo tamanhas diferenças, sempre se dedicou a cuidar-me da melhor forma que pudesse.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) pela oportunidade e o privilégio de realizar o Mestrado.

Ao Diretor da FOA / UNESP, Prof^a. Tit. Glauco Issamu Miyahara e ao Vice-Diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem pelo apoio.

À Pró-Reitora de Pós-Graduação da UNESP (PROPG/UNESP), pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas.

À Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Cristiane Regina Lui Matos pelo empenho em me atender e auxiliar.

À Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE) por toda prontidão e suporte.

A todos do Departamento de Ciências Básicas, incluindo professores, discentes, pessoal da administração e manutenção do prédio. Obrigada por cada suporte, colaboração, aprendizado, conversa e bons momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos os funcionários da UNESP.

Muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, por toda compreensão, suporte e carinho. Muito obrigada!

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Rita Cássia Menegati Dornelles, por ter aberto as portas de seu laboratório em 2019 para uma iniciação científica, fazendo-me encantar pela ciência ainda mais, despertando o amor pelo ensino. Obrigada pela compreensão e esclarecimento de todas minhas dúvidas, pela paciência em me ensinar quantas vezes fosse necessário, por partilhar seu tempo em meu aprendizado e formação profissional, pelas correções e conselhos sempre pontualmente necessários e pelo cuidado não só a mim, mas por todos em sua volta. A professora sempre será um exemplo que procurarei seguir. Muito obrigada!

Ao meu parecerista, Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto e minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Barbosa Lima, pelo suporte, paciência e troca de conhecimento que disponibilizaram. Muito obrigada!

Aos professores da Banca do Exame Geral de Qualificação (EGQ) Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto e Prof^ª. Dr^ª. Pâmela Billig Mello Carpes pelas correções e contribuições ao meu trabalho. Muito obrigada!

Aos meus amigos e amigas que desde criança sempre permaneceram ao meu lado nos melhores e piores momentos, mesmo agora longe e com cada um tomando seu caminho e formando suas famílias, a amizade continua a mesma. Muito obrigada!

As minhas mais que amigas Beatriz, Débora, Fernanda, Livia e Luana, parceiras de laboratório e de vida, onde vibramos juntas a cada nova conquista seja do laboratório ou de cada uma em si, dentro de suas particularidades nos tornamos uma equipe excepcional. Obrigada por cada risada, café, almoço, abraço, surpresa, conselho e bronca, vocês fazem parte de quem eu sou hoje como pessoa e como profissional. Muito obrigada!

Aos integrantes anteriores e atuais do LaFEE por todo suporte e parceria durante todos esses anos, desde minha jornada ainda como iniciadora científica. Muito obrigada!

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”*
(George Bernard Shaw)

RESUMO

ESPERANÇA, T. D. **Efeito da terapia hormonal de longa duração com estrogênio sobre comportamento cognitivo e funcional de ratas Wistar senescentes.** 2023. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP, 2023.

RESUMO

O envelhecimento resulta do declive gradativo funcional celular, programado e pendente de tempo que todos seres vivos propendem passar. Na perimenopausa, uma das fases do envelhecimento reprodutivo, as interações dos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), gonadotrofinas e esteroides gonadais, e a atividade de neurônios de regiões como o locus coeruleus (LC) e hipocampo (HP) podem comprometer biomarcadores do estado redox, levando a alterações comportamentais e neuroprotetoras. Nossa hipótese é que a terapia hormonal com estrogênio (THE) propicia ação estimuladora e consequente modulação de biomarcadores do estado redox hipocampal, promovendo a manutenção de processos mnemônicos, indução de resposta ansiolítica e melhora da marcha no período do envelhecimento. Para testar esta hipótese, analisamos o perfil ansiolítico, memória de reconhecimento, deambulação, biomarcadores oxidativos, atividade e viabilidade celular do LC e HP de ratas Wistar senescentes. Portanto, nosso objetivo foi análise do comportamento cognitivo e funcional de ratas submetidas ou não a THE na fase da periostropausa. Quarenta ratas participaram do estudo, 20 receberam óleo de milho (grupo 21Me/Ve; óleo de milho/0,2mL/sc; 2x/semana) e 20 foram submetidas a THE (grupo 21Me/E₂; 17 β -estradiol/15 μ g/Kg/sc; 2x/semana) por 120 dias. Testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos e deambulação foram realizados imediatamente antes e ao final do período de tratamento. Dos encéfalos decapitados os hipocampus isolados foram destinados a análises bioquímicas, por sua vez, encéfalos perfundidos foram destinados para análises histológicas das regiões CA1, CA3 e GD hipocampais e LC. Animais do Grupo 21Me/E₂ apresentaram tempo total, frequência de entradas significativamente maior nos braços abertos e região central do campo aberto, além de maior locomoção do mesmo em relação ao grupo 21Me/Ve, exibindo perfil ansiolítico em geral. No teste de reconhecimento de objetos, o grupo 21Me/Ve apresentou diminuição na memória

de longo prazo e as ratas do grupo 21Me/E₂ mantiveram-se com mesmo índice como aos 17 meses de idade além de melhor equilíbrio do estado redox hipocampal. Nossos resultados mostraram diminuição no comprimento e maior largura da passada dos animais aos 21 meses de idade, que foi revertido para aqueles que receberam THE, bem como, atuando sobre prevenção à perda celular neuronal. Este estudo fornece evidências da eficácia do THE, mostrando que mudanças significativas ocorrem na etologia, biomecânica e bioquímica cerebral de ratas naturalmente envelhecidas durante a senescência ovariana. Portanto, nossos resultados sugerem que a administração de E₂ exógeno é necessária, especialmente no período de intensa irregularidade do ciclo, para restabelecer as funções realizadas, bem como possibilitar a exploração progressiva da terapia como recurso preventivo para distúrbios neuropsicológicos e distúrbios neurodegenerativos.

Palavras-chave: Envelhecimento. Estrogênio. Hipocampo. Locus Coeruleus.

ABSTRACT

ESPERANÇA, T. D. **Effect of long-term hormone therapy with estrogen on the cognitive and functional behavior of female Wistar rats senescent.** 2023. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP, 2023.

ABSTRACT

Aging results from the gradual functional cellular decline, programmed and dependent on time that all living beings tend to go through. In perimenopause, one of the stages of reproductive aging, the interactions of neurons producing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropins and gonadal steroids, and the activity of neurons in regions such as the locus coeruleus (LC) and hippocampus (HP) can compromise biomarkers of the redox state, leading to behavioral and neuroprotective changes. Our hypothesis is that hormone therapy with estrogen (EHT) provides a stimulating action and consequent modulation of biomarkers of the hippocampal redox state, promoting the maintenance of mnemonic processes, inducing anxiolytic response and improving gait in the aging period. To test this hypothesis, we analyzed the anxiolytic profile, recognition memory, ambulation, oxidative biomarkers, activity and cell viability of LC and HP of senescent Wistar rats. Therefore, we aimed to analyze the cognitive and functional behavior of rats submitted or not to EHT in the periropause phase. Forty female rats participated in the study, 20 were treated with corn oil (group 21Mo/Veh; corn oil/0.2mL/sc; 2x/week) and 20 were submitted to EHT (group 21Mo/E₂; 17 β -estradiol/15 μ g/Kg/sc; 2x/week) for 120 days. Open field, elevated plus maze, object recognition, and ambulation tests were performed immediately before and at the end of the treatment period. The hippocampus was isolated from decapitated brains and destined for biochemical analysis, in turn, perfused brains were destined for histological analysis of the hippocampus CA1, CA3 and GD regions and LC. Animals from the 21Mo/E₂ group showed a significantly higher total time, frequency of entries into the open arms and central region of the open field, in addition to greater locomotion in relation to the 21Me/Ve group, showing an anxiolytic profile in general. In the object recognition test, the 21Mo/Veh group showed a decrease in long-term memory and the rats in the 21Mo/E₂ group maintained the same index as at 17 months of age, in addition to a better balance of the hippocampal

redox state. Our results showed a decrease in the length and greater width of the animals' stride at 21 months of age, which was reversed for those who received EHT, as well as acting on the prevention of neuronal cell loss. This study provides evidence of the efficacy of EHT, showing that significant changes occur in the ethology, biomechanics and brain biochemistry of naturally aged female rats during ovarian senescence. Therefore, our results suggest that the administration of exogenous E₂ is necessary, especially in the cycle's period of intense irregularity, to reestablish the normal functions, as well as to allow the progressive exploration of the therapy as a preventive resource for neuropsychological disorders and neurodegenerative disorders.

Keywords: Aging. Estrogen. Hippocampus. Locus Coeruleus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil hormonal nas fases do ciclo estral de fêmeas de ratos e do ciclo menstrual de mulheres	26
Figura 2 – Neuromarcação de FRA/TH-ir no LC em ratas cíclicas e acíclicas	28/29
Figura 3 – Deposição de lipofuscina no hipocampo de ratas cíclicas e acíclicas	31
Figura 4 – Delineamento experimental esquemático	38
Figura 5 – Aparato utilizado para teste de campo aberto	40
Figura 6 – Aparato utilizado para teste de labirinto em cruz elevado	41
Figura 7 – Teste de reconhecimento de objetos	42
Figura 8 – Teste de deambulação	43
Figura 9 – Material biológico coletado	44
Figura 10 – Coloração do HP e LC com cresil violeta	47/48
Figura 11 – Ciclo estral	50
Figura 12 – Análise temporal do teste de campo aberto	52/53
Figura 13 – Análise etológica do teste de campo aberto	54
Figura 14 – Análise temporal do teste de labirinto em cruz elevado	55
Figura 15 – Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado	56
Figura 16 – Análise etológica do teste de reconhecimento de objetos novos	57/58
Figura 17 – Teste de deambulação	59
Figura 18 – Marcadores do estado redox hipocampal	60
Figura 19 – Quantificação de células Nissl-positivas no HP e LC	61/62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corporal inicial e final de ratas Wistar Ve e E₂

51

LISTA DE SIGLAS

17Me – Grupo dos animais aos 17 meses de idade
18Me – Grupo dos animais aos 18 meses de idade
21Me – Grupo dos animais aos 21 meses de idade
21Me/E₂ – Grupo dos animais aos 21 meses de idade que receberam estradiol
21Me/Ve – Grupo dos animais aos 21 meses de idade que receberam veículo
 α – Alfa
A – Altura
ACh – Acetilcolina
APO – Área Pré-óptica
 β – Beta
BA – Braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado
BF – Braços fechados do teste de labirinto em cruz elevado
BSA – *Bovine serum albumine*
C – Comprimento
°C – Grau Celsius
CA – Califórnia
CA1 – Região 1 do Corno de Amon do hipocampo
CA3 – Região 3 do Corno de Amon do hipocampo
cm – Centímetros
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAT – Catalase
D – Diestro
DA – Doença de Alzheimer
df – Graus de liberdade
DNPH – Dinitrofenilhidrazina
DTNB – Ácido 2-nitrobenzóico
DTPA – Ácido dietilenotriamina pentacético
E – Estro
E₂ – Estradiol
EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*
EO – Estresse oxidativo

EPM – Erro padrão da média
ER α – Receptor alfa de estrogênio
ER β – Receptor beta de estrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
Fe⁺² – Ferroso
FeSO₄ – Sulfato ferroso
FRA/TH-ir – Antígeno relacionado ao fos e tirosina hidroxilase imunorreativos
FRAP – *Ferric reducing antioxidant power*
GD – Giro denteado
GnRH – *Gonadotropin releasing hormone*
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSH – Glutathione
GSSG – GSH oxidado
h – Hora
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
HHG – Eixo hipotálamo hipofisário gonadal
HP – Hipocampo
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC – Iniciação científica
ip – Intraperitoneal
Kg – Quilograma
L – Largura
LC – Locus Coeruleus
LDL – *Low density lipoproteins*
LED – *Light emitting diode*
LH – *Luteinizing hormone*
LTDA – Limitada
LUX – Intensidade luminosa
M – Metaestro
MAPK – Proteína quinase ativadas por mitógeno
MCP – Memória de curto prazo

MDF – *Medium density fiber*
Me – Meses
mg – Miligramas
mg/mL – Miligramas por mililitros
mGluRs – Receptores metabotrópicos de glutamato
min – Minutos
mL – Mililitros
MLP – Memória de longo prazo
mm – Milímetros
mM – miliMol
mmol/L – miliMol por litro
m/v – Porcentagem em concentração
n – Número de animais por grupo
NA – Noradrenalina
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NFkB – Fator nuclear kappa B
nm – Nanômetro
nmol – Nanomol
NTS – Núcleo do Trato Solitário
ONU – Organização das Nações Unidas
Ovx – Ovariectomia/ovariectomizadas
P – Proestro
p – Nível descritivo ou probabilidade de significância
PB – *Phosphate buffer*
PC – Proteína carbonilada
pg – Picograma
pg/mL – Picograma por mililitro
pH – Potencial hidrogênico
PLD – Potenciação de longa duração
PMSF – Fluoreto de fenilmetanossulfonilo
PNAD – Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PT – Proteína total
REs – Receptores de estradiol

rpm – Rotações por minuto

sc – Subcutâneo

SC – Santa Catarina

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

SP – São Paulo

t – Diferença calculada representada em unidades de erro padrão

TAC – Capacidade antioxidante total

TBARs – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

tGSH – GSH reduzido + GSSG oxidado

TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

THE – Terapia Hormonal com Estrogênio

U – Unidade

U/mg – Unidade por miligramas

U/mL – Unidade por mililitros

µg – Microgramas

µg/µL – Microgramas por microlitros

µL – Microlitros

µm – Micrômetros

µmol/g – Micro mol por gramas

µmol/L – Micro mol por litro

Ve – Veículo

vs – Versus

v/v – Porcentagem em volume

WHI – *Women's Health Initiative*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	14
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SIGLAS	18
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Perfil da população idosa.....	25
1.2 Neuroendocrinologia e o envelhecimento feminino	25
1.3 Envelhecimento feminino e funções cognitivas	29
1.4 Hipocampo, locus coeruleus e envelhecimento	32
1.5 Estado redox e envelhecimento.....	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Delineamento experimental	37
3.3 Tratamentos.....	38
3.4 Testes Funcionais e Cognitivos	38
3.4.1 Teste de campo aberto	39
3.4.2 Teste de labirinto em cruz elevada	40
3.4.3 Teste de reconhecimento de objetos.....	41
3.4.4 Teste de deambulação	43
3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido	43
3.6 Eutanásia por decapitação	44

3.6.1	Preparação do homogenato	44
3.6.2	Análise do estado redox hipocampal	45
3.6.2.1	Determinação do dano oxidativo proteico e lipídico	45
3.6.2.2	Determinação da defesa antioxidante não-enzimática	45
3.6.2.3	Determinação da defesa antioxidante enzimática	45
3.7	Eutanásia por perfusão transcardíaca	46
3.7.1	Análise histológica pela coloração de Nissl	47
3.8	Análise Estatística	48
4	RESULTADOS	50
4.1	Parâmetros gerais	50
4.2	Análises Comportamentais	51
4.2.1	Teste de campo aberto	51
4.2.2	Teste do labirinto em cruz elevada	54
4.2.3	Teste de Reconhecimento de objetos.....	57
4.2.4	Teste de Deambulação.....	58
4.3	Análise do estado redox hipocampal	59
4.4	Análise histológica pela coloração de Nissl	60
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A – Comitê de Ética	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Perfil da população idosa

Em todo o mundo, os países estão tendo aumento proporcional no número de idosos na população, estimando-se que mais da metade dos recém-nascidos de hoje completarão 65 anos, vivendo aproximadas duas décadas acima daqueles nascidos na metade do século passado (PIVETTA; ZORZETTO, 2018). Podendo as pessoas viverem esses anos de vida em ambiente favorável e com boa saúde, sua capacidade de fazer as coisas que valorizam será muito próxima à de pessoa mais jovem. No entanto, se esses anos extras forem dominados por declínios na capacidade física e mental, as implicações para os idosos e para a sociedade serão mais negativas. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a população idosa corresponde a 12% da mundial, tendo previsão de duplicar esse quantitativo até 2050 e triplicar em 2100 (TAVARES *et al.*, 2017). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), em 2021 a população idosa superou a marca de 31,2 milhões no Brasil, destes, as mulheres são maioria com 17,4 milhões (55,8%) enquanto que os homens são 13,8 milhões (44,2%), não havendo diferença significativa na tendência desse padrão em 10 anos (IBGE; PNAD, 2022). Esse incremento de pessoas idosas traz consequências socioeconômicas e a incapacidade funcional é problema frequente entre esta população e afeta as atividades diárias comprometendo sua qualidade de vida, com impacto negativo a sua família e ao sistema de saúde.

1.2 Neuroendocrinologia e o envelhecimento feminino

O envelhecimento é o processo natural programado pelo qual todos os organismos vivos tendem a passar, ou seja, é um dos estágios do período da vida. Este período é denominado senescência quando caracterizado por alterações fisiológicas conforme previsto pelo seu código genético, ou senilidade, quando afecções não previstas afetam e debilitam o indivíduo idoso (MORAES *et al.*, 2020). O sistema reprodutor feminino é um dos primeiros a envelhecer, tendo comprometimento de suas funções iniciadas muito antes de outros órgãos, onde esse longo processo caracteriza-se pela passagem paulatinamente de ciclos reprodutivos regulares, para irregulares, seguidos pela aciclicidade e por fim, cessando a fertilidade

(CAMAIONI *et al.*, 2022). Estão disponíveis relatos importantes referentes as ações estrogênicas nos ajustes de vários processos fisiológicos, tanto em tecidos reprodutivos quanto não-reprodutivos, como também sua atuação na mediação da sinalização intracelular por meio da ligação aos seus receptores ER α e ER β (SINGH; PARAMANIK, 2022). A integridade do eixo reprodutivo (hipotálamo hipofisário gonadal – HHG) em fêmeas de roedores e nas mulheres resulta da ritmicidade do ciclo durante o período reprodutivo, conforme mostra a Figura 1.

Perfil hormonal nas fases do ciclo estral de fêmeas de ratos e do ciclo menstrual de mulheres

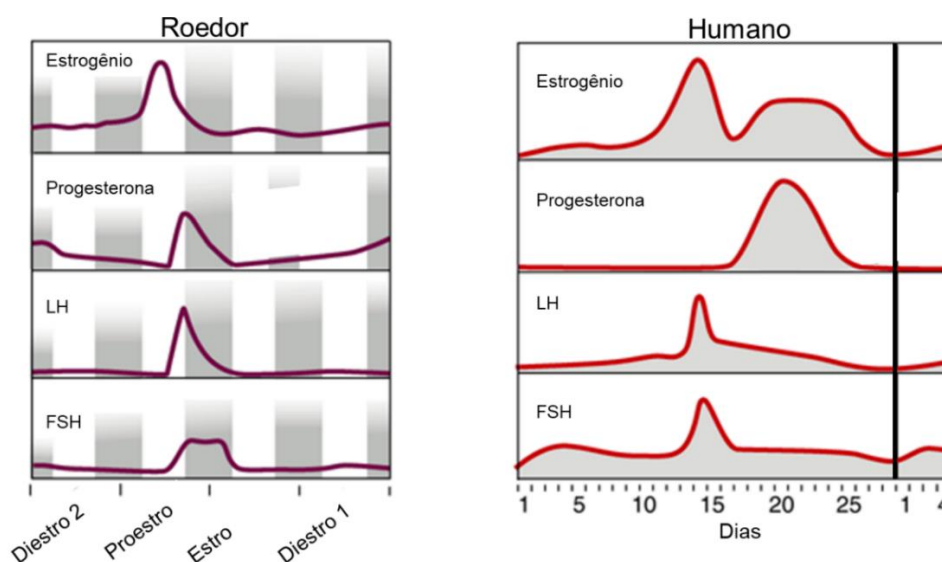


FIGURA 1 - Perfil do hormônio luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), estrogênio e progesterona nas fases do ciclo estral de fêmeas de ratos e do ciclo menstrual de mulheres. Fonte: Modificado de Staley e Scharfman (2005).

O ciclo estral da rata, com duração aproximada de cinco dias, subdivide-se em fases específicas: metaestro (6 a 8h) e diestro (55 a 57h), caracterizados como período de secreção, com significativa concentração plasmáticas de progesterona (P₄), presença de leucócitos e células nucleadas detectadas no esfregaço vaginal. Já as fases de proestro (12 a 14h) e estro (24 a 27h) caracterizam-se como o período de proliferação, com significativa concentração plasmática de estradiol (E₂) e ocorrência da concentração plasmática máxima (pico pré-ovulatório) do hormônio luteinizante (LH) - etapa fértil do animal. Nestas fases há grande quantidade de células nucleadas no proestro e cornificadas no estro. As sincronizações destas fases são reguladas e moduladas determinando período reprodutivo (WESTWOOD, 2008).

É importante ressaltar que alterações na função ovariana com redução na quantidade de folículos ovarianos, declínio na secreção de estrogênio e progesterona contribuem para a manifestação de alterações relacionadas ao envelhecimento tanto à nível corporal quanto cerebral (ZÁRATE; STEVNSNER; GREDILLA, 2017; CHAKRABORTY; GORE, 2004). A irregularidade do ciclo é indicador confiável de fecundidade irregular e senescência reprodutiva iminente, caracterizando o período de periostropausa (roedores) ou perimenopausa (humanos) (FINCH, 2014; BRINTON, 2012). De acordo com Clemens e Bennet (1977) a interrupção na ritmicidade do ciclo estral de ratas aparenta ter origem hipotalâmica já que a ciclicidade pode reaparecer quando seus ovários são transplantados para outros animais com ciclo estral regular. O menor conteúdo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no período de irregularidade no ciclo estral foi inicialmente relacionado com possível redução no número dos neurônios produtores de GnRH (RUBIN; LEE; KING, 1994), entretanto, estudos relatam que a quantidade de neurônios GnRH e do neurohormônio no hipotálamo não se altera no início da senescência reprodutiva, mas que o déficit nesse processo ocorre pelas vias aferentes responsáveis pela regulação, síntese e secreção de GnRH (WIERMAN; KISELJAK-VASSILIADES; TOBET, 2011; YIN; GORE, 2006). Notadamente, ciclos regulares a irregulares e acíclicos caracterizam a senescência reprodutiva (BRINTON, 2012; FINCH *et al.*, 1984), período importante para medidas preventivas e promoção da saúde (FALCONI, 2017), pois sabe-se que na transição da perimenopausa para a pós-menopausa doenças ameaçam a integridade do organismo feminino, por exemplo, osteoporose e sarcopenia (HAO *et al.*, 2022; GRECO *et al.*, 2019), doenças cardiovasculares (SERVIENTE *et al.*, 2016) e neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer (DA) (SCHEYER *et al.*, 2018; WNUK *et al.*, 2023).

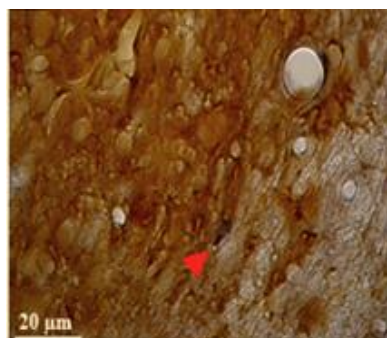
Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa (Biologia do Envelhecimento – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)) analisaram as alterações envolvidas no eixo HHG e evidenciaram que, no período da periostropausa de ratas Wistar, o conteúdo de GnRH, noradrenalina (NA) e a concentração plasmática de LH está reduzido e invariável nos horários analisados (10, 14 e 18 h), quando comparado com o diestro em animais adultos. Também foi verificado maior atividade dos neurônios noradrenérgicos da área pré-óptica (APO) e locus coeruleus (LC) bem como concentrações plasmáticas variáveis de E₂ e P₄ nos animais mais velhos (NICOLA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015). Ressaltamos

então a importância do sincronismo e sistematização dos neurotransmissores para a liberação de GnRH e ritmicidade do ciclo estral (MAGGI *et al.*, 2016; BRONZI *et al.*, 2015). LC é a matriz fundamental de NA para o cérebro, cujo feixe noradrenérgico segue para locais do sistema nervoso central (SNC) onde há síntese de GnRH e participa na sistematização das funções reprodutivas (MERCAN; HENEKA, 2022; STOPA *et al.*, 2021). Entre os neurotransmissores, a NA executa função significativa no eixo HHG de várias espécies (HERBISON, 1997), atuando na antecipação e ampliação do pico e secreção de LH, contudo, sua atuação diminui com o envelhecimento (MATHER, 2021; NICOLA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015). Ademais, estudos evidenciaram ER α e ER β em neurônios noradrenérgicos, sugerindo que NA é sensível às diferentes concentrações dos esteroides ovarianos plasmáticos (BRISKI; ALI; NAPIT, 2020; PEREIRA *et al.*, 2010; HOSNY; JENNES, 1998).

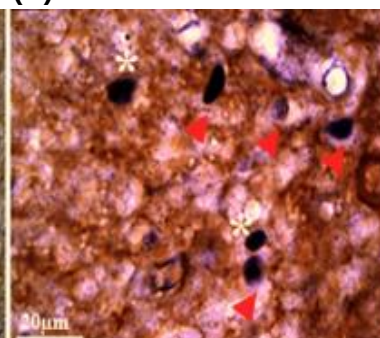
Em 2003, Martins-Afféri e colaboradores realizaram estudo e verificaram redução nos níveis de NA, tanto no hipotálamo quanto na APO, reprimindo o pico pré-ovulatório de LH após as lesões no LC, evidenciando a cooperação dos neurônios noradrenérgicos do LC no acionamento dos neurônios GnRH durante o período reprodutivo. Nosso grupo analisou atividade de neurônios na APO e LC de ratas cíclicas e ratas com irregularidade (periestropausa) no ciclo estral, em diestro. Os resultados mostraram nível mais alto de atividade dos neurônios na APO e NA no LC em ratas com ciclo estral irregular (Figura 2), menor capacidade de síntese e armazenamento de neurotransmissores e GnRH. Esses resultados sugerem comprometimento da sinalização necessária para a ocorrência de secreção máxima de LH e ovulação subsequente, caracterizando o processo de senescência reprodutiva em fêmeas de roedores (NICOLA *et al.*, 2016).

Neuromarcação de FRA/TH-ir no LC em ratas cíclicas e acíclicas

(A)



(B)



(C)

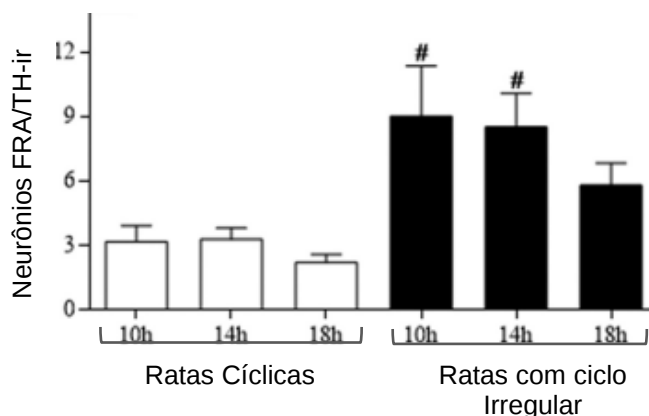


FIGURA 2 – Fotomicrografias de neurônios marcados de antígeno relacionado ao *fos* e tirosina hidroxilase imunorreativos (FRA/TH-ir) no LC de ratas cíclicas (a) e com irregularidade no ciclo estral (b) na fase do diestro. * indica neurônios com dupla marcação (TH no citoplasma; FRA no núcleo) e as setas indicam marcação para FRA. O gráfico (c) representa a atividade neuronal no LC verificada nas ratas cíclicas e com irregularidade estral. [#] $p < 0,05$ vs ratas cíclicas no mesmo intervalo de tempo. (Modificado de Nicola *et al.*, 2016).

Portanto, a importância da atividade das células neuronais do LC está bem caracterizada para manutenção da ritmicidade do eixo HHG bem como a atuação moduladora do estrogênio. Entretanto, precisa ser compreendido também como a reorganização das atividades neurais mediante a menor concentração plasmática do hormônio esteroidal ocorre, bem como, se há alterações no sistema antioxidante e estas alterações comprometem as atuações neurais na região do hipocampo (HP).

Relatos evidenciam que LC é um dos primeiros núcleos a apresentar redução no número de células neurais em pacientes com DA (JAMES *et al.*, 2020). Entretanto, os mecanismos envolvidos na neurodegeneração do LC ainda não estão esclarecidos, porém, o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante pode resultar em lesão oxidativa nas células neurais do LC (EVANS; DEFENSOR; SHAMLOO, 2022; WANG *et al.*, 2020; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984) e exercer atuação importante para os danos neurodegenerativos.

1.3 Envelhecimento feminino e funções cognitivas

No período da perimenopausa, aparecem sintomas além daqueles associados à reprodução, como sintomas neurológicos, entre os quais alterações hipotalâmicas às funções executivas são indicativas de interrupção em vários sistemas regulados por estrogênio (MISHRA *et al.*, 2022). Mudanças psicológicas significantes também podem ocorrer além dos sintomas somáticos, seja na perimenopausa ou pós-

menopausa, cujos riscos para depressão e ansiedade sejam mais incidentes na perimenopausa (HERSON; KULKARNI, 2022). Entre as terapias utilizadas na clínica médica no período do climatério e com propriedades para amenizar os efeitos advindos com a formação de radicais livres, destacamos a terapia hormonal com estrogênio (THE), que desde a década de 60 é assunto de grandes discussões e estudos. Pesquisas mais atuais, realizados em animais, evidenciaram que essa terapia pode prevenir doença coronariana (MA *et al.*, 2022), evitar diminuição de massa óssea (XU *et al.*, 2020) e também prevenir a demência (KOEBELE *et al.*, 2020), bem como, estudos mostram os mesmos benefícios nas mulheres (HENES; HUEBNER, 2020). Em relação a estrutura neuronal, foi demonstrado diminuição acentuada no número de neurônios positivos para ER α e ER β no HP de organismo com menor concentração plasmática de estrogênio (BEAN; LANOV; FOSTER, 2014). Estes autores detectaram declínio de 56% de ER α e 41% de ER β em neurônios na área CA1 hipocampal no período da senescência. Portanto, está evidenciado que as células do HP apresentam receptores para estrogênio e são suscetíveis a modulações desencadeadas pelas flutuações dos níveis de estrogênio na senescência reprodutiva, regulando a expressão de proteínas pré e pós-sinápticas hipocampais em roedores, implicando diretamente na cognição (VIEIRA *et al.*, 2023).

Importante relacionar a atuação do HP na aprendizagem espacial e memória. O reconhecimento envolve informações que possuem componentes espaciais ou associativos, ou seja, a capacidade de familiarizar e lembrar determinado estímulo visual que ocorre em uma determinada posição espacial (BROWN; AGGLETON, 2001). Dentre as alterações ocorridas neste processo, a comumente observada é a alteração nas propriedades de plasticidade sináptica em diferentes circuitos sinápticos dentro do HP (SHETTY; SAJIKUMAR, 2017). HP atua também na regulação das emoções, medo, estresse e ansiedade, funções que podem ser alteradas durante o processo de envelhecimento (BARTSCH *et al.*, 2015; ANAND; DHIKA, 2012). Por sua vez, transtornos como ansiedade acometem duas vezes mais o público feminino, sugerindo que as flutuações dos hormônios ovarianos contribuem sobre a ansiedade em mulheres (PESTANA; KERSHAW; GRAHAM, 2023). Pesquisas já correlacionaram que o comportamento ansioso aumenta nas fases onde há baixa concentração de E₂ e P₄ do ciclo estral de ratas (metaestro e diestro) quando comparado as fases de altas concentrações de E₂ e P₄ (proestro) (PESTANA *et al.*, 2022; LOVICK; ZANGROSSI-Jr, 2021).

Estudo realizado pela autora deste projeto analisou a quantidade de deposição de lipofuscina (cuja deposição na região perinuclear do citoplasma celular pode ser marcador do envelhecimento) na área de CA3 hipocampal de ratas com 6, 18 e 30 meses após cortes histológicos e coloração Oil Red (Figura 3 A à D), tendo como resultado, aumento significativo de lipofuscina em ratas com 30 meses quando comparado às ratas de 6 meses (Figura 3D), possivelmente devido à irregularidades ocorridas no período do envelhecimento. Esses resultados evidenciam que quanto maior a concentração de lipofuscina presente, mais velha a célula é, colaborando também com aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e possível ocorrência de doenças neurodegenerativas (OTT *et al.*, 2007).

Deposição de lipofuscina no hipocampo de ratas cíclicas e acíclicas

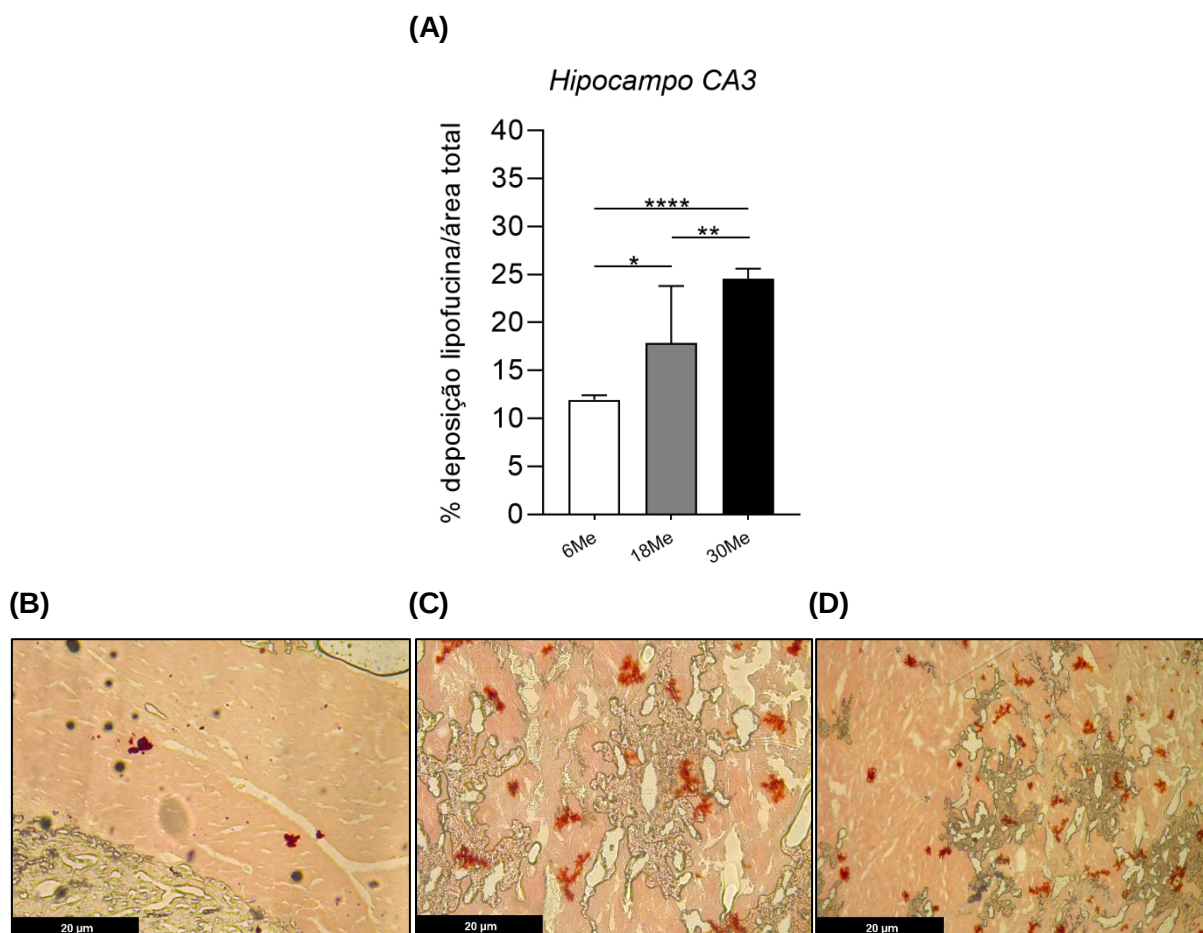


FIGURA 3 – Cortes histológicos (12 µm) realizados em criostato do hemisfério esquerdo, seguindo o decorrer da extensão hipocampal (B) ratas de 6 meses, (C) ratas de 18 meses e (D) ratas de 30 meses submetidas à coloração de *oil red* para demarcação de lipofuscina. O gráfico (A) representa a porcentagem média de deposição de lipofuscina conforme a área de CA3 analisada em ratas cíclicas, periostropausadas e acíclicas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. (Autor: Thainá D. Esperança; IC/2019).

1.4 Hipocampo, locus coeruleus e envelhecimento

Senescência feminina associa-se ao declínio progressivo na concentração plasmática de estrogênio, afetando inúmeros tecidos e produzindo variedade de sinais e sintomas, como doenças cardíacas coronárias, fraturas de quadril, além de maior risco de comprometimento cognitivo, depressão e ansiedade (YU *et al.*, 2022; ATSMAS *et al.*, 2006; ROCCA *et al.*, 2006). O desenvolvimento de certas doenças neuropsiquiátricas, como transtornos de ansiedade e depressão, pode ser causado por comprometimento na neurogênese adulta. É importante ressaltar que o comprometimento da neurogênese hipocampal pode contribuir para os déficits cognitivos observados na depressão (AIMONE *et al.*, 2014) e ansiedade, bem como, déficits na neurotransmissão implicam-se na contribuição etiológica da ansiedade patológica e em diversos transtornos do humor (EARNHEART *et al.*, 2007), sendo estes, fatores associados considerados contribuintes na etiologia da DA (GAO *et al.*, 2013; BURTON *et al.*, 2012). O HP é estrutura cerebral onde foram evidenciadas formas de plasticidade sináptica, incluindo a potenciação de longa duração (PLD) que ocorre na consolidação de memórias (IZQUIERDO *et al.*, 2006) no circuito hipocampal: CA1 – Subículo – Córtex Entorrinal – Giro Denteado (GD) – CA3 – CA1, cujas projeções neuronais noradrenérgicas do LC também contribuem para formação e consolidação da memória. Em consequência, situações de degeneração progressiva dos neurônios noradrenérgicos e inervações do LC podem afetar os processos cognitivos, correlacionando-se à incidência na DA (JAMES *et al.*, 2020). Além disso, a distribuição da inervação noradrenérgica oriunda do tronco encefálico e a disponibilidade do neurotransmissor, determinam a atuação deste neuromediador no sistema (MADISON; NICOLL, 1986). Portanto, o sistema de projeção eferente do LC-noradrenérgico provê NA para o SNC e está envolvido nos comportamentos do sono/vigília, atenção e memória durante tarefas cognitivas e resposta ao estresse (SARA, 2009; BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003), logo, alterações na neurotransmissão noradrenérgica do LC pode favorecer déficits de memória e comportamento cognitivo (ROSENZWEIG; BARNES, 2003).

1.5 Estado redox e envelhecimento

Devido a natureza multifatorial do período de transição que ocorre na perimenopausa, pequenos distúrbios, de origem endógena ou exógena, no processo

de reestruturação podem induzir diretamente vulnerabilidades ou desmascará-las (BRINTON *et al.*, 2015). Dessa forma, as alterações na secreção de estrogênio contribuem para oscilação do sistema antioxidante e instalação de doenças durante o envelhecimento, pois o estrogênio é antioxidante natural com efeitos diretos e indiretos, enzimáticos ou não, na redução de EROs (BOURGONJE *et al.*, 2020). O E₂ possui um anel fenol-hidroxila, sendo este quem doa hidrogênio, permitindo que o E₂ exclua as principais fontes de produção de EROs, como NADPH oxidase, LDL oxidada e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), afim de aumentar defesas antioxidantes mitocondriais e intracelulares (MOREAU *et al.*, 2020). A produção de oxidante pelas mitocôndrias é menor nas mulheres devido à ação de estrogênios que regulam positivamente a expressão de enzimas antioxidantes, pois ele reduz produção de peróxido e dano oxidativo ao DNA mitocondrial, como em mitocôndrias cerebrais sinápticas e não sinápticas, podendo acarretar no desequilíbrio desse sistema levando ao estresse oxidativo (EO) (NILSEN, 2008). Este aumento de EO está envolvido na patogênese de variadas doenças neurodegenerativas, como a DA, onde há comprometimento da sinaptogênese em regiões corticais e hipocampais, e está correlacionado com perda cognitiva e neurodegeneração (KIM *et al.*, 2015; McEWEN *et al.*, 2012). Os genes nucleares das enzimas antioxidantes são direcionados às mitocôndrias, ou seja, além da estrutura química fenólica, a ação antioxidante dos estrogênios *in vivo* se deve à interação do receptor nas células que ativa as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e o fator nuclear kappa B (NFκB), levando a regulação positiva da expressão gênica de SOD e GPx (VINÃ *et al.*, 2006; BORRÁS *et al.*, 2005).

Devido às importantes ações do esteroide gonadal na manutenção das funções fisiológicas e as alterações no organismo feminino após a diminuição da concentração plasmática de E₂, no presente estudo propusemos analisar a atividade neuronal no HP e LC após terapia hormonal de longa duração com estrogênio, bem como seus efeitos no perfil ansiolítico, deambulação, memória de reconhecimento e estado redox hipocampal no período da periostropausa de ratas Wistar. Nossa hipótese central é que a THE propicia ação estimuladora e consequente modulação de biomarcadores do estado redox hipocampal, promovendo a manutenção de processos mnemônicos, indução de resposta ansiolítica e melhora da marcha no envelhecimento de ratas senescentes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as funções cognitivas, aspectos emocionais e o estado redox do HP de ratas na periostropausa bem como avaliar os efeitos da terapia hormonal com estrogênio como estratégia *para minimizar os déficits* na senescência biológica.

2.2 Objetivos específicos

A partir da caracterização de modelo para estudo fisiológico do envelhecimento serão realizadas:

- Avaliação comportamental (ansiedade) das ratas no período da periostropausa e os possíveis efeitos da THE;
- Avaliar memória de reconhecimento das ratas no período da periostropausa e os possíveis efeitos da THE;
- Avaliação funcional da marcha das ratas no período da periostropausa e os possíveis efeitos da THE;
- Avaliar a THE no período da periostropausa sobre possível modulação no sistema antioxidante;
- Avaliar a THE no período da periostropausa na viabilidade neuronal no HP e LC.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório e pelas diretrizes do Comitê Institucional Local de Uso de Cuidados com Animais para garantir que o sofrimento e número de animais fosse reduzido ao mínimo (processo 0850-2021). Ratas Wistar (n = 40), híginas, múltíparas e com irregularidade do ciclo estral, foram mantidas em ambiente controlado (22°C ± 2°C; ciclo de luz 12/12 h invertido; umidade 55% ± 10%) com acesso à água e ração *ad libitum* (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP – Brasil). Apenas animais (17 meses) com ciclo estral irregular, em diestro persistente (NICOLA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015) foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n = 20/grupo): 21Me/Ve (veículo/óleo de milho) e 21Me/E₂ (estradiol) (Figura 4).

3.2 Delineamento experimental

Neste estudo investigamos os efeitos da THE realizada no período da periostropausa de ratas Wistar. No 17º mês das ratas, foi realizada análise da citologia vaginal (LONG e EVANS, 1922) para inclusão dos animais que apresentaram ciclo estral irregular, caracterizando o período da periostropausa. Em seguida, as ratas inclusas no estudo foram submetidas aos testes funcionais iniciais (campo aberto, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos e deambulação). Após os testes, foi realizada a distribuição dos animais nos grupos experimentais e a realização das terapias no período compreendido entre o 18º e 21º mês dos animais. Os animais do grupo 21Me/Ve receberam injeções do veículo (óleo de milho) e os animais do grupo 21Me/E₂ receberam 17β-estradiol. Ao final das terapias, todos os animais foram submetidos aos testes funcionais finais e eutanasiados 24 horas após o último teste, conforme apresentado na figura 4.

Delineamento experimental esquemático

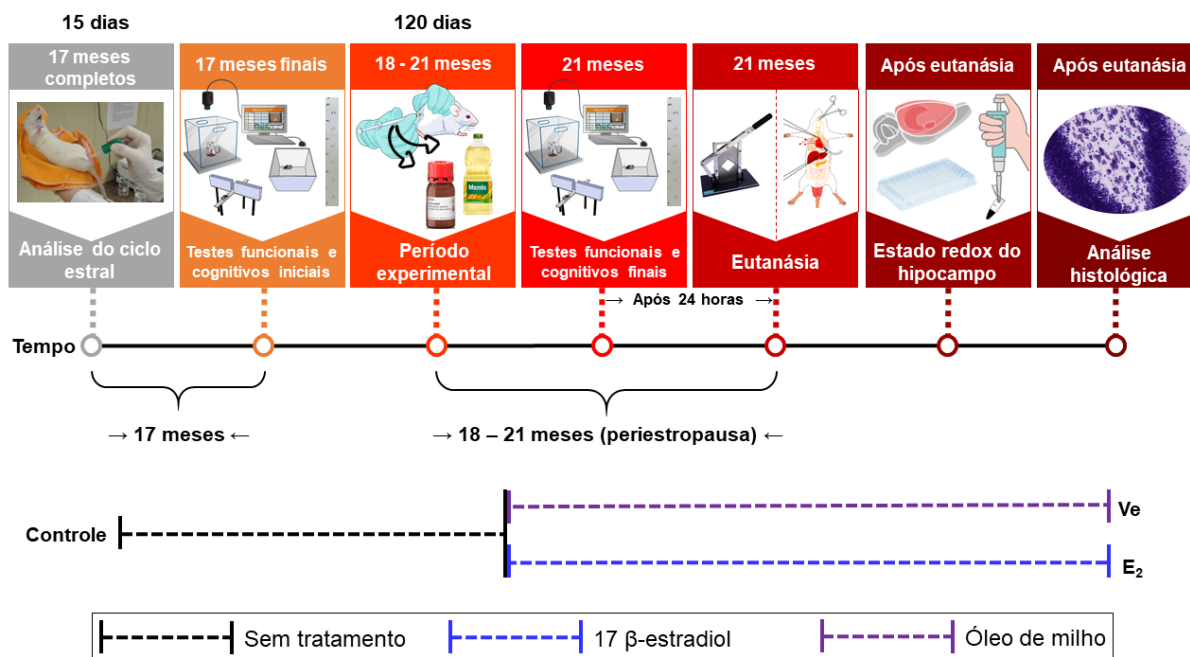


FIGURA 4 – Delineamento experimental esquemático. Ratas Wistar (17 meses) foram submetidas à análise da citologia vaginal, por duas semanas. Em seguida, as ratas com ciclo estral irregular realizaram os testes funcionais iniciais (campo aberto, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos e deambulação). No período do 18º ao 21º mês, os animais do grupo 21Me/Ve receberam veículo (óleo de milho) e do grupo 21Me/E₂ receberam 17β-estradiol (E₂). Ao final das terapias todos os animais realizaram os testes funcionais finais e foram eutanasiados 24 horas após o último teste. Material biológico foi coletado e armazenado para as análises bioquímicas e histológicas. Linha tracejada: preta = sem tratamento; roxa = Ve; azul = E₂.

3.3 Tratamentos

Após testes funcionais e cognitivos iniciais, os animais com 18 meses receberam a terapia com veículo ou estradiol (adaptado de MAROSI *et al.*, 2012). Os animais receberam 2 injeções de óleo de milho (Mazola®, Mairinque, SP – Brasil; 0,2 mL/rata/sc; grupo 21Me/Ve) ou de 17β-estradiol (Sigma®; 15 µg/kg/sc; grupo 21Me/E₂) por semana durante 120 dias.

3.4 Testes Funcionais e Cognitivos

Todos os testes foram realizados no período da manhã, na fase escura do ciclo de luz invertido, pois este é o período em que os animais apresentam maior atividade motora. Os testes foram realizados em sala livre de ruídos, com temperatura e umidade controladas (22 ± 2°C, 55 ± 10%), e iluminada por lâmpadas *light emitting diode* (LED) vermelha (ambiente com brilho abaixo de 1 LUX). A ordem dos testes foi sempre a mesma (reconhecimento de objetos novos, campo aberto, labirinto em cruz

elevado e deambulação). Partindo da premissa de que o teste de reconhecimento de objetos perdurou cinco dias devido aos intervalos, os demais testes foram alocados nas vagas do cronograma, sempre seguindo a ordem indicada inicialmente. As filmagens foram realizadas com câmeras instaladas sobre os aparatos, possibilitando captura total das imagens e registro dos animais nos diferentes testes realizados. Cada aparato foi limpo com solução de etanol após cada teste realizado com o animal. Os resultados de campo aberto, labirinto em cruz elevado e reconhecimento de objetos foram analisados pelo software EthoWatcher® (CRISPIM-JUNIOR *et al.*, 2012; Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil). O resultado do teste de deambulação foi mensurado com auxílio de paquímetro. Os aparatos utilizados nos testes de campo aberto, labirinto em cruz e deambulação foram confeccionados com material fibra de média densidade (MDF) revestido com fórmica preta, enquanto para reconhecimento do objeto novo foi utilizada caixa organizadora de polipropileno preta (capacidade: 60 litros; dimensão: 59 cm x 38,5 cm x 35 cm; C-L-A, respectivamente). Todos os dados foram obtidos antes (17 meses de idade) e ao final do período experimental (21 meses de idade).

3.4.1 Teste de campo aberto

As atividades locomotora e exploratória dos animais foram avaliadas pelo teste de campo aberto em condições similares as que os animais encontraram em seu *habitat* no biotério (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; CRUSIO, SCHWEGLER, ABEELEN, 1989). O aparelho consiste em caixa de MDF com fórmica preta cercada por paredes pretas (40 cm de A), com base de 100 cm x 100 cm, dividida por linhas brancas em 25 quadrados de 20 cm x 20 cm (Figura 5). Em seguida, os animais, individualmente, foram colocados na caixa e os seguintes comportamentos foram registrados por 5 min: variáveis temporais - tempo gasto na periferia (adjacente às paredes), tempo gasto na região central (além das paredes), frequência de entrada no centro, índice de tigmotaxia, que se refere a propensão do animal em deambular pelos cantos da arena (calculado pela porcentagem da permanência do animal nos quadrantes laterais em razão do tempo total do teste) e número de quadrantes percorridos na periferia e centro do aparato; variáveis etológicas – frequência de exploração vertical (quando o animal fica apoiado somente nas patas traseiras e se eleva para explorar o ambiente) e de autolimpeza (ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras).

Aparato utilizado para teste de campo aberto

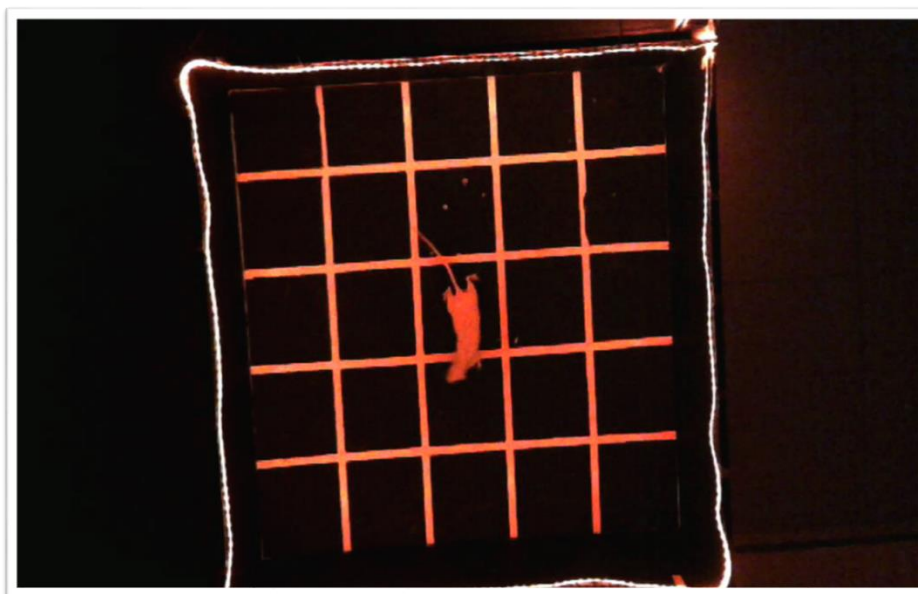


FIGURA 5 – Aparato utilizado para teste de campo aberto. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.4.2 Teste de labirinto em cruz elevada

O labirinto em cruz elevada é modelo bastante usado para avaliar o comportamento do tipo ansioso em ratos, baseando-se em respostas incondicionadas frente a ambientes que podem apresentar perigo em potencial (RODGERS; DALVI, 1997; MONTGOMERY, 1955). Este teste foi realizado no aparato (Figura 6) feito em MDF revestido com fórmica preta e com quatro braços com as mesmas dimensões de (50 cm x 10 cm) dispostos na forma de cruz. Os braços partem do quadrado central (10 cm x 10 cm) e são elevados à 50 cm acima do chão. Dois braços opostos são abertos (sem nenhuma proteção), enquanto os outros dois são braços fechados por paredes de MDF de 40 cm de altura. Cada animal foi gentilmente colocado no quadrado central podendo explorar livremente o labirinto por 5 min, sendo os comportamentos registrados: variáveis temporais – tempo de permanência nos braços abertos (BA), nos braços fechados (BF) e a frequência de entradas nos BA; variáveis etológicas - frequência de exploração vertical, autolimpeza e imersão da cabeça (ocorre quando o animal está no BA, com a cabeça posicionada fora e abaixo do nível do BA).

Aparato utilizado para teste de labirinto em cruz elevado

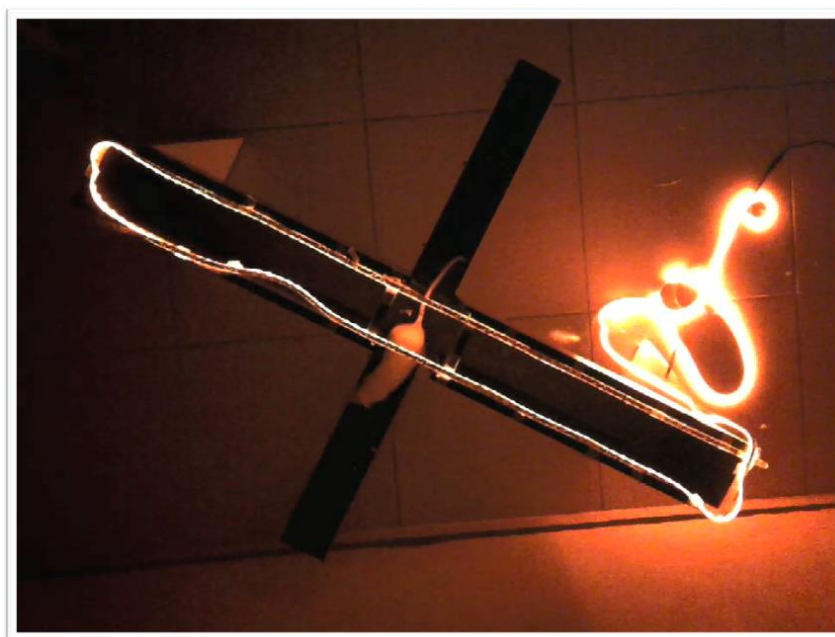


FIGURA 6 – Aparato utilizado para teste de labirinto em cruz. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.4.3 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos é aplicado afim de avaliar a retenção de memória de trabalho de curto e longo prazo (MCP e MLP, respectivamente) (BOTTON *et al.*, 2010; GASKIN *et al.*, 2010; ENNACEUR; DECALOUR, 1988). O teste consistiu em 3 sessões de ambientação, seguidas de mais 3 sessões do teste propriamente dito. Para a ambientação, os animais foram expostos à arena (caixa de polipropileno) sem a presença de objetos, em sessões de 15 minutos cada, com intervalo de 24 horas entre as sessões (Figura 7A). Vinte e quatro horas após a última exposição de ambientação, os animais foram expostos novamente à arena para a sessão de treino, com a inserção dos objetos. Para o teste em geral, os objetos selecionados eram de tamanho adequado, inodoros, com diferentes texturas e cores e não eram móveis. Os objetos utilizados neste estudo foram 2 tampas de tubo de falcon amarelo e material plástico (objetos A); 1 mini copo de alumínio rosa (objeto B); e 1 mini pote de porcelana branca (objeto C), todos fixados com fita adesiva e dispostos paralelamente entre si de acordo com seu uso. No treino, foram inseridos os dois objetos idênticos (ficando A+A) e permitiu-se a exploração destes por 15 min (Figura 7B). Após 3h do treino, os animais foram novamente expostos à arena (Teste 1 – para avaliar MCP) desta vez, com um objeto A sendo mantido enquanto o outro foi substituído pelo objeto B (ficando A+B) para a exploração destes por 15 min (Figura 7C). Por fim, 24h após o treino, os

animais foram expostos à arena para o teste 2 (avaliação do MLP), que consistiu na substituição do objeto B por um novo objeto C (A+C), permitindo que fossem explorados por 5 min (Figura 7D). A exploração foi considerada o ato de cheirar e/ou tocar objetos com o nariz e/ou patas dianteiras. Medimos o tempo total de exploração do objeto A durante o treino. Nos testes 1 e 2, o índice de reconhecimento foi analisado calculando-se o tempo gasto explorando os novos objetos B ou C dividido pelo tempo total de exploração dos objetos. Após cada animal, os objetos foram limpos com etanol 70% para garantir a ausência de pistas olfativas.

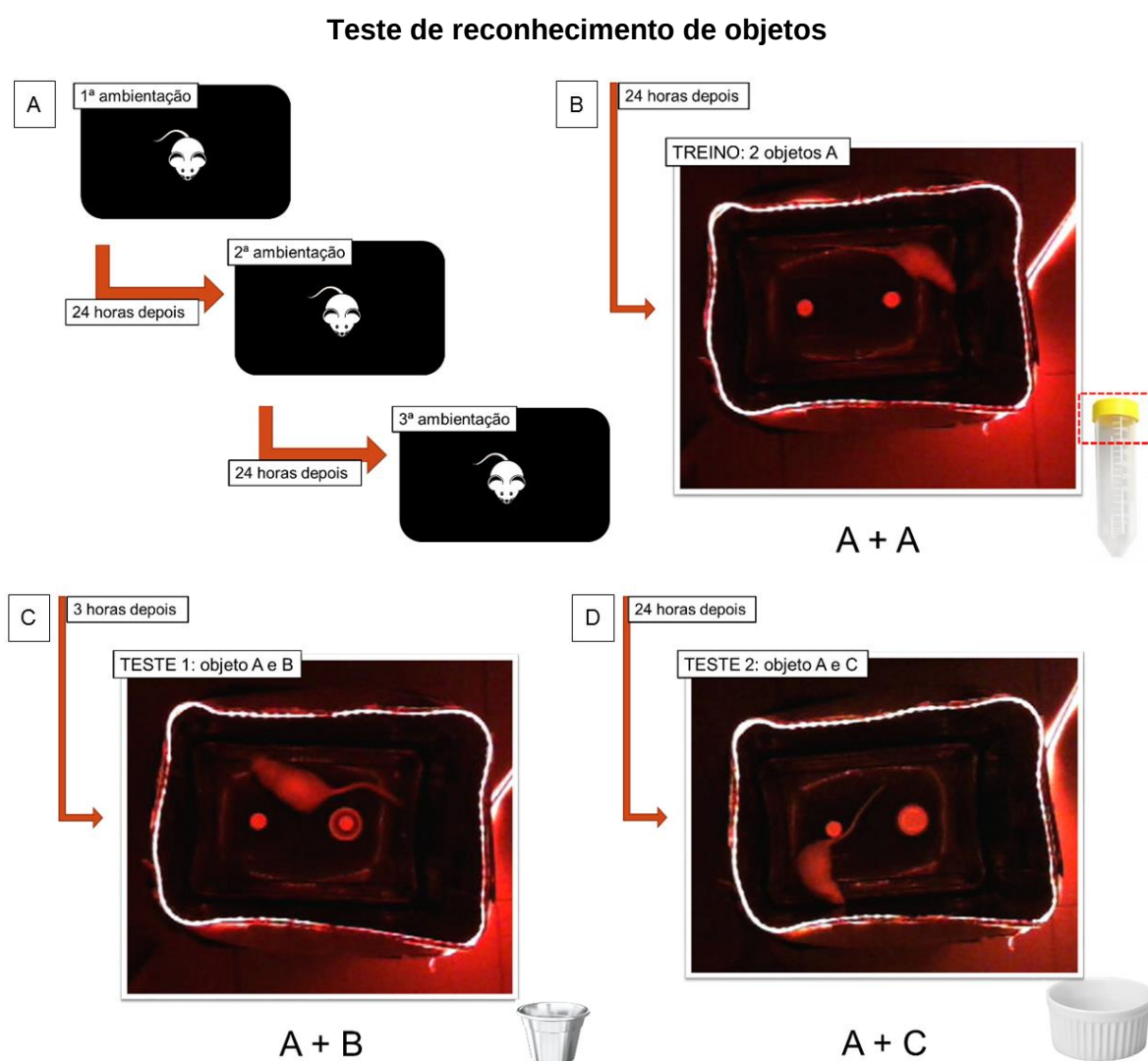


FIGURA 7 – Teste de reconhecimento de objetos. (A) três sessões de ambientação subsequentes após 24 horas cada; (B) treino realizado 24 horas após última ambientação com objetos A+A; (C) teste 1 realizado 3 horas após treino com objetos A+B; (D) teste 2 realizado 24 horas após teste 1 com objetos A+C. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.4.4 Teste de deambulação

O teste de deambulação fornece informações sobre medidas do comprimento da passada e largura da base, fornecendo informações sobre a marcha do animal e reflete o estado funcional (BYTYÇI; HENEIN, 2021). Neste teste, cada animal foi posicionado no início do aparato que consiste em caixa retangular de MDF (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) onde caminharam por três tentativas (Figura 8A). Em seguida, suas patas traseiras foram colocadas em contato com tinta preta atóxica (guache) e as patas dianteiras com tinta marrom (mesmas especificações), onde novamente caminharam pelo aparelho, agora marcando suas pegadas (Figura 8B). Em seguida, foram medidos a largura e o comprimento da passada com auxílio de paquímetro.



FIGURA 8 – Teste de deambulação. (A) aparato utilizado para realização do teste; (B) tira de papel sobre o qual os animais caminharam com as patas pintadas para as marcações das passadas. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido

Os animais foram submetidos à dois modos de eutanásia, decapitação e perfusão transcardíaca, todos realizados no período da manhã (8h às 11h – ciclo escuro) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano.

3.6 Eutanásia por decapitação

Os encéfalos foram removidos rapidamente e ficaram por, aproximadamente, 1 minuto sobre superfície metálica resfriada em gelo (Figura 9A), a fim de evitar a degradação de proteínas. Em seguida, os encéfalos foram seccionados sagitalmente (Figura 9B) e os hipocampus foram dissecados (Figura 9C), submersos em tampão fosfato (50 mmol/L pH 7,4) para remover o excesso de sangue superficial e armazenados a -80°C para posteriores análises do estado redox hipocampal.

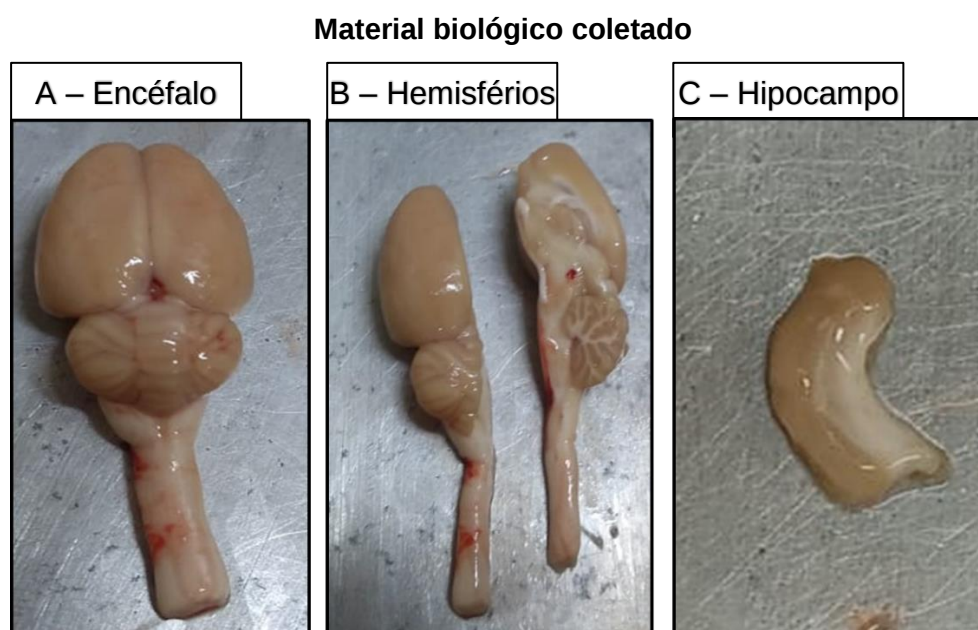


FIGURA 9 – Fotos tiradas no momento da coleta do material biológico. (A) encéfalo; (B) corte sagital do encéfalo, separando os hemisférios D e E; (C) HP dissecado. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.6.1 Preparação do homogenato

No dia da análise bioquímica, os hipocampus isolados foram descongelados em gelo e lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%, m/v). O homogeneizador Potter- Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP – Brasil) foi utilizado para preparar homogenatos dos hipocampus 10% em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X-100, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 10 mmol/L e fluoreto de fenilmetanossulfonilo 2 mmol/L (PMSF). Os homogenatos foram centrifugados (Eppendorf R 5810; Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -80°C por menos de 2 semanas até as análises de estado redox – proteína total (PT), proteína carbonilada (PC),

espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARs), capacidade antioxidante total não enzimática (TAC) por redução de ferro (FRAP), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); os sobrenadantes utilizados para a determinação total de glutathione reduzida (GSH) foram preparados em 5% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) contendo 2 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentaacético (EDTA), centrifugados a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. Para conteúdo de proteínas, amostra de albumina de soro bovino (BSA) (1 mg/mL) foi utilizada como padrão (HARTREE, 1972; LOWRY *et al.*, 1951), onde as absorbâncias foram lidas em 660 nm e os resultados expressos em µg/µL.

3.6.2 Análise do estado redox hipocampal

3.6.2.1 Determinação do dano oxidativo proteico e lipídico

A concentração de PC foi quantificada (450 nm) pelo método alcalino 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA *et al.*, 2014). O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração de TBARs (532 nm) (BUEGE; AUST, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.6.2.2 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática

A TAC foi determinada espectrofotometricamente (593 nm) por meio da capacidade de redução férrica do plasma (FRAP), conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram calculados utilizando curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 . A concentração de GSH foi medida usando 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Beutler e colaboradores (1963). A quantidade de GSH foi determinada pelo coeficiente de extinção molar conhecido de GSH ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Subsequentemente, a mistura foi agitada em vórtex e a absorbância foi medida a 412 nm para detectar o teor de GSH. Os níveis de GSH foram expressos por grama de proteína total.

3.6.2.3 Determinação da defesa antioxidante enzimática

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão

Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades da atividade da enzima foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H_2O_2 por 1 minuto.

A atividade da GPx foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase (GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida sódica, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida sódica foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma curva em U da atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7 Eutanásia por perfusão transcardíaca

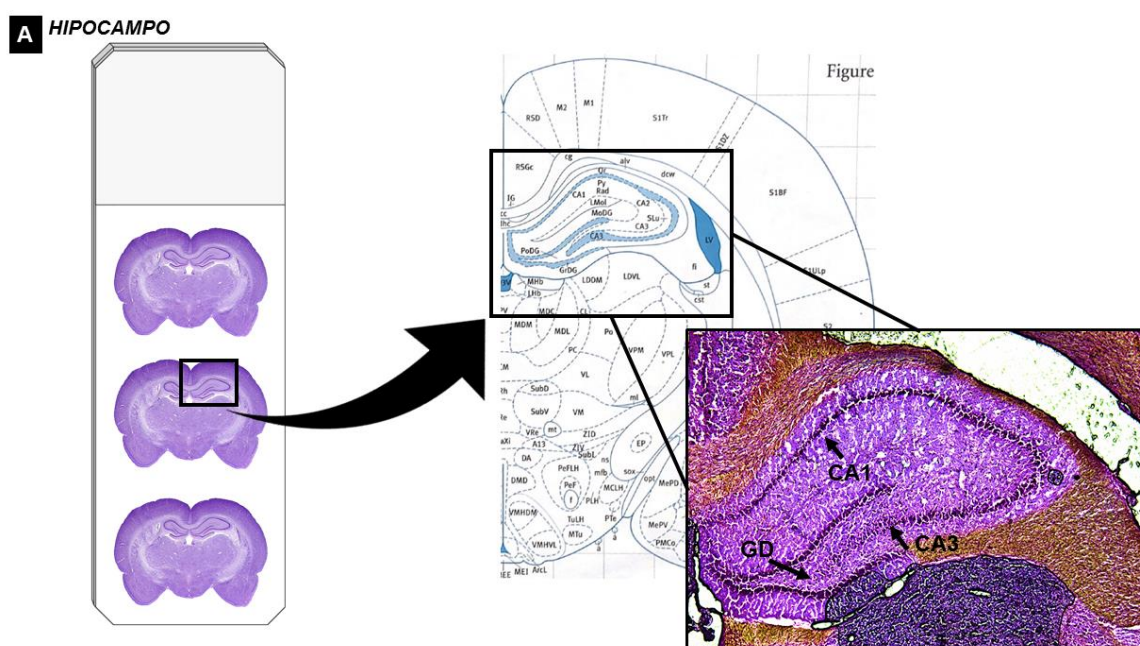
Os animais (20) foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec® 80 mg/Kg/ip) e Cloridrato de Xilazina (Syntec® 40 mg/Kg/ip), onde em seguida tiveram sua região torácica exposta para incisão de cânula no ventrículo esquerdo. Após o clampeamento da artéria aorta abdominal foi introduzida cânula conectada à bomba de perfusão (Miniplus 3 GILSON®) até atingir a artéria aorta ascendente para o clampeamento do músculo cardíaco e bomba. A perfusão foi realizada inicialmente com solução salina (20 mL por animal) por 10 minutos (lavagem sistêmica do animal), seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 mmol/L pH 7,4 por 50 minutos (fixação do tecido cerebral). No final, os encéfalos foram removidos e colocados em frasco contendo solução de paraformaldeído a 4% durante 2 horas na geladeira. Ao final desse tempo, eles foram imersos em solução de sacarose 30% diluída em PB

0,2 mmol/L, onde permaneceram até sua saturação (aproximadamente 48 h). Em seguida, os encéfalos foram cuidadosamente secos em papel absorvente onde foram então congelados através de mergulho rápido em isopentano (temperatura entre -45 e -50°C) durante 1 min. Logo após, foram armazenados a -80°C para posteriores análises histológicas.

3.7.1 Análise histológica pela coloração de Nissl

Nos encéfalos perfundidos, cortes coronais (30 µm de espessura) foram realizados utilizando criostato (Leica CM3050; Nussloch, Alemanha). Assim que foi iniciada a visualização das regiões (HP e LC) foram realizados cortes de 30 µm, segundo atlas Paxinos e Watson (2007). Para confirmar as regiões, os cortes foram visualizados em microscópio. Os cortes foram utilizados consecutivamente, sendo três cortes (triplicata) de cada cérebro, coradas com cresil violeta 0,25%, mergulhadas em bateria de álcoois, xilol, montadas em lâminas (PRISCO *et al.*, 2022) (Figura 10) e visualizados no microscópio Leica acoplado a câmera digital (Leica DM4000 B; Wetzlar, Alemanha). Foram realizadas fotos das regiões do GD, CA1, CA3 hipocampal (Figura 10A) e LC (Figura 10B) em objetiva com ampliação 20x, cuja quantificação das células Nissl-positivas foram contadas utilizando o comando “Threshold colour” do software Image J.

Coloração do HP e LC com cresil violeta



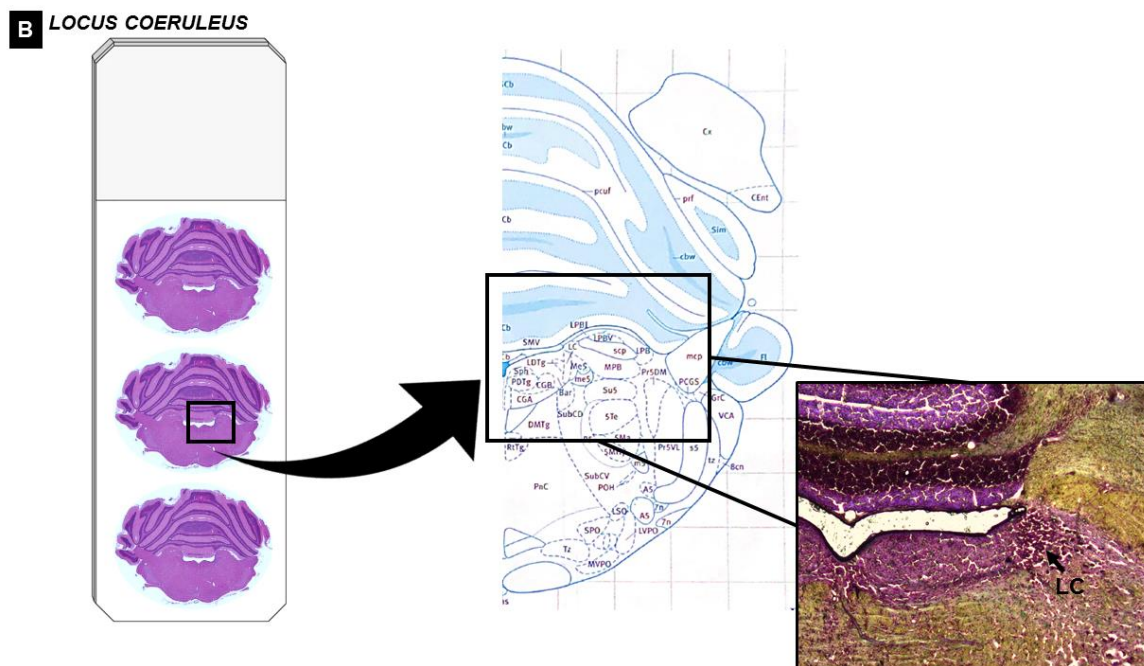


FIGURA 10 – Representação esquemática (atlas Paxinos e Watson (2007)) e cortes coronais do HP e LC corados com cresil violeta. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento, UNESP.

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos neste estudo estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para o conjunto de testes funcionais e cognitivos, a normalidade foi analisada pelo teste de D'Agostino & Pearson, enquanto para a análise bioquímica e histológica foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os mesmos animais com diferentes idades (17Me – 21Me/Ve e 17Me – 21Me/E₂) foram submetidas ao teste *t* pareado, enquanto os grupos veículo e estradiol foram submetidos ao teste *t* não pareado. Para todos os testes, os resultados estão expostos como média $\pm$ EPM, o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$), e todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA – EUA).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros gerais

A análise do esfregaço vaginal de ratas Wistar de 17 meses de idade revelou a fase de diestro em 67% do período de análise do ciclo estral de todos os animais experimentais, indicando diestro persistente (Figura 11). Essa irregularidade no ciclo estral foi marcada pelo aumento da variabilidade na duração das fases do ciclo estral e com recorrência da citologia vaginal leucocitária em 3 ou 4 ciclos. Característica que determina o período da periostropausa, indicando esses animais para inclusão no estudo da senescência reprodutiva. Durante o período experimental, 14 animais foram perdidos (21Me/Ve: 4; 21Me/E₂: 10), dos animais do grupo veículo, 3 tiveram tumores mamários ou ovarianos, enquanto em apenas 1 não foi identificada a causa da morte. Em contrapartida, com os animais do grupo estradiol, 2 óbitos resultaram dos mesmos tumores observados no grupo 21Me/Ve, enquanto nos 8 restantes suas causas de morte não foram identificadas.



FIGURA 11 – Incidência das fases do ciclo estral proestro (P), estro (E), metaestro (M) e diestro (D) de ratas Wistar com 17 meses de idade.

Não houve diferença estatística significativa entre o peso corporal inicial e final dos animais (Tabela 1) durante os 120 dias de tratamento, contudo, os animais do grupo 21Me/E₂ mostraram ganho de massa uterina, assim como, perda de massa ovariana em relação ao grupo 21Me/Ve ($t = 6,608$; $p > 0,0001$; $df = 24$ e $t = 3,794$; $p = 0,0007$; $df = 28$, respectivamente) (Tabela 1).

TABELA 1 – Peso corporal inicial (18 meses) e final (21 meses) de ratas Wistar Ve e E₂

Grupos	Peso corporal (g)		Peso (g)	
	18 Me	21 Me	Útero	Ovários
Ve	395,9 ± 14,70	393,4 ± 15,07	0,847 ± 0,023	0,1653 ± 0,006
E ₂	322,5 ± 9,415	324,2 ± 9,579	1,258 ± 0,063 ****	0,1120 ± 0,012 ***

A análise estatística foi realizada com teste *t*, onde as comparações entre os mesmos animais com diferentes idades (18 Me – 21 Me/Ve e 18 Me – 21 Me/E₂) foram submetidas ao teste *t* pareado, enquanto os grupos veículo e estradiol foram submetidos ao teste *t* não pareado. A normalidade foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores representam a média dos grupos experimentais e são apresentados como média ± EPM. Abreviações e símbolos: Ve = veículo; E₂ = estradiol; Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ****p* < 0,0005 e *****p* < 0,0001 vs veículo. Número de animais/grupo: 13; 15.

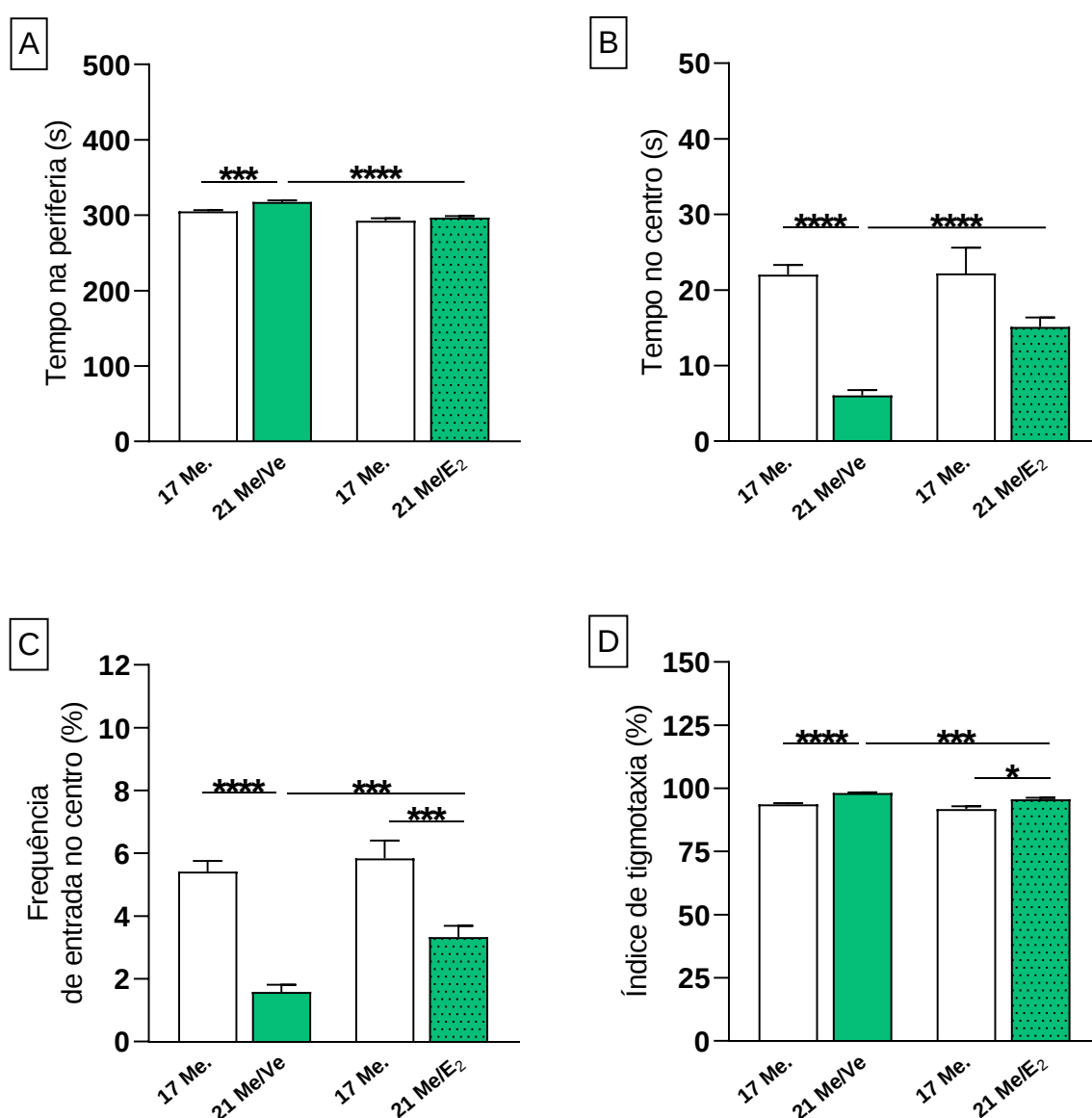
4.2 Análises Comportamentais

4.2.1 Teste de campo aberto

Na análise temporal do teste de campo aberto, o grupo 21Me/Ve passou significativamente mais tempo na periferia (Figura 12A) em relação à quando estavam com 17 meses e ao grupo com 21Me/E₂ ($t = 4,647$; $p = 0,0004$; $df = 14$ e $t = 6,716$; $p < 0,0001$; $df = 28$ respectivamente). Entretanto, a administração do esteróide gonadal proporcionou movimentação das ratas, aos 21Me/E₂, semelhante aos 17 meses de idade. Nossos resultados mostraram menor tempo de permanência no centro do aparato pelas ratas do grupo 21Me/Ve comparado ao período de 17 meses ($p < 0,000$; $t = 10,29$; $df = 10$). Além disso, o tempo de permanência no centro foi maior no grupo 21Me/E₂ em relação aos animais do grupo 21Me/Ve ($t = 6,350$; $p < 0,0001$; $df = 18$) (Figura 12B). Em relação à frequência de entradas no centro (Figura 12C), tanto o grupo 21Me/Ve quanto o 21Me/E₂ apresentaram redução significativa em relação à frequência que apresentaram aos 17 meses de idade (Ve: $t = 9,931$; $p < 0,0001$; $df = 11$ e E₂: $t = 5,334$; $p = 0,0002$; $df = 11$). O grupo 21Me/E₂ apresentou taxa de entradas significativamente maior em comparação ao grupo 21Me/Ve ($t = 4,140$; $p = 0,0004$; $df = 22$). Quanto ao índice de tigmotaxia (Figura 12D), tanto os grupos 21Me/Ve quanto 21Me/E₂ apresentaram maior permanência nos cantos do aparato, quando comparados aos seus 17 meses de idade (Ve: $t = 10,51$; $p < 0,0001$; $df = 11$ e E₂: $t = 3,012$; $p = 0,0118$; $df = 11$). No entanto, o grupo 21Me/E₂ apresentou menor taxa de tigmotaxia em relação ao grupo 21Me/Ve ($t = 4,171$; $p = 0,0004$; $df = 22$). Por fim, a atividade locomotora vista no número de quadrantes percorridos na área periférica do aparato (Figura 12E), foi menor no grupo 21Me/Ve tanto em relação à locomoção que apresentaram aos 17 meses de idade ($t = 4,431$; $p = 0,0006$; $df = 14$), quanto

comparado ao grupo 21Me/E₂ ($t = 2,656$; $p = 0,0119$; $df = 34$), que por sua vez se apresentou semelhante aos seus 17 meses de idade. Já o número de quadrantes percorridos no centro do aparato (Figura 12F) para ambos grupos de 21 meses foi significativamente menor em relação aos seus respectivos 17 meses de idade (Veh: $t = 7,503$; $p < 0,0001$; $df = 10$; E₂: $t = 5,388$; $p < 0,0001$; $df = 15$), embora o grupo 21Me/E₂ tenha percorrido maior número de quadrantes quando comparado ao grupo 21Me/Ve ($t = 3,790$; $p = 0,0006$; $df = 34$).

Análise temporal do teste de campo aberto



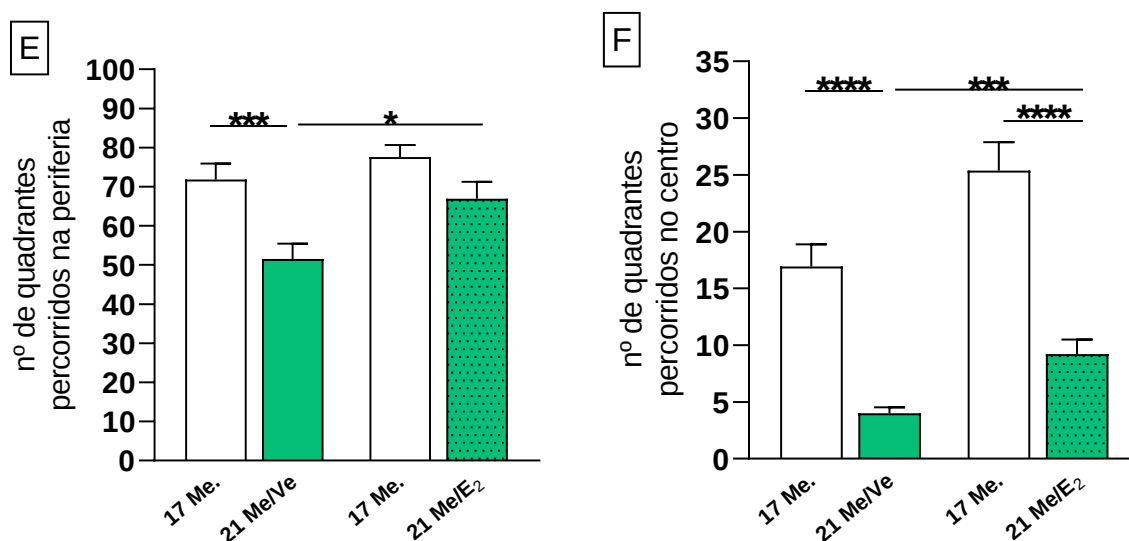


FIGURA 12 – Análise temporal do teste de campo aberto realizado em ratas Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) tempo na periferia; (B) tempo no centro; (C) frequência de entrada no centro; (D) índice de tigmotaxia; (E) número de quadrantes percorridos na periferia; (F) número de quadrantes percorridos no centro. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 12-18.

Na análise etológica, conforme os gráficos A e B da figura 13, o grupo 21Me/E₂ apresentou maior frequência de exploração vertical (Figura 13A) e autolimpeza (Figura 13B) quando comparado ao grupo 21Me/Ve (A: $t = 9,491$; $p < 0,0001$; $df = 28$ e B: $t = 7,052$; $p < 0,0001$; $df = 28$), e quando comparado com a idade de 17 meses (A: $t = 7,006$; $p < 0,0001$; $df = 14$ e B: $t = 3,389$; $p = 0,0044$; $df = 14$). O grupo 21Me/Ve, por sua vez, apresentou diminuição significativa em relação aos 17 meses de idade, em ambos os aspectos (exploração vertical: $t = 4,318$; $p = 0,0007$; $df = 14$ e autolimpeza: $t = 8,328$; $p < 0,0001$; $df = 14$).

Análise etológica do teste de campo aberto

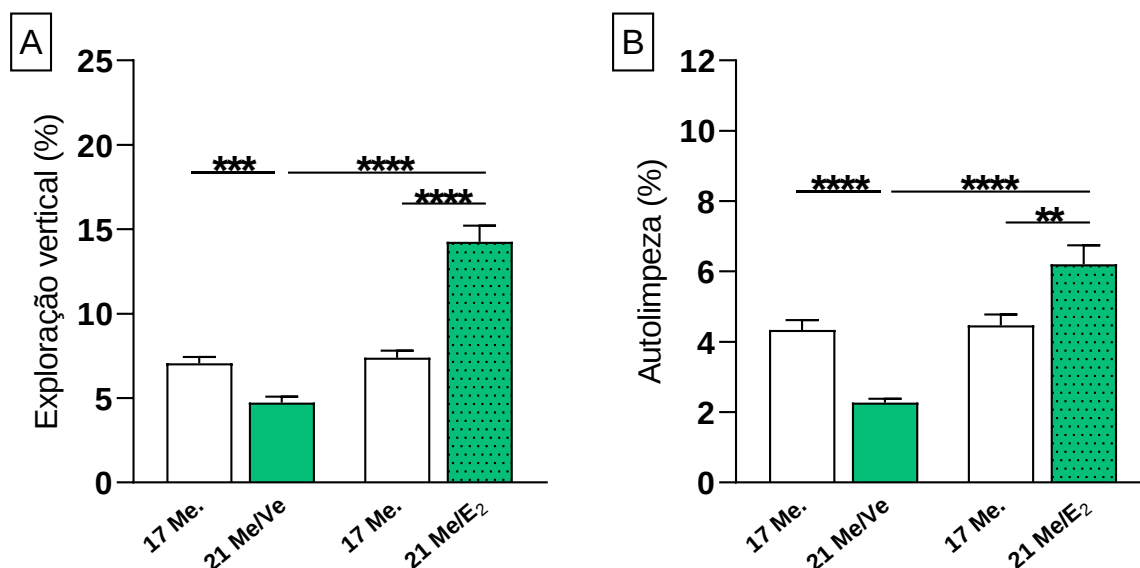


FIGURA 13 – Análise etológica do teste de campo aberto realizado em ratas Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) exploração vertical; (B) autolimpeza. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: $**p < 0,005$, $***p < 0,0005$ e $****p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 15.

4.2.2 Teste do labirinto em cruz elevada

No teste do labirinto em cruz elevado (Figura 14), o grupo 21Me/Ve apresentou diminuição no tempo de permanência nos BA (Figura 14A) em relação ao tempo de 17 meses ($t = 5,807$; $p < 0,0001$; $df = 14$) e ao grupo 21Me/E₂ ($t = 2,419$; $p = 0,0223$; $df = 28$) (Figura 14A). Contudo, o contrário ocorreu nos BF (Figura 14B), onde o grupo 21Me/Ve passou significativamente mais tempo nos BF do que aos 17 meses (Figura 14B; $t = 2,781$; $p = 0,0147$; $df = 14$) e ao grupo 21Me/E₂ (Figura 14B; $t = 2,267$; $p = 0,0313$; $df = 28$). Em sequência, o grupo 21Me/Ve apresentou diminuição significativa ao percentual de entradas nos BA (Figura 14C) em relação ao grupo 21Me/E₂ ($t = 3,266$; $p = 0,0035$; $df = 22$), e em relação aos 17 meses ($t = 4,273$; $p = 0,0013$; $df = 11$). Novamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 21Me/E₂ quando comparado aos 17 meses, tanto na duração, quanto nas entradas ao BA.

Análise temporal do teste de labirinto em cruz elevado

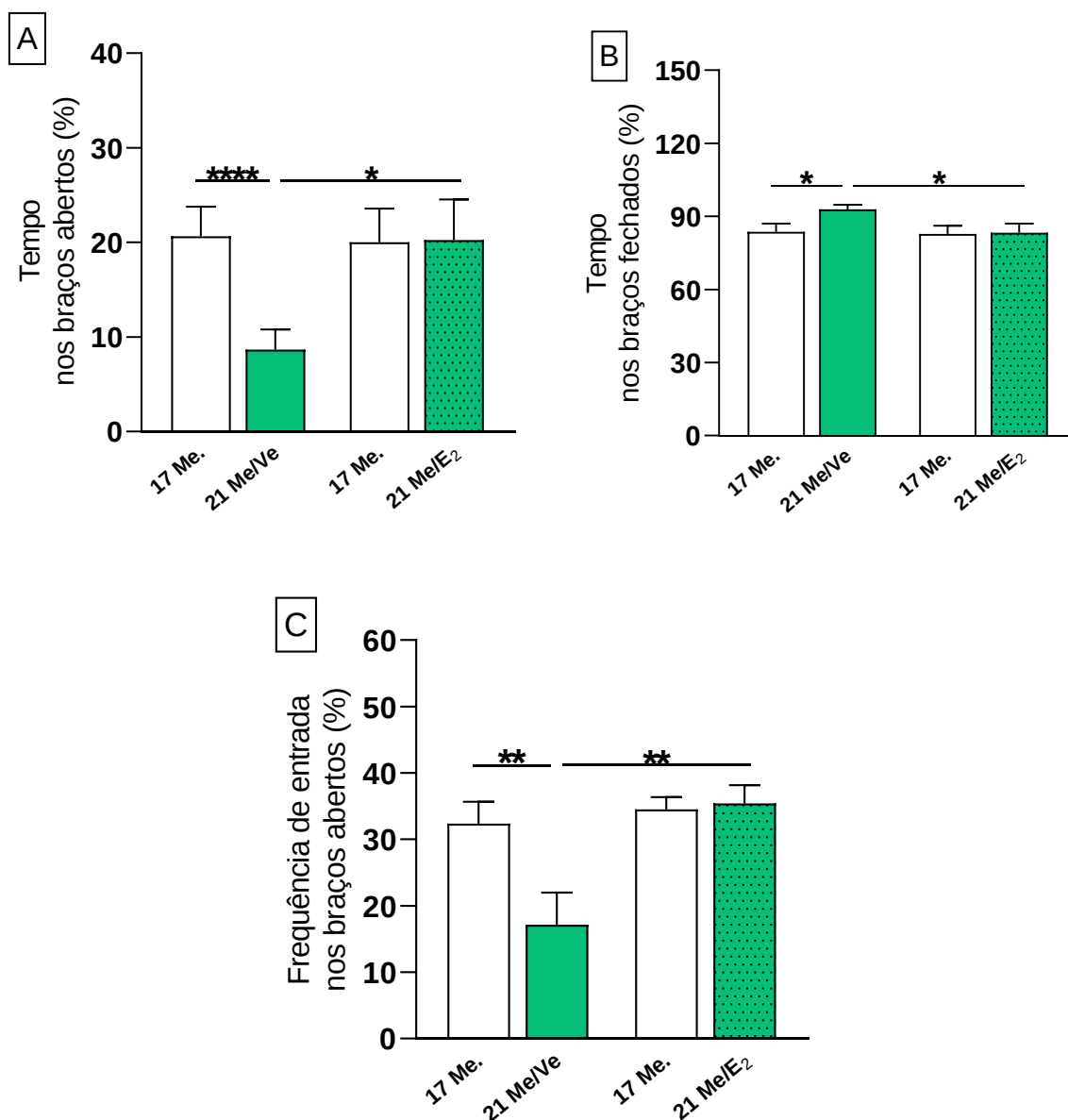


FIGURA 14 – Análise temporal do teste de labirinto em cruz elevado realizado em ratos Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) tempo nos braços abertos; (B) tempo nos braços fechados; (C) frequência de entrada nos braços abertos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e **** $p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 12; 15.

A análise etológica, de acordo com a figura 15, mostrou que tanto a imersão de cabeça (Figura 15A) quanto a exploração vertical (Figura 15B) do grupo 21Me/Ve diminuiriam significativamente em comparação ao grupo 21Me/E₂ (A: $t = 3,781$; $p = 0,0008$; $df = 28$ e B: $t = 5,644$; $p < 0,0001$; $df = 28$), e em relação aos 17 meses (A: $t = 5,134$; $p = 0,0002$; $df = 14$ e B: $t = 13,90$; $p < 0,0001$; $df = 14$). Houve ainda, diferença significativa na exploração vertical, do grupo 21Me/E₂ em relação aos 17 meses de

idade ($t = 2,432$; $p = 0,0290$; $df = 14$), embora não tenha ocorrido diferença significativa na imersão de cabeça entre o grupo 21Me/E₂ quando comparado aos 17 meses. No aspecto comportamental de autolimpeza (Figura 15C) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado

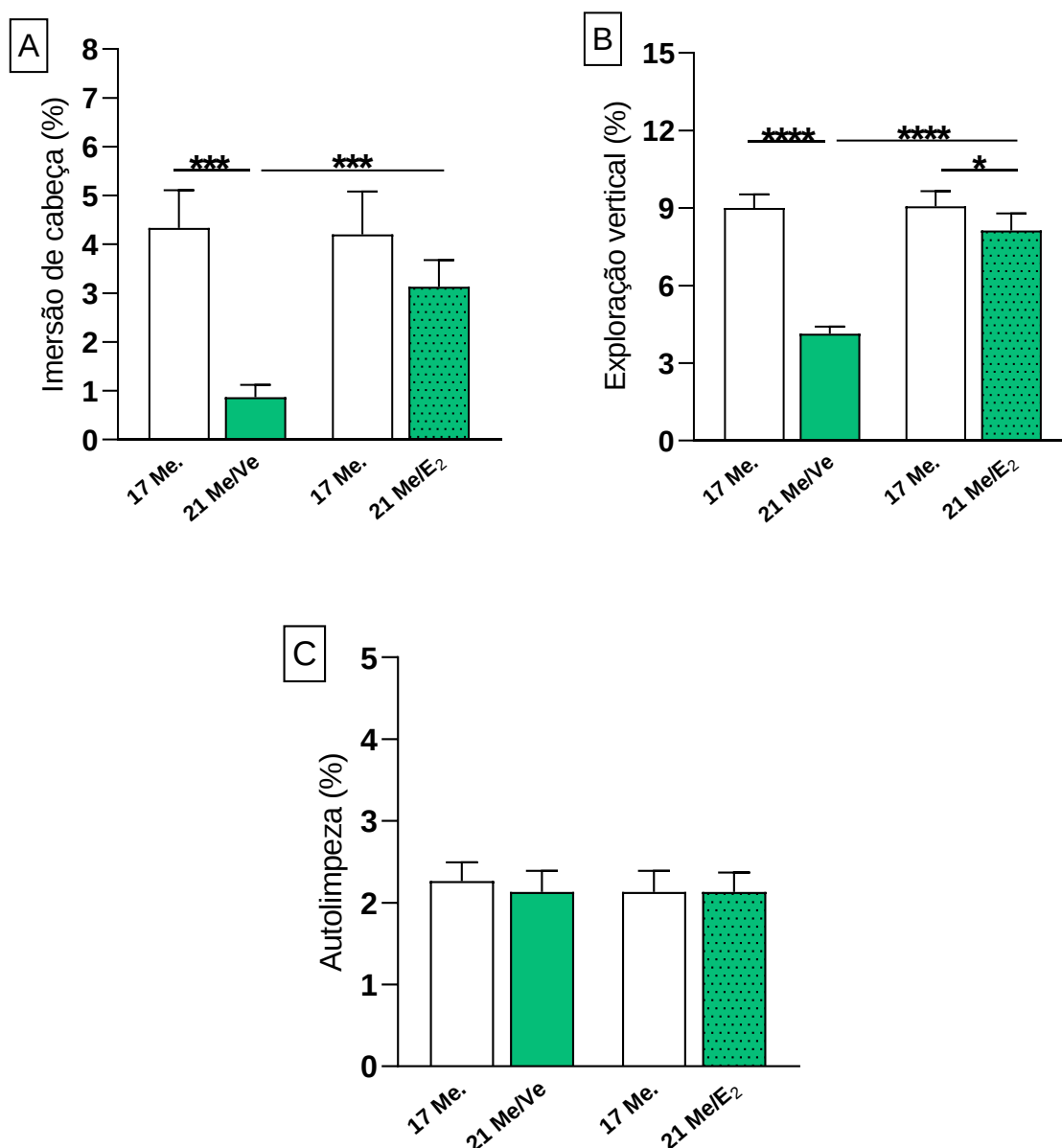
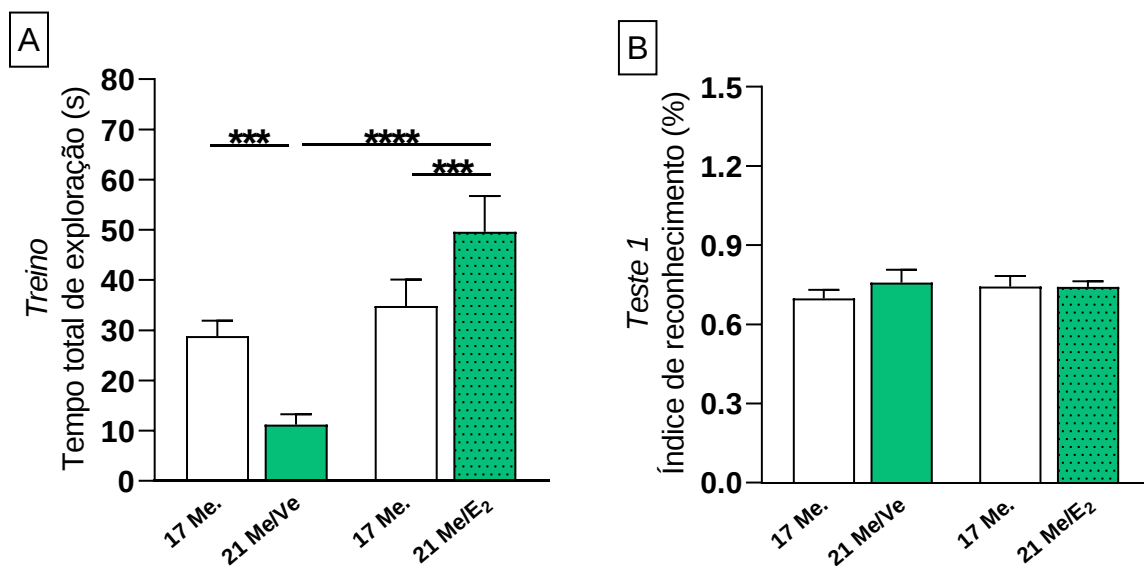


FIGURA 15 – Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado realizado em ratos Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) imersão de cabeça; (B) exploração vertical; (C) autolimpeza. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 15.

4.2.3 Teste de Reconhecimento de objetos

O tempo total de exploração do objeto durante a sessão de treino é mostrado na figura 16A. Os índices de reconhecimento calculados durante os testes 1 e 2 são apresentados nas figuras 16B e C respectivamente. Os resultados da sessão de treino mostraram que o grupo 21Me/Ve apresentou diminuição significativa na exploração total dos objetos A+A (Figura 16A: $t = 4,187$; $p = 0,0009$; $df = 14$) em relação aos 17 meses. No entanto, a comparação entre os grupos 21Me/Ve e 21Me/E₂ mostrou que a THE aumentou esse parâmetro ($t = 5,192$; $p < 0,0001$; $df = 28$), mesmo em relação ao tempo em que as ratas estavam com 17 meses ($t = 4,264$; $p = 0,0008$; $df = 14$). Durante o primeiro teste (memória de curto prazo) (Figura 16B), não ocorreu diferença entre os 4 grupos analisados. Por fim, no teste 2 (memória de longo prazo) (Figura 16C), o índice de reconhecimento do grupo 21Me/Ve foi menor do que aos 17 meses ($t = 5,222$, $p = 0,0002$; $df = 12$), enquanto o tempo do grupo 21Me/E₂ foi semelhante aos 17 meses e maior que o grupo 21Me/Ve ($t = 3,843$, $p = 0,0008$, $df = 24$).

Análise etológica do teste de reconhecimento de objetos



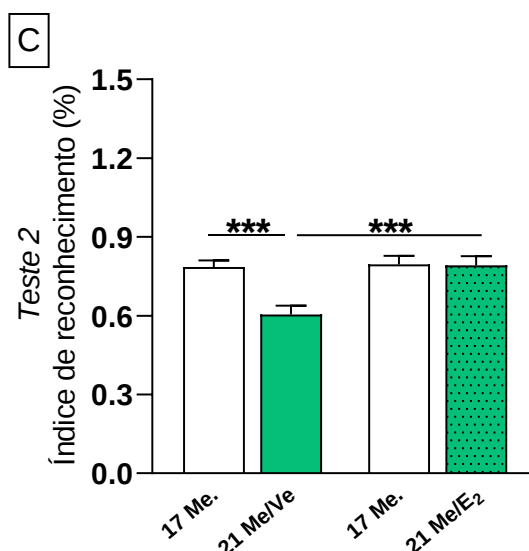


FIGURA 16 – Análise etológica do teste de reconhecimento de objetos realizados em ratas Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) treino; (B) teste 1; (C) teste 2. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 13; 15.

4.2.4 Teste de Deambulação

A largura e o comprimento do passo foram analisados com o teste de deambulação, realizado pré e pós-terapia (17 e 21 meses respectivamente), conforme mostrado na figura 17. No comprimento de passada (Figura 17A) o grupo 21Me/E₂ apresentou aumento significativo tanto em relação ao grupo 21Me/Ve quanto aos 17 meses ($t = 6,502$; $p < 0,0001$; $df = 34$ e $t = 4,243$; $p = 0,0005$; $df = 17$, respectivamente). Os animais do grupo 21Me/Ve apresentaram diminuição em relação a 17 meses ($t = 4,136$; $p = 0,0007$; $df = 17$). Em relação à largura (Figura 17B), a diminuição significativa do grupo 21Me/E₂ ocorreu tanto em relação ao grupo 21Me/Ve quanto em relação aos 17 meses de idade ($t = 2,637$; $p = 0,0125$; $df = 34$ e $t = 2,723$; $p = 0,0145$; $df = 17$ respectivamente). Não houve diferença significativa entre o grupo 21Me/Ve em relação aos 17 meses na largura da passada. É importante notar que o aparelho utilizado em nosso método de análise da marcha não interferiu na marcha livre.

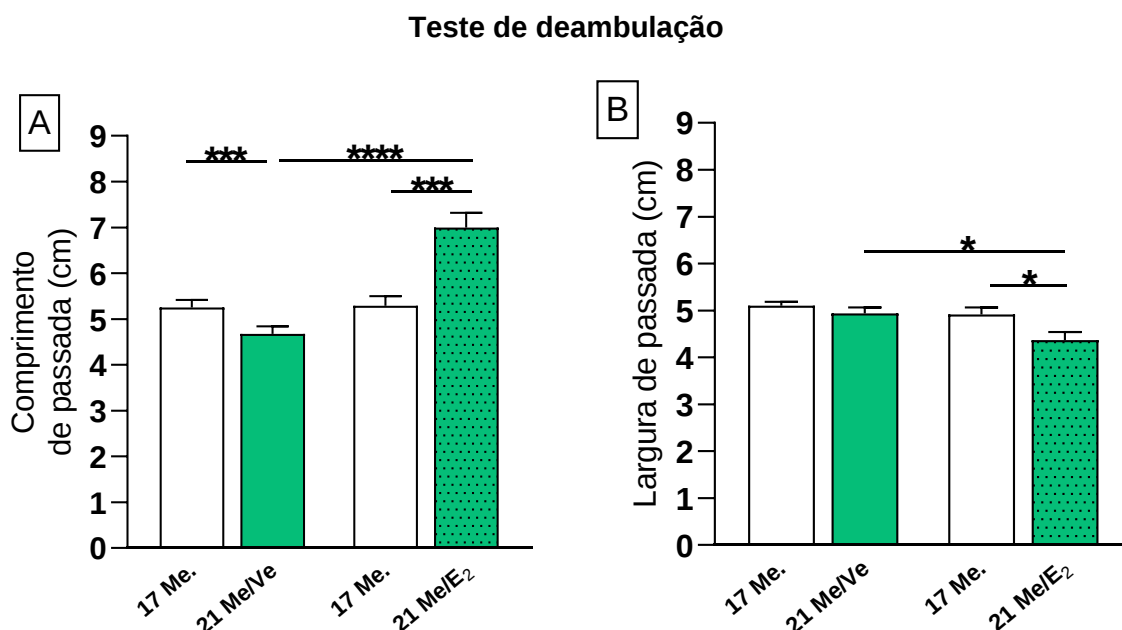


FIGURA 17 – Teste de deambulação realizado em ratos Wistar aos 17 e 21 meses, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) Comprimento da passada; (B) Largura da passada. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$. Número de animais/grupo: 18.

4.3 Análise do estado redox hipocampal

Os marcadores de estado redox do HP de ratos Wistar aos 21 meses de idade após receberem veículo (Ve) ou THE (E₂) são mostrados na Figura 18. Não houve efeito significativo sobre avaliação do dano oxidativo proteico e lipídico entre os grupos, conforme os gráficos A e B. Após os animais serem submetidos aos 4 meses de tratamento (com Ve ou E₂), a capacidade antioxidante total não enzimática (Figura 18C) foi significativamente diminuída no grupo 21Me/E₂ em comparação com o 21Me/Ve ($t = 3,293$; $p = 0,0064$; $df = 12$). Em contrapartida, o GSH (Figura 18D) apresentou aumento significativo no grupo 21Me/E₂ em relação ao 21Me/Ve ($t = 2,392$; $p = 0,0379$; $df = 10$). Já nas enzimas de defesa antioxidante, a atividade da catalase (Figura 18F) no grupo 21Me/E₂ foi significativamente menor que o 21Me/Ve ($t = 2,498$; $p = 0,0280$; $df = 12$), no entanto, THE não demonstrou efeito significativo sobre as enzimas SOD e GPx (Figura 18E e G) entre os grupos.

Marcadores do estado redox hipocampal

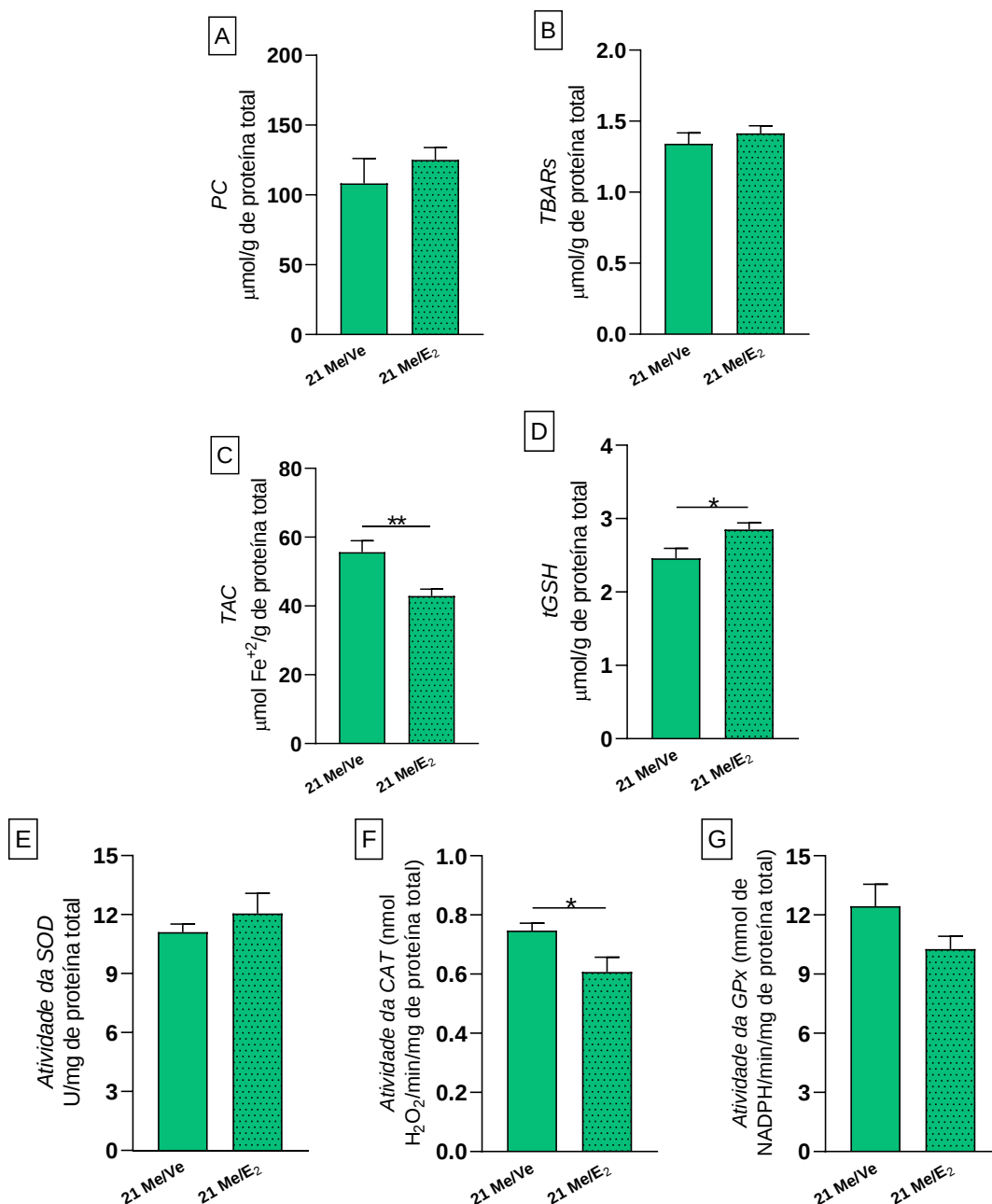


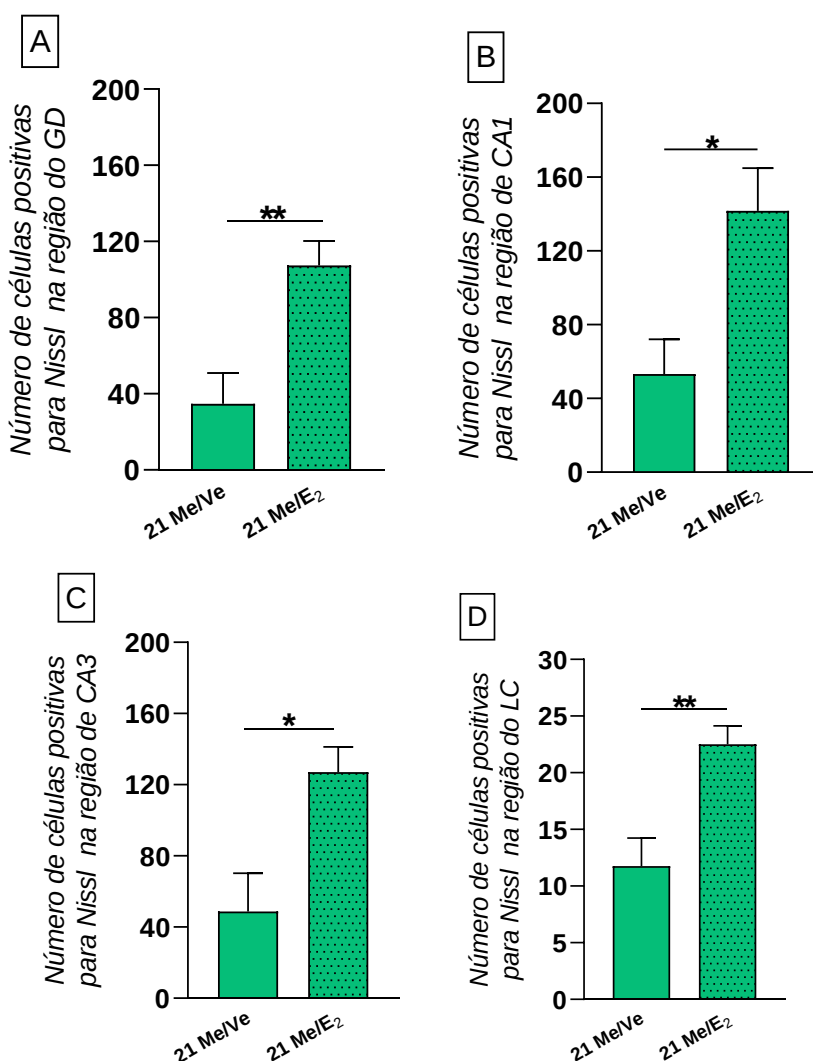
FIGURA 18 – Marcadores do estado redox do HP de ratas Wistar após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A) proteína carbonilada – PC; (B) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS; (C) capacidade antioxidante total (TAC); (D) glutathiona total – GSH; (E) atividade da superóxido dismutase – SOD; (F) atividade da catalase – CAT; (G) glutathiona peroxidase – GPx. Os valores são apresentados como média ± EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: *p < 0,05 e **p < 0,005. Número de animais/grupo: 7.

4.4 Análise histológica pela coloração de Nissl

Afim de verificar se a THE no tecido cerebral propiciou efeito neuroprotetor, a coloração de Nissl foi utilizada para marcar/corar neurônios intactos (Figura 19). Imagens microscópicas das regiões de GD, CA1 e CA3 hipocampais mostraram maior

quantidade de células neuronais, expressos numericamente como células positivas, nas ratas que receberam a terapia de longa duração com estradiol em relação aos animais que receberam veículo (GD: $t = 3,529$; $p = 0,0077$; $df = 8$; CA1: $t = 2,967$; $p = 0,0179$; $df = 8$ e CA3: $t = 3,031$; $p = 0,0163$; $df = 8$ – Figura 19A-E, B-F e C-G, respectivamente). Por conseguinte, no LC (Figura 19D-H) houve diminuição significativa de células positivas para Nissl no grupo 21Me/Ve em comparação com o grupo 21Me/E₂ ($t = 3,626$; $p = 0,0067$; $df = 8$).

Quantificação de células Nissl-positivas no HP e LC



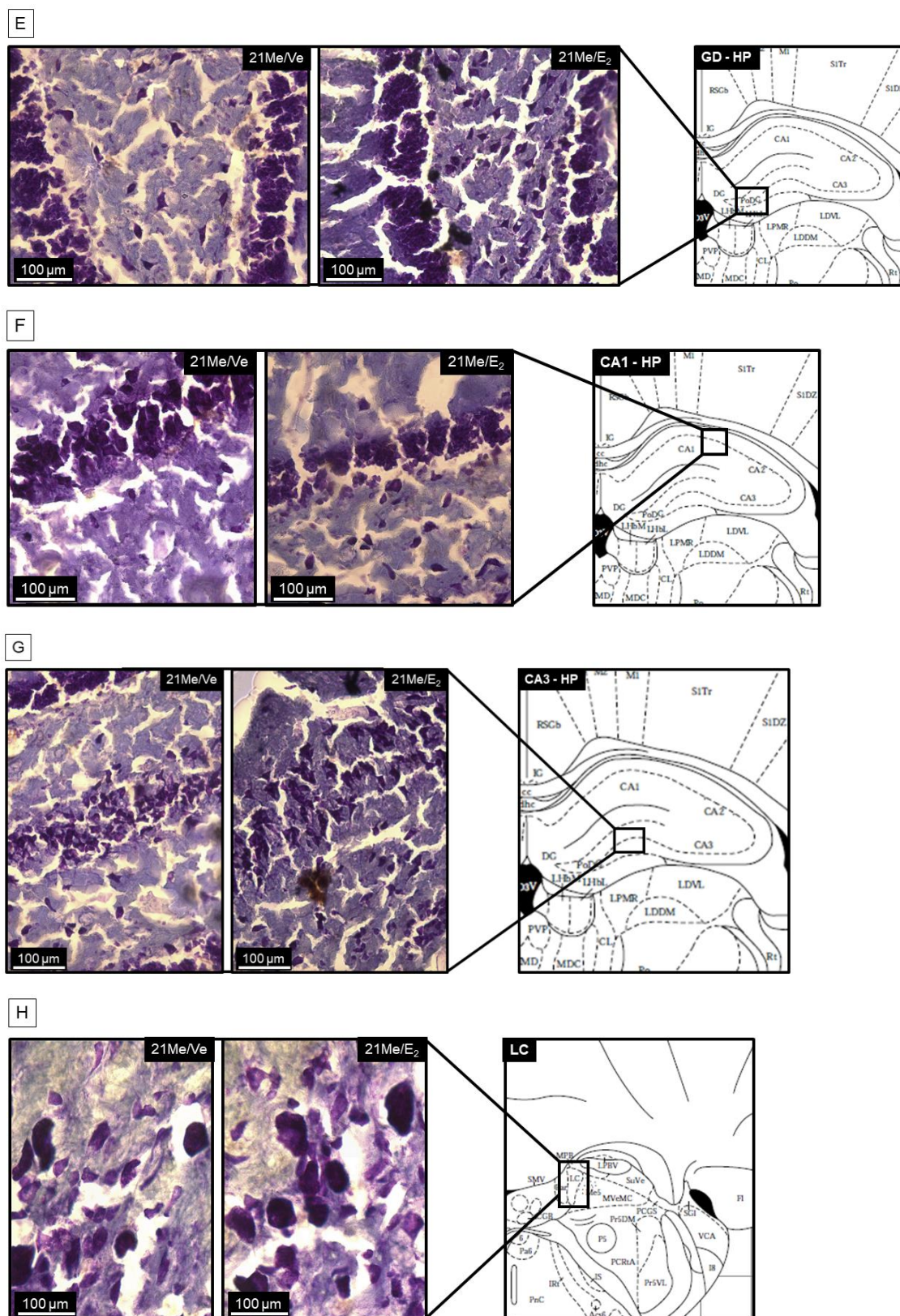


FIGURA 19 – Representação gráfica (atlas Paxinos e Watson (2007)) e fotomicrografias representativas da quantificação de células Nissl-positivas no HP (A-C) e LC (D) pela coloração do cresil violeta em ratos Wistar, após 4 meses da terapia com óleo vegetal (21 Me/Ve) e terapia hormonal estrogênica (21 Me/E₂). (A-E) giro dentado – GD; (B-F) área de CA1; (C-G) área de CA3; (D-H) Locus Coeruleus - LC. A barra de escala para HP e LC = 100 µm (ampliação de 40x). Os valores são apresentados como média ± EPM. Símbolos para diferença de significância entre os grupos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$. Número de animais/grupo: 5.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos potenciais da THE em vários aspectos do envelhecimento em modelo animal de envelhecimento feminino. Nos concentramos na senescência reprodutiva, que se refere ao declínio da concentração plasmática de estrógeno e da função reprodutiva. Examinamos o impacto da THE no comportamento ansioso, locomoção, déficits de memória, marcha (movimento), estado redox do hipocampo (equilíbrio oxidativo) e atividade neuronal do LC e nas regiões do hipocampo. Os resultados do estudo indicaram que, aos 21 meses, as ratas que receberam a THE exibiram menor comportamento ansioso em comparação com as ratas que receberam veículo, bem como, maior atividade locomotora. O grupo tratado com hormônio também manteve suas capacidades exploratórias e mnemônicas (relacionadas à memória) semelhantes aos 17 meses, sugerindo que a terapia com estrogênio teve efeito positivo na função cognitiva. Além disso, a THE melhorou os aspectos biomecânicos da marcha, indicando impacto benéfico no movimento e na função motora das ratas senescentes. A terapia hormonal também ajudou a equilibrar o estado redox no hipocampo, importante região do cérebro envolvido com a memória e aprendizado. Além disso, a terapia hormonal contribuiu com a preservação de células neuronais nas regiões do hipocampo e, principalmente, do LC, que está envolvido na regulação da excitação e das respostas ao estresse. No geral, esses achados sugerem que a terapia com hormônio esteroide pode fornecer benefícios para os aspectos cognitivos, comportamentais e funcionais no período do envelhecimento feminino. As respostas positivas observadas no estudo foram influenciadas pelo momento da administração da terapia hormonal, indicando que os efeitos podem ser dependentes do período específico em que a terapia é iniciada.

É importante destacar que a senescência reprodutiva ocorre em todas as espécies, com roedores e primatas não humanos apresentando características críticas como a transição da perimenopausa humana (BRINTON, 2012). Assim como os humanos, as fêmeas de roedores experimentam declínios no número de folículos ovarianos, ciclos irregulares, fertilidade irregular, flutuações de hormônios esteroides e desenvolvimento de insensibilidade ao estrogênio (CRUZ *et al.*, 2017; WEISS *et al.*, 2004). A literatura descreve que as alterações nas fases do ciclo estral de ratas podem ter origem a partir do décimo mês, sendo o décimo segundo o início da frequência de ciclos irregulares e preponderância da fase estro, seguido da maior incidência da fase

diestro a partir do décimo sétimo mês (CRUZ *et al.*, 2017; LU *et al.*, 1979). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que fêmeas Wistar apresentam fase de diestro persistente aos 17 meses, marcando o período da periestropausa (NICOLA *et al.*, 2021; 2016; FERREIRA *et al.*, 2015). Essas alterações no ciclo reprodutivo de roedores de laboratório fornecem modelo bem definido e tratável dos ciclos irregulares da perimenopausa humana, que precede a cessação dos ciclos reprodutivos e durante o qual ocorrem inúmeras alterações fisiológicas relacionadas as alterações nas concentrações hormonais (NICOLA *et al.*, 2021; PESONEN *et al.*, 2021; STALEY, SCHARFMAN, 2005). Portanto, a perimenopausa e a periestropausa são caracterizadas pelo aumento da variabilidade na duração do ciclo menstrual ou estral e alteração na concentração de hormônios circulantes. Concentração menor de 17β -estradiol torna-se estabilizada na perimenopausa tardia, quando os ciclos cessam e a transição para a menopausa está completa (HARLOW *et al.*, 2012). Estudo realizado em nosso laboratório com ratas senescentes e submetidos ao mesmo protocolo de THE desta pesquisa evidenciou baixa concentração plasmática de estradiol após 48 h da última injeção do hormônio (32,28 pg/mL - grupo Ve; 33,34 pg/mL - grupo E₂) aos 21 meses de idade (MORAIS, 2016). Esses dados sugerem que dose não supra fisiológica de 17β -estradiol foi aplicada ao grupo 21Me/E₂, mantendo as características do período.

É sabido que a transição para a perimenopausa traz alterações funcionais no sistema reprodutivo, levando a sintomas como ondas de calor, suores noturnos e ciclos menstruais irregulares. A THE tem sido explorada como opção potencial de tratamento para aliviar esses sintomas. Porém, é importante ressaltar que nesse período não há deficiência completa de estradiol, que é a principal forma de estrogênio em mulheres na pré-menopausa (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Embora o foco da THE seja principalmente o controle dos sintomas físicos, a transição da perimenopausa é processo complexo que também afeta o bem-estar neurológico e emocional das mulheres. Estudos demonstraram que as mulheres que passam pela perimenopausa podem apresentar sintomas neurológicos, como depressão, disfunção cognitiva, dificuldades de aprendizado e declínio da memória (LIU *et al.*, 2021; WADA *et al.*, 2018; TEPPER *et al.*, 2012). Os transtornos de ansiedade são mais prevalentes em mulheres do que em homens (RAMOS *et al.*, 2022; SEEMAN, 1997), e essa disparidade continua a existir nas fases do envelhecimento (BROMBERGER *et al.*, 2003). Da mesma forma, a incidência de depressão é maior em mulheres

(KUNDAKOVIC; ROCKS, 2022). Esses achados sugerem que os hormônios gonadais, incluindo o estrogênio, desempenham ação na proteção contra complicações emocionais, e suas flutuações durante a transição da perimenopausa podem contribuir para o desenvolvimento desses sintomas.

Em vista disso, testes comportamentais são normalmente utilizados em pesquisas com animais, afim de verificar possíveis efeitos ansiolíticos de drogas, terapias, exercícios e afins, como foi o caso deste estudo. Coadjuvando as análises temporais, o estudo do comportamento através de movimentos comumente realizados que nos informam devidos “ritmos” para formação social, faz parte da ciência etológica (ZUANON, 2007), uma ferramenta sensível para análise emocional dos roedores (RODGERS; DALVI, 1997). Nossos dados mostraram que as ratas de 21 meses que não receberam E₂ apresentaram redução na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos durante o teste do labirinto em cruz elevado, bem como diminuição no tempo, entradas no centro e da atividade locomotora na periferia e centro do teste de campo aberto, o que indica aumento do comportamento do tipo-ansioso. No entanto, animais do grupo 21Me/E₂ tiveram tempo de permanência e frequência de entradas significativamente maior nos braços abertos que nos braços fechados em comparação com os animais que não receberam terapia hormonal, assim como, também demonstrou tempo significativamente maior no centro e frequência de entrada no centro, além de maior atividade locomotora na periferia e centro do campo aberto. Além disso, em ambos os testes, os animais do grupo 21Me/Ve apresentaram redução na exploração vertical, autolimpeza e imersão de cabeça, indicando aumento de ansiedade. Em conjunto, esses dados indicam efeito ansiolítico da THE nas ratas aos 21 meses de idade. Fatores como a duração da administração de estrogênio, a idade das ratas e as tarefas comportamentais selecionadas, podem estar contribuindo para este efeito. Além disso, estudo realizado no início dos anos 2000 evidenciou que os níveis de serotonina, NA e dopamina e suas taxas de renovação encontram-se alterados após o tratamento com estrogênio em várias regiões do cérebro envolvidas com a ansiedade, como hipocampo e amígdala por exemplo, o que pode contribuir para as propriedades ansiolíticas do estrogênio (PANDARANANDAKA; POONYACHOTI; KALANDAKANOND-THONGSONG, 2006). Por conseguinte, apresentando evidências de possível ação ansiolítica do estrogênio na periropausa, levando em consideração o momento de aplicação, uma vez que quando realizada no período inicial do declínio de E₂, ela

possibilita benefícios cognitivos mais evidentes do que quando iniciada de forma “atrasada” (WALF; PARIS; FRYE, 2009). Em suma, com base nos resultados mencionados, ratas na peri menopausa que receberam terapia hormonal exibiram comportamento mais ansiolítico em comparação com o grupo que não recebeu estrógeno exógeno. Esses resultados podem contribuir para a compreensão dos efeitos do estrógeno na regulação da ansiedade durante a senescência reprodutiva. No entanto, como a ansiedade é complexa e envolve mais de uma área ou sistema cerebral, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos do estrogênio nesse contexto.

A fim de investigar se a perimenopausa é janela crítica na qual a administração do THE pode afetar positivamente a cognição, analisamos a memória de trabalho nesses animais, uma vez que a tarefa de reconhecimento de objetos introduz novidade ao animal, onde a percepção e a resposta à novidade são as principais funções do HP (MELO-CARPES; IZQUIERDO, 2013). Os resultados do teste de reconhecimento de objetos mostraram que, durante a fase de treinamento, o grupo THE explorou mais objetos em relação aos outros grupos. No entanto, no teste para análise de memória de curta duração, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais. Nossos resultados mostraram menor índice de reconhecimento de objetos no grupo 21Me/Ve em relação aos 17 meses de idade quando submetidos a análise de memória de longo prazo. Entretanto, as ratas que receberam THE apresentaram alto comportamento exploratório em relação a objetos novos e seu índice de reconhecimento foi maior que as ratas de mesma idade que não receberam a terapia hormonal. Esses achados sugerem que a terapia com estrogênio administrada durante a peri menopausa em ratas pode ter impacto positivo na memória de trabalho a longo-prazo e potencialmente contribuir para a preservação da função cognitiva durante a perimenopausa. Nossos resultados indicam que efeitos benéficos do estradiol para algumas tarefas comportamentais, como o reconhecimento de objetos, continuam ocorrendo no encéfalo de ratas no período da peri menopausa, confirmando ser janela crítica para THE. Estudos registraram depleção de ER α e ER β em neurônios localizados no hipocampo, principalmente na área CA1, na senescência reprodutiva (BEAN; LANOV; FOSTER, 2014), sendo as memórias dependentes do HP fortemente afetadas pelas concentrações de estrogênios, como a memória de reconhecimento de objetos (PEREIRA *et al.*, 2018). Os efeitos da interação do estrogênio e seus receptores (ER α e ER β) sobre os

mecanismos de memória ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, os neurônios glutamatérgicos hipocampais são identificados como os principais mediadores dos efeitos do E₂ na memória de reconhecimento de novos objetos (BOULWARE; HEISLER; FRICK, 2013) e plasticidade sináptica hipocampal (SPENCER *et al.*, 2008), uma vez que os receptores de E₂ (REs) situados na membrana celular associam-se a maquinaria de sinalização de outros receptores de membrana, podendo assim, auxiliar os REs à interagir e ativar receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), tendo esse fator, o potencial para os efeitos do E₂ na consolidação da memória (TAXIER; GROSS; FRICK, 2020). Ainda, há também o sistema colinérgico, com evidências demonstrando que as interações estrogênio-colinérgicas podem afetar o envelhecimento cognitivo em humanos (NEWHOUSE; DUMAS, 2015). Estudo com animais mostrou que a liberação de acetilcolina (ACh) promovida pelo E₂, pode não ser suficiente, comprometendo a MCP observada em animais idosos (UTKIN, 2019; PEREIRA *et al.*, 2018). Importante registrar que na realização de estudos para análise de reconhecimento de objetos, deve-se ter cuidado com as propriedades dos objetos, para não influenciar a memória dos roedores, dificultando a diferenciação entre um objeto e outro (interferência redundante) (ENNACEUR, 2010).

As regiões cerebrais diretas (CA1, CA3, GD hipocampais) ou indiretas (LC) são cruciais para processamento da memória de reconhecimento de objetos e devem estar integralmente atuantes, uma vez que estas regiões são apontadas como estruturas essenciais para a cognição (JAMES *et al.*, 2020; AL-RAHBI *et al.*, 2014; EICHENBAUM; OTTO; COHEN, 1994). Junto a isso, sabe-se que a senescência reprodutiva acarreta na depleção de neurônios hipocampais que possuem REs (receptores esses, presentes no HP e córtex tanto de roedores, como de humanos) e também receptores noradrenérgicos, ambos casos, devido menor concentração estrogênica (LUCKEY *et al.*, 2021; BEAN; LANOV; FOSTER, 2014). No período de regularidade do ciclo, a ativação desses REs tem potencial de promover a conservação dos neurônios hipocampais (MA *et al.*, 2020; ZHAO; WU; BRINTON, 2004), uma vez que os estrogênios influenciam benéficamente as propriedades morfológicas e eletrofisiológicas do HP, fornecendo suporte trófico para a formação de novas espinhas dendríticas e sinapses, bem como dos neurotransmissores (AL-RAHBI *et al.*, 2014; TAKUMA *et al.*, 2007). Todavia, com a depleção do E₂ na senescência reprodutiva, tais estruturas de suma importância podem comprometer ações e reações. As ratas que receberam THE apresentaram menor comprometimento

de células neuronais tanto no HP, quanto no LC em relação aos animais controles que tiveram comprometimento significativo de células positivas para Nissl. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl e a coloração de Nissl é comumente utilizada afim de observar de lesões citotóxicas, dado que esse método cora a glia e corpos celulares de neurônios, provendo precisão sobre o delineamento do sítio de lesão, ou seja, degeneração, corando os neurônios intactos sendo que quando ocorre lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer (cromatólise) (SUKIKARA *et al.*, 2006; HEEB; YAHR, 2000). Logo, a THE mostrou-se positiva sobre a neurodegeneração das regiões HP e LC, podendo atuar como mecanismo neuroprotetor à cognição. E já foi demonstrado que a exposição com E₂ endógeno ou exógeno é capaz de aumentar a densidade das espinhas dendríticas nas áreas hipocampusais, bem como, proteger contra insultos tóxicos (incluindo EROs), excitotoxicidade neurotransmissora e toxicidade induzida por β -amilóide (MERCAN; HENEKA, 2022; SUN; CHEN; WANG, 2015; AL-RAHBI *et al.*, 2014). Nossos resultados corroboram esses dados, uma vez que os animais do grupo 21Me/E₂ mostram respostas positivas sobre ansiedade, memória e também menor perda neuronal.

As alterações progressivas de funcionalidade que ocorrem e comprometem o organismo parecem resultar da alteração do equilíbrio redox ao longo da vida, com grande produção de EROs (NASTO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Além disso, a produção de antioxidantes tem relação inversa com o aumento da idade, o que pode favorecer o dano oxidativo e acentuar o processo de morte celular (JOSEPH *et al.*, 2013; SMALL *et al.*, 2013), participando no desenvolvimento de possíveis demências futuras, como a DA (PERTESI *et al.*, 2019), relacionado com as menores concentrações de estradiol e a diminuição da expressão dos REs, aumentando marcadores do estado redox (UDDIN *et al.*, 2020; LEVINTA; MUKOVOZOV, 2016). Entre os grupos de animais na peri menopausa, não houve diferença significativa no dano oxidativo lipídico e proteico. Os animais que receberam THE apresentaram menor TAC e CAT e aumento do antioxidante endógeno GSH, resultados favoráveis para defesa antioxidante, enquanto grupo veículo apresentou o oposto, respectivamente, consequentemente respondendo à necessidade de maior atividade antioxidante, enquanto os submetidos ao THE permaneceram com menor necessidade de tais atividades descritas, bem como dos demais marcadores. Mulheres na perimenopausa apresentam concentração plasmática de GSH diminuído,

regulando negativamente também demais antioxidantes, portanto, quando as concentrações de E₂ são restaurados pela THE, esses efeitos são neutralizados ou até mesmo melhorados (BORRÁS *et al.*, 2003), evidenciando os efeitos favoráveis do estrogênio na manutenção de estado redox equilibrado no período da perimenopausa. Em suma, as precauções tanto para os sintomas popularmente conhecidos decorrentes da menopausa, como transtornos de humor e depressão, mecanismos mitigadores e preventivos sobre a incidência de patologias neurodegenerativas, quanto para aspectos funcionais no público feminino de meia-idade são extremamente válidos e devem ser considerados.

De forma geral, além dos acometimentos de aspectos neurais mencionados, a fraqueza musculoesquelética com o envelhecimento é algo indesejável, contudo existente, acarretando perda de massa e força muscular, deficiência locomotora, fragilidade, quedas e fraturas, comprometendo a qualidade de vida do idoso. Há dados mostrando a ocorrência de comprometimento da marcha até mesmo no envelhecimento saudável, produzindo, após os 50 anos, profundas modificações, com alterações no comprimento, largura e velocidade da marcha (KHADIKAR, 2019; BEIJERSBERGEN *et al.*, 2013). A fisiologia musculoesquelética das mulheres está progressivamente tornando-se risco à saúde na meia-idade e além, podendo sinalizar comprometimentos sobre diversas condições clínicas envolvendo mobilidade, quedas, fraturas, independência, saúde mental e funções cognitivas, bem como hospitalização e aumento substancial da mortalidade associada em mulheres na pós-menopausa (COLLINS; LAAKKONEN; LOWE, 2019). O músculo esquelético feminino é acometido duplamente frente a idade em relação ao masculino, decorrente ao decréscimo da produção hormonal ovariana (KHADIKAR, 2019), visto que o estrogênio também causa efeitos divergentes sobre a saúde dos tecidos conjuntivos em geral (COLLINS; LAAKKONEN; LOWE, 2019). O estrogênio possui participação significativa no metabolismo ósseo, regulando funcionamento dos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células T, de forma sucinta, protegendo a matriz óssea reduzindo a reabsorção e remodelação óssea ao mesmo tempo que mantém sua formação (STRINGHETTA-GARCIA *et al.*, 2017; CAULEY, 2015). A diminuição do comprimento da marcha dos animais aos 21 meses de idade mostrou perda na qualidade da marcha, revertida no grupo que recebeu o THE. É importante destacar que o menor comprimento do passo, assim como a maior variabilidade no comprimento do passo, compromete os mecanismos de equilíbrio, essenciais para a

manutenção de caminhada saudável e prevenção de quedas (UEMATSU *et al.*, 2014). Além disso, a diminuição da largura da base, após o THE, em relação aos animais da mesma idade que receberam o veículo, bem como aos animais aos 17 meses de idade, mostrou relação significativa entre idade, comprimento da passada e largura da passada. Estudos têm demonstrado que o declínio das capacidades musculares em idosos pode estar contribuindo para a diminuição do desempenho da marcha, pois a redução da força muscular afeta negativamente o desempenho da marcha (ANDERSON; MADIGAN, 2014; UEMATSU *et al.*, 2014). Portanto, as alterações no desempenho da marcha resultariam de estratégias compensatórias para aumentar a estabilidade e prevenir quedas devido às alterações fisiológicas que ocorrem no envelhecimento (GAMWELL *et al.*, 2022). De fato, proporcionar a manutenção desses aspectos da marcha para indivíduos em processo de envelhecimento, principalmente do sexo feminino, tem alta magnitude funcional e qualidade de vida, a fim de alavancar maior e melhor longevidade (BEIJERSBERGEN, *et al.*, 2013; STUDENSKI, *et al.*, 2011). Contudo, na senescência reprodutiva as mulheres estão suscetíveis a alterações hormonais que comprometem a expressão de receptores em células neurais e neurotransmissores, resultando em sintomas sistêmicos, funcionais e neuropsicológicos. Nosso estudo mostrou a importância da THE no período de transição da fase reprodutiva para o cessar da reprodução, com respostas positivas para a etologia, biomecânica e bioquímica encefálica positivas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtidos em nosso estudo nos condescendeu respostas aos questionamentos levantados inicialmente. De fato, a THE foi capaz de modificar os aspectos comportamentais de forma benéfica, reduzindo o perfil ansiogênico, bem como, mostrou-se capaz de conservar os processos mnemônicos por meio da menor perda dos neurônios no HP e LC. Também, proporcionou manutenção dos aspectos biomecânicos da marcha, aumentando qualidade da mesma, visando alavancar maior e melhor longevidade e mostrou ser bom auxiliador sobre equilíbrio do estado redox, conseguindo mostrar sua ação antioxidante mesmo frente tamanha problemática da presença de EROs, ambos benefícios são importantes neste período tão significativo na vida reprodutiva feminina. Afinal, esse estudo fornece evidências sobre eficácia da THE, mostrando que mudanças significantes ocorrem na etologia, biomecânica e bioquímica cerebral de ratas naturalmente envelhecidas e com prejuízo, neste período, na neurohomeostase. Portanto a administração do E₂ exógeno se vê como necessário, sobretudo no período de intensa irregularidade do ciclo, sinalizando este período como *janela crítica* na qual a administração do THE pode afetar positivamente a cognição, para reconduzir as funções realizadas anteriormente. Além disso, alertamos para a possibilidade de THE ser progressivamente mais explorada como recurso preventivo a distúrbios neuropsicológicas e neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121 – 126, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

AIMONE, J. B; LEE, S. W; CLEMENSON, G. D; DENG, W; GAGE, F. H. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 991 – 1026, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>.

AL-RAHBI, B; ZAKARIA, R; OTHMAN, Z; HASSAN, A; ISMAIL, Z. I. M; MUTHURAJU, S. Tualang honey supplement improves memory performance and hippocampal morphology in stressed ovariectomized rats. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 79 – 88, Jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.05.004>.

ANAND, K. S; DHIKAV, V. Hippocampus in health: an overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 15, n. 4, p. 239 – 246, Oct. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>.

ANDERSON, D. E; MADIGAN, M. L. Healthy older adults have insufficient hip range of motion and plantar flexor strength to walk like healthy young adults. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 5, p. 1104 – 1109, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.12.024>.

ATSMA, F; BARTELINK, M. L; GROBBEE, D. E; SCHOUW, Y. T. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. **Menopause**, v. 13, n. 2, p. 265 – 279, Mar. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.gme.0000218683.97338.ea>.

BARTSCH, T; DOHRING, J; REUTER, S; FINKE, C; ROHR, A; DEUSHL, G; JANSEN, O. WULFF, P. Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. Neuroscience, **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 11, p. 1836 – 1845, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.13>.

BEAN, L. A; LANOV, L; FOSTER, T. C. Estrogen receptors, hippocampus and memory. **Neuroscientist**, v. 20, n. 5, p. 534 – 545, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/10738584135198>.

BEIJERSBERGEN, C. M. I; GRANACHER, U; VANDERVOORT, A. A; DeVITA, P; HORTOBÁGYI, T. The biomechanical mechanism of how strength and power training improves walking speed in old adults remains unknown. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 618 – 627, Mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.03.001>.

BENZIE, I. F; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70 – 76, July 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BERRIDGE, C. W; WATERHOUSE, B. D. Locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 33 – 84, May 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(03)00143-7).

BEUTLER, E; DURON, O; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882 – 888, May 1963.

BORRÁS, C; GAMBINI, J; GOMÉZ-CABRERA, M. C; SASTRE, J; PALLARDÓ, F. V; MANN, G. E; VINÁ, J. 17β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2^[MAPK]/NF κ B cascade. **Aging Cell**, v. 4, n. 3, p. 113 – 118, Apr. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00151.x>.

BORRÁS, C; SASTRE, J; GARCIA-SALA, D; LLORET, A; PALLARDO, F. V; VINA, J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 5, p. 546 – 552, Mar. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01356-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01356-4).

BOTTON, P. H; COSTA, M. S; ARDAIS, A. P; MIORANZZA, S; SOUZA, D. O; ROCHA, J. B. T; PORCIÚNCULA, L. O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 254 – 259, Dec. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.034>.

BOULWARE, M. I; HEISLER, J. D; FRICK, K. M. The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 38, p. 15184 – 15194, Sep. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1716-13.2013>.

BOURGONJE, A. R; ABDULLE, A. E; AL-RAWAS, A. M; AL-MAGBALI, M; AL-SALEH, M; ENRIQUEZ, M. B; AL-SIYABI, S; AL-HASHMI, K; AL-LAWATI, I; BULTHUIS, M. L. C; MULDER, D. J; GORDIJN, S. J; GOOR, H. V; SALEH, J. Systemic oxidative stress is increased in postmenopausal women and independently associates with homocysteine levels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 314 – 327, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21010314>.

BRINTON, R. D. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571 – 3578, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>.

BRINTON, R. D; YAO, J; YIN, F; MACK, W. J; CADENAS, E. Perimenopause as a neurological transition state. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, p. 393 – 405, May 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>.

BRISKI, K. P; ALI, H; NAPIT, P. R. Sex-specific acclimation of A2 noradrenergic neuron dopamine- β -hydroxylase and estrogen receptor variant protein and 5'-AMP-Activated protein kinase reactivity to recurring hypoglycemia in rat. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 109, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101845>.

BROMBERGER, J. T; ASSMANN, S. F; AVIS, N. E; SCHOCKEN, M; KRAVITZ, H. M; CORDAL, A. Persistent mood symptoms in a multiethnic community cohort of pre and perimenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, n. 4, p. 347 – 356, Aug. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwg155>.

BRONZI, C. D; OROZCO, A. S. V; RODRIGUEZ, D; RASTRILLA, A. M; SOSA, Z. Y; CASAIS, M. Noradrenaline modulates the presence of gonadotropin-releasing hormone in ovary. The importance of its interrelation on the ovarian steroidogenesis and apoptosis on diestrus II in rat. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, p. 39 – 46, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.005>.

BROWN, M. W; AGGLETON, J. P. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 51 – 61, Jan. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/35049064>.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302 – 310, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

BURTON, C; CAMPBELL, P; JORDAN, K; STRAUSS, V; MALLIN, C. The association of anxiety and depression with future dementia diagnosis: a case-control study in primary care. **Family Practice**, v. 30, n. 1, p. 25 – 30, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/fampra/cms044>.

BYTYÇI, I; HENEIN, M. Y. Stride length predicts adverse clinical events in older adults: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 2670, Apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10122670>.

CAMAIONI, A; UCCI, M. A; CAMPAGNOLO, L; DE FELICI, M; KLINGER, F. G. The process of ovarian aging: it is not just about oocytes and granulosa cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, p. 783 – 792, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02478-0>.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, n. 1, p. 11 – 15, July 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.010>.

CHAKRABORTY, T. R; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 10, p. 977 – 987, Nov. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1177/15353702042290100>.

CLEMENS, J. A; BENNET, D. R. Do Aging changes in the preoptic area contribute to loss of cyclic endocrine function? **Journal of Gerontology**, v. 32, n. 1, p. 19 – 24, Jan. 1977. DOI: <https://doi.org/10.1093/geronj/32.1.19>.

COLLINS, B. C; LAAKKONEN, E. K; LOWE, D. A. Aging of the musculoskeletal system: how the loss of estrogen impacts muscle strength. **Bone**, v. 123, p. 137 – 144, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.033>.

CRISPIM-JUNIOR, C. F; PEDERIVA, C. N; BOSE, R. C; GARCIA, V. A; LINO-DE-OLIVEIRA, C; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral

and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257 – 264, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2011.12.002>.

CRUSIO, W. E; SCHWEGLER, H; ABELEN, J. H. F. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I: quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. **Behavioural Brain Research**, v. 32, n. 1, p. 75 – 80, Feb. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(89\)80074-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80074-9).

CRUZ, G; FERNANDOIS, D; PAREDES, A. H. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. **Reproduction**, v. 153, n. 2, p. 59 – 68, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>.

EARNHEART, J. C; SCHWEIZER, C; CRESTANI, F; IWASATO, T; ITOHARA, S; MOHLER, H; LÜSCHER, B. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3845 – 3854, Apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3609-06.2007>.

EICHENBAUM, H; OTTO, T; COHEN, N. J. Two functional components of the hippocampal memory system. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 17, n. 3, p. 449 – 472, Sep. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0140525X00035391>.

ENNACEUR, A; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47 – 59, Nov. 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X).

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244 – 254, Dec. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>.

ESPERANÇA, T. D. Análise dos diferentes períodos reprodutivos de fêmeas Wistar relacionadas à ação enzimática antioxidante e a deposição de lipofuscina no hipocampo. **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2019.**

EVANS, A. K; DEFENSOR, E; SHAMLOO, M. Selective vulnerability of the Locus Coeruleus noradrenergic system and its role in modulation of neuroinflammation, cognition, and neurodegeneration. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. 1030609, Nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1030609>.

FALCONI, A. P. Sex-based differences in the determinants of old age life expectancy: the influence of perimenopause. **Biodemography and Social Biology**, v. 63, n. 1, p. 54 – 70, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/19485565.2016.1273755>.

FERREIRA, L. B; NICOLA, A. C; ANSELMO-FRANCI, J. A; DORNELLES, R. C. M. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: preliminary findings. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 157 – 161, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.10.003>.

FINCH, C. E; FELICIO, L. S; MOBBS, C. V; NELSON, J. F. Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 4, p. 467 – 497, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1126/sageke.2002.37.cp19>.

FINCH, C. E. The menopause and aging, a comparative perspective. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 132 – 141, July 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010>.

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 3 α ,5 α -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 587 – 596, Nov. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00392-0](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00392-0).

GAMWELL, H. E; WAIT, S. O; SKINNER, J. W; ROYSTER, J. T; RITCH, B. L; POWELL, S. C. Aging and gait function: examination of multiple factors that influence gait variability. **Gerontology and Geriatric Medicine**, v. 8, p. 1 – 10, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1177/23337214221080304>.

GAO, Y; HUANG, C; ZHAO, K; MA, L; QIU, X; ZHANG, L; XIU, Y; CHEN, L; LU, W; HUANG, C; TANG, Y; XIAO, Q. Retracted: Depression as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 441 – 449, May 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/gps.3845>.

GASKIN, S; TARDIF, M; COLE, E; PITERKIN, P; KAYELLO, L; MUMBY, D. G. Object familiarization and novel-object preference in rats. **Behavioural Processes**, v. 83, n. 1, p. 61 – 71, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.10.003>.

GRECO, E. A; PIETSCHMANN, P; MIGLIACCIO, S. Osteoporosis and Sarcopenia increase frailty syndrome in the elderly. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. 255, Apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00255>.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 1, p. 1 – 14, Apr. 1984. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2190001>.

HAO, S; TAN, S; LI, J; LI, W; LI, J; CAI, X; HONG, Z. Dietary and Exercise Interventions for Perimenopausal Women: A Health Status Impact Study. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, n. 752500, Jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.752500>.

HARLOW, S. D; GASS, M; HALL, J. E; LOBO, R; MAKI, P; REBAR, R. W; SHERMAN, S; SLUSS, P. M; VILLIERS, T. J. Executive summary of the stages of reproductive aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1159 – 1168, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3362>.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422 – 427, Aug. 1972. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).

HEEB, M. M; YAHR, P. Cell-body lesions of the posterodorsal preoptic nucleus or posterodorsal medial amygdala, but not the parvicellular subparafascicular thalamus, disrupt mating in male gerbils. **Physiology & Behavior**, v. 68, n. 3, p. 317 – 331, Jan. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00182-1).

HENES, M; HUEBNER, S. Hormone therapy in the peri- and postmenopause. **Der Internist**, v. 61, p. 558 – 564, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00789-x>.

HERBISON, A. E. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 1 – 6, Jan. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1530/ror.0.0020001>.

HERSON, M; KULKARNI, J. Hormonal agents for the treatment of depression associated with the menopause. **Drugs & Aging**, v. 39, p. 607 – 618, July 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40266-022-00962-x>.

HOSNY, S; JENNES, L. Identification of alpha1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurons of the female rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, n. 9, p. 687 – 692, Sep. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1998.00256.x>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População cresce, mas número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua: envelhecimento populacional**, 2022.

IZQUIERDO, I; LIA, R. M. B; ROSSATO, J. I; BONINI, J. S; MEDINA, J. H; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496 – 505, Sep. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>.

JAMES, T; KULA, B; CHOI, S; KHAN, S. S; BEKAR, L. K; SMITH, N. A. Locus coeruleus in memory formation and Alzheimer's disease. **The European Journal of Neuroscience**, v. 54, n. 8, p. 6949 – 6959, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejn.15045>.

JOSEPH, A. M; ADIHETTY, P. J; WAWRYNIAK, N. R; WOHLGEMUTH, S. E; PICCA, A; KUJOTH, G. C; PROLLA, T. A; LEEUWENBURGH, C. Dysregulation of mitochondrial quality control processes contribute to sarcopenia in a mouse model of premature aging. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1 – 11, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069327>.

KOEBELE, S. V; NISHIMURA, K. J; BIMONTE-NELSON, H. A; KEMMOU, S; ORTIZ, J. B; JUDD, J. M; CONRAD, C. D. A long-term cyclic plus tonic regimen of 17 β -estradiol improves the ability to handle a high spatial working memory load in ovariectomized middle-aged female rats. **Hormones and Behavior**, v. 118, n. 104656, p. 1 – 13, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104656>.

KHADIKAR, S. S. Musculoskeletal disorders and menopause. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 69, n. 2, p. 99 – 103, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13224-019-01213-7>.

KIM, G. H; KIM, J. E; RHIE, S. J; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325 – 340, Oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>.

KUNDAKOVIC, M; ROCKS, D. Sex hormone fluctuation and increased female risk for depression and anxiety disorders: from clinical evidence to molecular mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 66, n. 101010, July 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.101010>.

LANDA, J. F. R; ESCOBEDO, J. C; OLGUÍN, A. P; DOMINGUEZ, E. R; MORALES, B. B; HUERTA, E. V. H; TORRES, A. S. The phytoestrogen genistein produces similar effects as 17 β -estradiol on anxiety-like behavior in rats at 12 weeks after ovariectomy. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1 – 10, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9073816>.

LEVINTA, A. MUKOVOZOV, I. Neuroprotective role of estrogen receptor- β in Alzheimer's disease pathology. **University of Toronto Medical Journal**, v. 93, n. 2, p. 27 – 30, Mar. 2016.

LIU, N; ZHANG, Y; LIU, S; ZHANG, X; LIU, H. Brain functional changes in perimenopausal women: an amplitude of low-frequency fluctuation study. **Menopause**, v. 28, n. 4, p. 384 – 390, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001720>.

LONG, J. A; EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Berkeley: University of California Press**; 1922.

LOVICK, T. A; ZANGROSSI-Jr, H. Effect of estrous cycle on behavior of females in rodent tests of anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711065>.

LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, N. J; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265 – 275, Jan. 1951. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

LUCKEY, A. M; ROBERTSON, I. H; LAWLOR, B; MOHAN, A; VANNESTE, S. Sex differences in locus coeruleus: a heuristic approach that may explain the increased risk of Alzheimer's Disease in females. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 83, n. 2, p. 505 – 522, Sep. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3233/JAD-210404>.

LU, K. H; HOPPER, B. R; VARGO, T. M; YEN, S. S. C. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. **Biology of Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 193 – 203, Aug. 1979. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.193>.

MADISON, D. V; NICOLL, R. A. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 372, n. 1, p. 221 – 244, Mar. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016006>.

MAGGI, R; CARIBONI, A. M; MARELLI, M. M; MORETTI, R. M; ANDRÉ, V. MARZAGALLI, M. LIMONTA, P. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 1, p. 358 – 381, May/June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv059>.

MA, J; HU, J; WANG, X; ZHANG, S; LI, Z; LIU, J. Improvement of cardiovascular function in aging females by the prolonged activation of G protein-coupled estrogen receptor. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 16, p. 371 – 381, Sep. 2022. DOI: <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12265-022-10315-z>.

MA, Y; LIU, M; YANG, L; ZHANG, L; GUO, H; GIN, P; HOU, W. Loss of estrogen efficacy against hippocampus damage in long-term OVX mice is related to the reduction of hippocampus local estrogen production and estrogen receptor degradation. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 3540 – 3551, June 2020. DOI: <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12035-020-01960-z>.

MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of biochemistry**, v. 47, p. 469 – 474, June 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.

MAROSI, K; FELSZEGHY, K; MEHRA, R. D; RADÁK, Z; NYAKAS, C. Are the neuroprotective effects of estradiol and physical exercise comparable during ageing in female rats? **Biogerontology**, v. 13, n. 4, p. 413 – 427, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10522-012-9386-3>.

MARTINS-AFFÉRI, M. P; FERREIRA-SILVA, I. A; FRANCI, C. R; ANSELMO-FRANCI, J. A. LHRH release depends on locus coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. **Brain Research Bulletin**, v. 61, n. 5, p. 521 – 527, Sep. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00190-4).

MATHER, M. Noradrenaline in the aging brain: Promoting cognitive reserve or accelerating Alzheimer's disease? **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 116, p. 108 – 124, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.013>.

McEWEN, B. S; AKAMA, K. T; SPENCER-SEGAL, J. L; MILNER, T. A; WATERS, E. M. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 1, p. 4 – 16, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1037/a0026708>.

MELO-CARPES, P. B; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract → nucleus paragigantocellularis → locus coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56 – 63, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.002>.

MERCAN, D; HENEKA, M. T. The contribution of the Locus Coeruleus–noradrenaline system degeneration during the progression of Alzheimer’s disease. **Biology**, v. 11, n. 12, Dec. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11121822>.

MESQUITA, C. S; OLIVEIRA, R; BENTO, F; GERALDO, D; RODRIGUES, J. V; MARCOS, J. C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69 – 71, Aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.

MISHRA, A; WANG, Y; YIN, F; VITALI, F; RODGERS, K. E; SOTO, M; MOSCONI, L; WANG, T; BRINTON, R. D. A tale of two systems: lessons learned from female mid-life aging with implications for Alzheimer’s prevention & treatment. **Ageing Research Reviews**, v. 74, p. 1 – 12, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101542>.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254 – 260, 1955. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0043788>.

MORAES, V. F; MOTTA, L. C. A. S; BRUNO, F; DUTRA-CORREA, M; PERES, G. B; COSTA, C; COELHO, C. P. Homeopathy in senescence/senility: experimental model. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 40907 – 40923, June 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-579>.

MORAIS, S. R. L. Influence of estrogen hormone therapy and strength training on the skeletal muscle tissue of senile rats. **UNESP Repository**, Araçatuba, 2016. <http://hdl.handle.net/11449/144297>.

MOREAU, K. L; HILDRETH, K. L; KLAUITTER, J; BLATCHFORD, P; KOHRT, W. M. Decline in endothelial function across the menopause transition in healthy women is related to decreased estradiol and increased oxidative stress. **GeroScience**, v. 42, p. 1699 – 1714, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00236-7>.

NASTO, L. A; ROBINSON, A. R; NGO, K; CLAUSON, C. L; DONG, Q; CROIX, C; SOWA, G; POLA, E; ROBBINS, P. D; KANG, J; NIEDERNHOFER, L. J; WIPF, P; VO, N. Mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration. **Journal of Orthopedic Research**, v. 31, n. 7, p. 1150 – 1157, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.22320>.

NEWHOUSE, P; DUMAS, J. Estrogen–cholinergic interactions: Implications for cognitive aging. **Hormones and Behavior**, v. 74, p. 173 – 185, Aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.022>.

NICOLA, A. C; FERREIRA, L. B; MATA, M. M; VILHENA-FRANCO, T; LEITE, C. M; MARTINS, A. B; ANTUNES-RODRIGUES, J; POLETINI, M. O; DORNELLES, R. C. M. Vasopressinergic activity of the suprachiasmatic nucleus and mRNA expression of clock genes in the Hypothalamus–Pituitary–Gonadal axis in female Aging. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, n. 652733, p. 1 – 13, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.652733>.

NICOLA, A. C; LEITE, C. M; BATISTA, M. M. N; CASTRO, J. C. B; ANSELMO-FRANCI, J. A; DORNELLES, R. C. M. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Experimental Gerontology**, v. 81, p. 19 – 27, Aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.04.015>.

NILSEN, J. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 463 – 475, Oct. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.12.005>.

OLIVEIRA, N. P; KALIL, B; LEITE, C. M; CAROLINO, R. O. G; DEBARBA, L. K; ELIAS, L. L. K; RODRIGUES, J. A; FRANCI, J. A. A. Effects of estrogen therapy on the serotonergic system in an animal model of perimenopause induced by 4-vinylcyclohexen diepoxide (VCD). **eNeuro**, v. 5, n. 1, Jan/Feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0247-17.2017>.

OTT, M; GOGVADZE, V; ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913 – 922, Feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>.

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. **Physiology & Behavior**, v. 87, n. 4, p. 828 – 835, Apr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.02.002>.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 2007.

PEREIRA, A; RAWSON, J; JAKUBOWSKA, A; CLARKE, I. J. Estradiol-17 β -responsive A1 and A2 noradrenergic cells of the brain stem project to the bed nucleus of the stria terminalis in the ewe brain: a possible route for regulation of gonadotropin releasing hormone cells. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 758 – 773, Feb. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.027>.

PEREIRA, L. M; GUIMARÃES, I. M; OLIVEIRA, V. E. M; BASTOS, C. P; RIBEIRO, F. M; PRADO, V. F; PRADO, M. A. M; PEREIRA, G. S. Estradiol effect on short-term object memory under hypocholinergic condition. **Brain Research Bulletin**, v. 140, p. 411 – 417, June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.012>.

PERTESI, S; COUGHLAN, G; PUTHUSSERYPPADY, V; MORRIS, E; HORNBERGER, M. Menopause, cognition and dementia. **Post Reproductive Health**, v. 25, n. 4, p. 200 – 206, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1177/2053369119883485>.

PESONEN, H; LAAKONEN, E. K; HAUTASAARI, P; AUKEE, P; KOVANEN, V; SIPILA, S; FINNI, T; TARKKA, I. M. Perimenopausal women show modulation of excitatory and inhibitory neuromuscular mechanisms. **BMC Women's Health**, v. 21, n. 133, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-021-01275-8>.

PESTANA, J. E; ISLÃ, N; VAN-DER-EYK, N. L; GRAHAM, B.M. What pre-clinical rat models can tell us about anxiety across the menstrual cycle in healthy and clinically

anxious humans. **Current Psychiatry Reports**, v. 24, p. 697 – 707, Oct. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11920-022-01376-7>.

PESTANA, J. E; KERSHAW, K. A; GRAHAM, B. M. The impact of the ovarian cycle on anxiety, allopregnanolone, and corticotropin releasing hormone changes after motherhood in female rats and women. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 183, May 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02480-9>.

PIVETTA, M; ZORZETTO, R. Os Mecanismos do Envelhecimento. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 254, p. 18 – 25, Jan. 2018.

PRISCO, N; CHEMIAKINE; LEE, W; BOTTA, S; GENNARINO, V. A. Protocol to assess the effect of disease-driving variants on mouse brain morphology and primary hippocampal neurons. **Stars Protocols**, v. 3, n. 2, June 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101244>.

RAMOS, A. P. S; RIBEIRO, J. F. S; TRAJANO, L. A. S. N; SILVA, M. A. S; TRAJANO, L. A. S. N. Hospitalized women have anxiety and worse mental health scores than men. **Psychological Reports**, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1177/00332941221088967>.

ROCCA, W. A; BOWER, J. H; MARAGANORE, D. M; AHLISKOG, J. E; GROSSARDT, B. R; ANDRADE, M; MELTON, L. J. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. **Neurology**, v. 68, n. 11, p. 1074 – 1083, Sep. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276984.19542.e6>.

RODGERS, R. J; DALVI, J. C. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801 – 810, Nov. 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9).

ROSSATO, J. I; BEVILAQUA, L. R. M; MYSKIW, J. C; MEDINA, J. H; IZQUIERDO, I; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning Memory**, v. 14, p. 36 – 46, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1101/lm.422607>.

ROSENZWEIG, E. S; BARNES, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics and cognition. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 3, p. 143 – 149, Feb. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00126-0).

RUBIN, B. S; LEE, C. E; KING, J. C. A reduced proportion of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons express Fos protein during the preovulatory or steroid-induced LH surge in middle-aged rats. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1264 – 1272, Dec. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.6.1264>.

SARA, S. J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 211 – 223, Mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn2573>.

SCHEYER, O; RAHMAN, A; HRISTOV, H; BERKOWITZ, C; ISAACSON, R. S; BRINTON, R. D; MOSCONI, L. Female sex and Alzheimer's risk: the menopause connection. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 5, n. 4, p. 225 – 230, Sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.34>.

SEEMAN, M. V. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. **The American Journal of Psychiatry**, v. 154, n. 12, p. 1641 – 1647, Dec. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1176/ajp.154.12.1641>.

SERVIENTE, C; TROY, L. M; JONGE, M; SHILL, D. D; JENKINS, N. T; WITKOWSKI, S. Endothelial and inflammatory responses to acute exercise in perimenopausal and late postmenopausal women. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 5, p. R841 – R850, Aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00189.2016>.

SHETTY, S. M; SAJIKUMAR, S. 'Tagging' along memories in aging: synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. **Aging Research Reviews**, v. 35, p. 22 – 35, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.008>.

SINGH, P; PARAMANIK, V. Neuromodulating roles of estrogen and phytoestrogens in cognitive therapeutics through epigenetic modifications during aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, n. 945076, p. 1 – 9, Aug. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.945076>.

SMALL, D. M; BENNET, N. C; ROY, S; GABRIELLI, B. G; JOHNSON, D. W; GOBE, G. C. Oxidative stress and cell senescence combine to cause maximal renal tubular epithelial cell dysfunction and loss in an in vitro model of kidney disease. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 122, n. 1-2, p. 123 – 130, Nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1159/000350726>.

SPENCER, J. L; WATERS, E. M; ROMEO, R. D; WOOD, G. E; MILNER, T. A; McEWEN, B. S. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 219 – 237, May 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.08.006>.

STALEY, K; SCHARFMAN, H. A woman's prerogative. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 697 – 699, June 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn0605-697>.

STOPA, L. R; SOUZA, C. F; MARTINS, A. B; LOPES, G. M; COSTA, N. O; GERARDIN, D. C. C; CARVALHO, G. G; ZAIA, C. T. B. V; UCHOA, E. T; LEITE, C. M. Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 524, p. 111 – 147, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111147>.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T; MORAIS, S. R. L; FERNANDES, F. PEREZ-UENO, M. J; ALMIEDA, R. P; LOUZADA, M. J. Q; CHAVEZ-NETO, A. H; ERVOLINO, E; DORNELLES, R. C. M. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1 – 12, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13098-5>.

STUDENSKI, S; PERERA, S; PATEL, K; ROSANO, C; FAULKNER, K; INZITARI, M; BRACH, J; CHANDLER, J; CAWTHON, P; CONNOR, E. B; NEVITT, M; VISSER, M; KRITCHEVSKY, S; BADINELLI, S; HARRIS, T; NEWMAN, A; CAULEY, J; FERRUCCI, L; GURALNIK, J. Gait speed and survival in older adults. **JAMA**, v. 305, n. 1, p. 50 – 58, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1923>.

SUN, X; CHEN, W. D; WANG, Y. D. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 221, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>.

SUKIKARA, M. H; MOTA-ORTIZ, S. R; BALDO, M. V; FELÍCIO, L. F; CANTERAS, N. S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2583 – 2589, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4279-05.2006>.

TAKUMA, K; MATSUO, A; HIMENO, Y; HOSHINA, H; OHNO, Y; FUNATSU, Y; ARAI, S; KAMEI, H; MIZOGUCHI, H; NAGAI, T; KOIKE, K; INOUE, M; YAMADA, K. 17 β -estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v. 146, n. 1, p. 60 – 68, Apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.017>.

TAVARES, R. E; JESUS, M. C. P; MACHADO, D. R; BRAGA, V. A. S; TOCANTINS, F. R; MERIGHI, M. A. B. Healthy aging from the perspective of the elderly: an integrated review. **Revista Brasileira em Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 6, p. 878 – 889, Nov/Dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-22562017020.170091>.

TAXIER, L. R; GROSS, K. S; FRICK, K. M. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, p. 535 – 550, July 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7>.

TEPPER, P. G; RANDOLPH, J. R; McCONNELL, D. S; CRAWFORD, S. L; EL-KHOUDARY, S. R; JOFFE, H; GOLD, E. B; ZHENG, H; BROMBERGER, J. T; SUTTON-TYRRELL, K. Trajectory clustering of estradiol and follicle-stimulating hormone during the menopausal transition among women in the Study of Women's Health across the Nation (SWAN). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 8, p. 2872 – 2880, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1422>.

UDDIN, S. M; RAHMAN, M; JAKARIA, M; RAHMAN, S; HOSSAIN, S; ISLAN, A; AHMED, M; MATHEW, B; OMAR, U. M; BARRETO, G. E; ASHRAF, G. Estrogen signaling in Alzheimer's Disease: molecular insights and therapeutic targets for Alzheimer's dementia. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 2654 – 2670, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01911-8>.

UEMATSU, A; TSUCHIYA, K; KADONO, N; KOBAYASHI, H; KAETSU, T; HORTOBÁGYI, T; SUZUKI, S. A behavioral mechanism of how increases in leg strength improve old adults' gait speed. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1 – 7, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110350>.

UTKIN, Y. N. Aging affects nicotinic acetylcholine receptors in brain. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 119 – 124, Aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871524919666190320102834>.

VIEIRA, A. D. C; MEDEIROS, E. B; ZABOT, G. C; PEREIRA, N. S; NASCIMENTO, N. B; LÍDIO, A. V; SCHEFFER, A. K; REMPEL, L. C. T; MACARINI, B. M. N; COSTA, M. A; GONÇALVES, C. L; KUCHARSKA, E; RODRIGUES, M. S; MOREIRA, J. C. F; OLIVEIRA, J; BUDNI, J. Neuroprotective effects of combined therapy with memantine, donepezil, and vitamin D in ovariectomized female mice subjected to dementia model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 122, n. 2, Mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110653>.

VINÃ, J; SASTRE, J; PALLARDÓ, F. V; GAMBINI, J; BORRÁS, C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1359 – 1365, June 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715760600952851>.

WADA, T; SAMESHIMA, A; YONEZAWA, R; MORITA, M; SAWAKAWA, K; TSUNEKI, H; SASAOKA, T; SAITO, S. 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, Dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209859>.

WALF, A. A; PARIS, J. J; FRYE, C. A. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 909 – 916, July 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004>.

WANG, C. H; WU, S. B; WU, Y. T; WEI, Y. H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 5, p. 450 – 460, May 2013. DOI: <https://doi.org/10.1177/1535370213493069>.

WANG, Q; OYARZABAL, E. A; SONG, S; WILSON, B; SANTOS, J. H; HONG, J. S. Locus coeruleus neurons are most sensitive to chronic neuroinflammation-induced neurodegeneration. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 359 – 368, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.003>.

WEISS, G; SKURNICK, J. H; GOLDSMITH, L. T; SANTORO, N. F; PARK, S. J. Menopause and hypothalamic-pituitary sensitivity to estrogen. **JAMA**, v. 292, n. 94, p. 2991 – 2996, Dec. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.292.24.2991>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325 – 333, 1981. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375 – 384, Apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>.

WIERMAN, M. E; KISELJAK-VASSILIADES, K; TOBET, S. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 1, p. 43 – 52, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.07.005>.

WNUK, A.; PRZEPIÓRSKA, K.; PIETRZAK, B.A.; KAJTA, M. Emerging evidence on membrane estrogen receptors as novel therapeutic targets for central nervous system pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4043, Feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24044043>.

XU, X; ZHANG, P; LI, X; LIANG, Y; OUYANG, K; XIONG, J; WANG, D; DUAN, L. MicroRNA expression profiling in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis before and after estrogen treatment. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 8, p. 4251 – 4263, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/1943-8141/AJTR0107469>.

YIN, W; GORE, A. C. Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 403 – 414, Mar. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00617>.

YU, Z; JIAO, Y; ZHAO, Y; GU, W. Level of estrogen in females – the different impacts at different Life stages. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 12, Dec. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm12121995>.

ZÁRATE, S; STEVNSNER, T; GREDILLA, R. Role of estrogen and other sex hormones in brain aging. Neuroprotection and DNA repair. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. 430, p. 1 – 22, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00430>.

ZHAO, L; WU, T. W; BRINTON, R. D. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 1010, n. 1-2, p. 22 – 24, June 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.066>.

ZUANON, A. C. A. Instinct, etology and the Konrad Lorenz theory. **Ciência & Educação**, v. 13, p. 337 – 349, Dec. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-73132007000300005>.

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação comportamental e neuroquímica do Locus Coeruleus e Hipocampo após terapia hormonal no período da periestrofpausa de ratas Wistar**", Processo FOA nº 0850-2021, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Dezembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Fevereiro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Março de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Behavioral and neurochemical evaluation of Locus Coeruleus and Hippocampus after hormone therapy in the period of periestrofpausa of Wistar rats**", Protocol FOA nº 0850-2021, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 17, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 07, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 07, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br