

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

SUELLEM BATISTA CAPETTINI

MEMÓRIA E APRENDIZADO EM CAMUNDONGOS
FÊMEAS DEFICIENTES DO TRANSPORTADOR
VESICULAR DE ACETILCOLINA

Belo Horizonte

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SUELLEM BATISTA CAPETTINI

**MEMÓRIA E APRENDIZADO EM CAMUNDONGOS
FÊMEAS DEFICIENTES DO TRANSPORTADOR
VESICULAR DE ACETILCOLINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Grace Schenatto Pereira

Belo Horizonte

2009

À minha amada mãe

“Valeu a pena?
Tudo vale a pena se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do bojador,
Tem que passar além da dor.
Deus, ao mar, o perigo e o abismo deu,
Mas foi nele que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter morrido em meu lugar e me dado vida em abundância. Obrigada por iluminar meu caminho, mostrar-me o verdadeiro sentido da vida e me fazer acreditar que nada é impossível quando a causa é justa e a vontade verdadeira. Agradeço por confortar o meu coração nas horas mais difíceis, pela coragem e pelas inúmeras bênçãos alcançadas.

À minha orientadora **Grace Schenatto Pereira** por ter me iniciado na carreira científica, pela oportunidade, confiança, inúmeros ensinamentos e amizade. Sua inteligência e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação.

À minha mãe **Ednalva Batista de Sousa Capettini**, meu alicerce, minha primeira e “eterna” professora. Obrigada pelo grande amor, dedicação, educação, carinho, força, incentivo e pelas orações. Mãezinha, muito obrigada pela disposição incondicional em me ajudar a conquistar os meus objetivos e por compreender a minha ausência. Seu entusiasmo, sua coragem e seu empenho me estimulam a ser uma pessoa melhor a cada amanhecer. És a razão do meu viver. Te amo!

Ao meu pai **Levi Aggum Capettini** (*in memoriam*). “Foram tantos os momentos da minha vida que te procurei e não te encontrei. Momentos de fraquezas, alegrias e incertezas, faltava você para me apoiar, me abraçar e brindar comigo as alegrias da vida. Hoje comemoro mais uma importante conquista e como seria bom tê-lo aqui neste momento! Poder ver seu sorriso e suas lágrimas de alegria ao compartilhar comigo esta vitória”. Sinto saudades da sua alegria e bondade inconfundíveis. Espero que esteja orgulhoso da luta de seus filhos. Paizinho, eu sempre vou te amar!

Ao meu maninho querido **Haynner Batista Capettini**, companheiro certo nas horas incertas. Obrigada pelo amor, incentivo, força e atenção. Tenho muito orgulho de você e do amor que nos une. Seu bom-humor me impulsiona nos momentos de desânimo e seu alto-astrol me enche de energia quando surgem os obstáculos.

À minha querida cunhada **Geovana Sinhorelo Campos** pelo carinho, amizade, incentivo e por fazer o meu irmão feliz. É maravilhoso ter vocês em minha vida e me sentir tão amada. Amo vocês!

Ao meu grande amor **Giovanni Margotto Bertollo**. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, pelo companheirismo, paciência, carinho, por me amar e me fazer feliz. Obrigada por ser meu companheiro de *sonhos*, pois sabemos que “sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade” e de mãos dadas podemos ir além. O futuro é incerto, mas é certo que estaremos juntos, porque do seu lado sou mais forte e você é o meu norte. Meu príncipe: “Te amo tanto, de uma forma tão tremenda e desmedida, que tenho medo de no decorrer da minha vida não ter tempo suficiente para muito te amar”.

Ao **Tio Clóvis**, **Tia Anita** e **Heloyse** pelo incentivo, carinho e por terem me acolhido de braços abertos. Vocês acompanharam o início da minha inquietação pela busca de aprendizado e sabem o quanto esta conquista é importante em minha vida.

Às queridas tias: **Tia Ni**, **Tia Dena** e **Tia Léia** pelo exemplo de vida, pelo amor, incentivo e orações.

À querida cunhada **Caryne Margotto Bertollo** por ter aberto para mim todas as portas possíveis em Belo Horizonte, tornando possível a realização deste sonho. Sem sua ajuda não teria chegado até aqui, por isso divido com você esta conquista. Obrigada pela confiança, amizade e apoio.

Agradeço também ao **Alisson Bruno Luzia** (e toda sua família) pelo carinho e amizade.

À querida **D. Aida** pelo carinho, apoio e pelas orações. E ao **Sr. Zezinho** pela torcida e incentivo.

Aos amigos do Núcleo de Neurociência meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento, cumplicidade e agradáveis momentos:

Daniela, Luciana, Maira, Mariele, Maura, Patrícia, Cristiane, Daniel, Hércules, Flávio, Naiara, Iva, Cristina, Isabela, Thiago, Gustavo Lopes, Onésia, Danielle, Natália, Marcelo, João, Guilherme, Tupete, Gabriel, André, Tiomega, Taquinho, Ana, José Maurício e Aila.

É um orgulho fazer parte da família NNC e é com muita satisfação que agradeço os momentos em que pude absorver um pouquinho da experiência profissional de cada um de vocês.

Aos professores **Márcio Flávio Dutra Moraes, André Ricardo Massensini, Maria Carolina Doretto, Juliana Tavares, Adelina Martha dos Reis, Tasso**

Moraes e Santos e Miguel Houry Neto pelo exemplo, confiança e ensinamentos valiosos.

Às Ladies: **Dani, Lú, Mairoca, Mari, Maura e Pat** pelo carinho, amizade, companheirismo e bons conselhos. Obrigada por terem tornado minha jornada mais agradável, compartilhando comigo de decepções e vitórias. Amigas queridas, vocês são valiosos presentes que a vida me concedeu. Com vocês vivi, aprendi e cresci. Amo vocês!

À **Mariana, Cristiane, Ana, Bráulio, Renata, Xavier e Diogo** pelo auxílio e contribuição na realização deste trabalho.

À **Rose** pela amizade e agradáveis momentos.

À **Adriana Helena Moreira** pelos conselhos, carinho, incentivo em seguir a carreira científica e por ter me acolhido de coração aberto.

Às amigas queridas **Jamilly, Fernanda Segall e Fernanda Segatto** pela cumplicidade e incentivo. Mesmo distante sinto de perto o carinho de vocês.

Ao **Chris Loyd**, representante do ANY-MAZETM no Brasil, por ter possibilitado a realização automatizada dos experimentos de comportamento.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia** pela confiança.

À **FAPEMIG** por ter me proporcionado a oportunidade de me dedicar exclusivamente à realização deste trabalho.

Aos **cidadãos brasileiros** que custeiam a educação pública, sem a qual não seria possível alcançar este sonho.

Finalmente, agradeço **aos animais** que, involuntariamente e em essência, participam dos processos inerentes a essa incessante busca por satisfação da curiosidade humana pelos grandes mistérios da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	
1.1 MEMÓRIA.....	18
1.1.1 Memória de trabalho - MT.....	18
1.1.2 Memória de curta duração - MCD.....	19
1.1.3 Memória de longa duração - MLD.....	19
1.1.4 Memória explícita.....	20
1.1.5 Memórias implícitas.....	21
1.2 SISTEMA COLINÉRGICO.....	22
1.2.1 Classificação dos neurônios colinérgicos no SNC.....	26
1.3 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS.....	29
1.3.1 Neurônios colinérgicos, estrógenos e cognição.....	30
1.4 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	34
1.4.1 Estresse oxidativo e DA.....	35
1.4.2 Estrógenos e DA.....	37
1.5 MODELO ANIMAL VAcHt KNOCKDOWN (VAcHt KD).....	39
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	
2.1 JUSTIFICATIVA.....	42
2.2 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2.1 Objetivos específicos.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	46

3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL POR ESFREGAÇO VAGINAL.....	47
3.3 AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	49
3.3.1 Labirinto em Y.....	49
3.3.2 Tarefas de reconhecimento de objetos - RO.....	50
3.3.2.1 Memória de reconhecimento do objeto novo.....	54
3.3.2.2 Memória de localização espacial de objeto.....	54
3.4 PRIVAÇÃO HORMONAL.....	56
3.4.1 Cirurgia de ovariectomia (OVX) e cirurgia <i>sham</i>.....	56
3.4.2 Controle da eficiência da cirurgia.....	56
3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	57
3.5.1 Preparo do homogenato.....	57
3.5.2 Dosagem de proteínas.....	58
3.5.3 Medida da peroxidação lipídica.....	59
3.5.4 Atividade da superóxido dismutase - SOD.....	60
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
4. RESULTADOS	
4.1 CONTROLE DO CICLO ESTRAL.....	69
4.2 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VACHT KD.....	71
4.2.1 Memória de trabalho - MT.....	71
4.2.2 Memória de reconhecimento de objetos: MCD.....	72
4.2.3 Memória de reconhecimento de objetos: MLD.....	74
4.2.4 Memória de localização espacial de objetos: ME.....	75
4.3 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VACHT KD ^{HET} SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS.....	76
4.3.1 Memória de trabalho - MT.....	76
4.3.2 Memória de reconhecimento de objetos: MCD.....	79
4.3.3 Memória de reconhecimento de objetos: MLD.....	81
4.3.4 Memória de localização espacial de objetos: ME.....	83
4.3.5 Eficiência da cirurgia.....	85

4.4 ESTRESSE OXIDATIVO EM FÊMEAS VACHT KD ^{HET} SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS DURANTE 90 DIAS.....	85
---	----

5. DISCUSSÃO

5.1 SISTEMA COLINÉRGICO E CICLO ESTRAL.....	89
5.2 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VACHT KD INTACTAS.....	93
5.3 DIFERENÇAS COGNITIVAS ENTRE MACHOS E FÊMEAS VACHT KD ^{HET}	97
5.4 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VACHT KD ^{HET} APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE PRIVAÇÃO HORMONAL.....	98
5.4.1 Efeito da privação hormonal na MT.....	99
5.4.2 Efeito da privação hormonal na MCD das fêmeas VACHT KD^{HET}	101
5.4.3 Efeito da idade na MCD das fêmeas VACHT KD^{HET}	102
5.4.4 Efeito da privação hormonal na ME.....	103
5.4.5 Privação dos hormônios ovarianos prejudica seletivamente algumas memórias.....	105
5.4.6 Modulação diferencial da MCD e MLD.....	107
5.5 FÊMEAS VACHT KD ^{HET} OVX APRESENTAM AUMENTO NOS NÍVEIS DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	110
6. CONCLUSÕES.....	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
APP	Proteína precursora amilóide
CAE	Comportamento de alternância espontânea
CG	Células da granulosa
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
DA	Doença de Alzheimer
E₂	17 β -estradiol
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotrofinas
IR	Índice de reconhecimento
JNM	Junção neuromuscular
LH	Hormônio luteinizante
LTP	Potenciação de longa duração
MCD	Memória de curta duração
MDA	Malonaldeído
ME	Memória espacial
MLD	Memória de longa duração
MT	Memória de trabalho
OVX	Ovariectomia ou ovariectomizada
P₄	Progesterona
PTN	Proteína
RE	Receptor de estrógeno
RO	Reconhecimento de objetos
RP	Receptor de progesterona

SNC	Sistema nervoso central
TBA`	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRH	Terapia de reposição hormonal
VACHT KD^{HET}	Camundongo “knockdown” heterozigoto para o VACHT
VACHT KD^{HOM}	Camundongo “knockdown” homozigoto para o VACHT
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina
WT	Camundongo selvagem - <i>wild type</i>
βA	Peptídeo beta-amilóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica	24
Figura 2 - Figura representativa da distribuição dos neurônios colinérgicos no SNC de ratos	27
Figura 3 - Citologia do esfregaço vaginal de camundongos em diferentes fases do ciclo estral	47
Figura 4 - Desenho representativo dos testes de reconhecimento de objetos	55
Figura 5 - Design Experimental: Caracterização do ciclo estral das fêmeas VAcHT KD ^{HET} e VAcHT KD ^{HOM}	62
Figura 6 - Design experimental: Avaliação do desempenho cognitivo das fêmeas VAcHT KD ^{HET} e VAcHT KD ^{HOM}	63
Figura 7 - Design experimental: Avaliação do desempenho cognitivo das fêmeas VAcHT KD ^{HET} submetidas à privação dos hormônios ovarianos por 7 dias e 90 dias.....	65
Figura 8 - Design experimental: Medidas bioquímicas dos marcadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex de animais submetidos à privação dos hormônios ovarianos por aproximadamente 100 dias.....	66
Figura 9 - Ciclo estral de fêmeas do grupo controle, VAcHT KD ^{HET} e VAcHT KD ^{HOM}	70
Figura 10 - CAE e número de entradas nos braços do labirinto em Y das fêmeas WT, VAcHT KD ^{HET} e VAcHT KD ^{HOM}	72
Figura 11 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MCD de fêmeas intactas	73
Figura 12 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MLD de fêmeas intactas.....	74
Figura 13 - Índice de reconhecimento na tarefa de localização espacial do objeto para avaliação da ME de fêmeas intactas.....	76
Figura 14 - CAE e número de entradas nos braços do labirinto em Y em fêmeas WT e VAcHT KD ^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração	78

Figura 15 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MCD de fêmeas WT e VChT KD ^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração	80
Figura 16 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MLD de fêmeas WT e VChT KD ^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração	82
Figura 17 - Índice de reconhecimento na tarefa de localização espacial do objeto para avaliação da ME de fêmeas WT e VChT KD ^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração	84
Figura 18 - Níveis dos marcadores de estresse oxidativo no córtex e hipocampo de animais WT e VChT KD ^{HET} após privação hormonal de longa duração	86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultado do acompanhamento do ciclo estral durante 19 dias em oito animais de cada genótipo..... 69
- Tabela 2** - Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino de diferentes tarefas de RO: MCD, MLD e ME. 73
- Tabela 3** - Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino em diferentes tarefas de reconhecimento de objetos: MCD, MLD e ME..... 84
- Tabela 4** - Quadro comparativo do desempenho cognitivo de machos e fêmeas WT e VACHT KD.....97
- Tabela 5** - Quadro comparativo do desempenho cognitivo de fêmeas WT e VACHT KD submetidas à ovariectomia.....110

RESUMO

A degeneração colinérgica, os déficits cognitivos e o estresse oxidativo são características neuropatológicas da Doença de Alzheimer (DA) e evidências sugerem que a depleção dos hormônios sexuais femininos é um fator de risco para o desenvolvimento dessa doença. A possibilidade de avaliar estes fatores num único grupo experimental impulsionou o desenvolvimento deste trabalho. Utilizamos um modelo animal knockdown (KD) para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), que apresenta uma diminuição da liberação central e periférica de acetilcolina. Inicialmente avaliamos o ciclo estral das fêmeas selvagens (WT), VACHT heterozigotos (KD^{HET}) e VACHT homozigotos (KD^{HOM}) durante 19 dias. As fases foram classificadas de acordo com a citologia vaginal e os ciclos foram divididos em regulares e irregulares. As fêmeas KD^{HOM} apresentaram mais ciclos irregulares, indicando uma provável modulação colinérgica sobre a função ovariana. Os mesmos grupos foram submetidos ao labirinto em Y, para avaliação da memória de trabalho (MT), e aos testes de reconhecimento de objetos, para avaliação da memória de curta duração (MCD), de longa duração (MLD) e espacial (ME). As fêmeas KD^{HOM} apresentaram déficits de MT e de MLD. A MCD e a ME foram inalteradas em todos os genótipos. A irregularidade do ciclo estral pode estar se somando ao déficit colinérgico e então prejudicando a memória nas fêmeas KD^{HOM} . Para avaliar o efeito da privação de hormônios ovarianos sobre a memória e estresse oxidativo, utilizamos apenas fêmeas KD^{HET} . Animais WT e KD^{HET} foram ovariectomizados (OVX) ou *sham*-operados. Após 7 dias (7d) ou 90 dias (90d) foram submetidos aos mesmos testes cognitivos já citados. Homogenatos de hipocampo (HP) e córtex (CX) foram obtidos 90d após a cirurgia para medida da atividade da superóxido dismutase (SOD) e dos produtos de peroxidação lipídica (TBARS). Após 7d de OVX, a MT e MLD foram inalteradas em ambos genótipos, porém animais KD^{HET} OVX apresentaram déficit de MCD, indicando que a diminuição do tônus colinérgico propiciou um déficit de memória induzido pela OVX. Um efeito prejudicial de 90d de OVX foi observado na MT e MLD, em ambos WT e KD^{HET} , mostrando que os níveis reduzidos de liberação de acetilcolina não aumentam a susceptibilidade aos déficits cognitivos induzidos pela OVX. Em conjunto, estes resultados indicam claramente que nem todos os efeitos estrogênicos são colinérgico-dependentes. Porém, 90d após a cirurgia, a MCD foi prejudicada nos dois grupos de KD^{HET} , ou seja, *sham* e OVX, enquanto WT não apresentaram déficit. Estes resultados apontam um déficit de MCD geral nas fêmeas KD^{HET} , independente dos níveis de hormônios femininos circulantes. 90d de privação hormonal aumentou a atividade da SOD e a concentração dos TBARS apenas no HP das fêmeas KD^{HET} OVX. Considerando que os prejuízos na memória e o estresse oxidativo são características dos pacientes com DA, especulamos que o aparecimento da doença pode ser antecipado nos casos em que o tônus colinérgico e os níveis hormonais femininos estejam reduzidos, como na menopausa.

Palavras-chave: acetilcolina, memória de reconhecimento de objetos, memória de trabalho, ovariectomia.

ABSTRACT

The cholinergic degeneration, cognitive deficits and oxidative stress are neuropathological features of Alzheimer's disease (AD) and evidence suggests that the depletion of the female sex hormones is a risk factor for the development of this disease. The possibility of assessing these factors in a single experimental group stimulated the development of this work. We used an animal model knockdown (KD) for the vesicular acetylcholine transporter (VACHT), which shows a central and peripheral decrease in the release of acetylcholine. We evaluated the estrous cycle of wild-type females (WT), heterozygous VACHT (KD^{HET}) and homozygous VACHT (KD^{HOM}) for 19 days. The stages were classified according to vaginal cytology and the cycles were divided into regular and irregular. Females KD^{HOM} had higher amounts of irregular cycles, indicating a possible cholinergic modulation on ovarian function. The same groups were submitted to the Y maze for assessment of working memory (WM), and to the object recognition task, to evaluate the short-term (STM) and long-term (LTM) memory, as well as spatial memory (SM). Regarding the cognitive performance, the KD^{HOM} females showed deficits of WM and LTM. The STM and SM were unchanged in all genotypes. To evaluate the deprivation of ovarian hormones effect on memory and oxidative stress, we used only females KD^{HET} . KD^{HET} and WT animals were ovariectomized (OVX) or *sham*-operated. After 7 days (7d) or 90 days (90d) were subjected to the same cognitive tests already mentioned. Hippocampus (HP) and cortex (CX) homogenates were obtained 90d after the surgery to measure the superoxide dismutase (SOD) activity and the lipid peroxidation products (TBARS). 7d post-OVX, both WM and LTM were unchanged, however KD^{HET} OVX showed STM impairment, indicating that the decreased cholinergic tonus allowed an OVX-effect on memory. An overall long-term OVX-effect (90d) was observed in WM and LTM, in both WT and KD^{HET} OVX mice, showing that reduced levels of brain acetylcholine release did not increase the susceptibility to WM or LTM deficits OVX-induced. Taken together these results clearly indicate that not all estrogen effects are cholinergic-dependent. However, 90d after surgery, the STM was impaired in both groups of KD^{HET} , *sham* and OVX, whereas WT showed no deficit. These results indicate a general impairment of STM in females KD^{HET} , independent of circulating levels of female hormones. 90d of hormone deprivation increases the activity of SOD and the concentration of TBARS only in HP of KD^{HET} OVX females. Whereas the deficit in memory and oxidative stress are characteristic of patients with AD, speculated that the disease can be anticipated where the cholinergic tonus and female hormone levels are low, as in menopause.

Key words: acetylcholine, object recognition memory, working memory, ovariectomy.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

A memória é constituída pelas etapas de aprendizado, formação, conservação e evocação de informações. As memórias podem ser classificadas segundo sua duração em memória de trabalho (MT), memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) e quanto ao seu conteúdo em memória explícita e memória implícita (Izquierdo, 2002).

1.1.1 Memória de trabalho - MT

A MT é a interface entre a percepção da realidade pelos sentidos e a formação ou evocação de memórias. Esta memória exerce um papel gerenciador, através do acesso rápido às memórias pré-existentes, determinando se a informação é nova ou não e também se é útil ou não para o organismo. A MT mantém durante alguns segundos até no máximo 3 minutos a informação que está sendo processada, não deixa traços e não tem conseqüências bioquímicas mensuráveis (Goldman-Rakic, 1996). É processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, que age em conjunto com outras regiões cerebrais, como por exemplo, o córtex entorrinal, córtex parietal superior, córtex cingulado anterior e hipocampo (Izquierdo et al., 1998a).

1.1.2 Memória de curta duração – MCD

A MCD se estende desde os primeiros segundos ou minutos seguintes ao aprendizado, até no máximo 6 horas. Durante este período a memória é lábil e sensível a vários tratamentos ou eventos (Izquierdo et al., 1999; McGaugh, 2000). Seu papel é manter o indivíduo em condições de responder através de uma cópia da memória principal, a MLD, enquanto esta ainda não foi formada (Izquierdo et al., 1998b). As bases da MCD são essencialmente bioquímicas e diferentes áreas estão envolvidas no seu processamento, como a região CA1 do hipocampo, o córtex entorrinal e o córtex parietal (Izquierdo et al., 1999).

1.1.3 Memória de longa duração - MLD

A MLD pode durar de minutos e horas até meses e décadas (Cammara et al., 2000). Sua formação envolve processos metabólicos no hipocampo e outras estruturas cerebrais e requer entre três a oito horas, período no qual ocorre a consolidação do traço de memória através do processo eletrofisiológico de potenciação de longa duração (LTP).

Esta memória é processada pelas mesmas áreas envolvidas na formação da MCD, a região CA1 hipocampal, o córtex entorrinal e o córtex parietal. Embora as mesmas áreas estejam envolvidas no processamento destes dois tipos de

memória (MCD e MLD) os mecanismos subjacentes são claramente diferentes (Izquierdo et al., 1998a; Izquierdo e McGaugh, 2000; Izquierdo e Medina, 1997).

É uma memória dependente de síntese protéica já que agentes farmacológicos inibidores de síntese protéica prejudicam a sua formação. Alterações na liberação de neurotransmissores e na eficiência na comunicação entre neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas cerebrais, antecedem a síntese protéica, e parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da MLD (Izquierdo e McGaugh, 2000).

A MCD e a MLD dependem do prévio processamento das informações pela MT, pois esta determina a informação que será “fixada” (Izquierdo et al., 1999; McGaugh, 2000). Há muitas similaridades, mas também há muitas diferenças, entre os mecanismos simultâneos de formação destes dois tipos de memória. As similaridades indicam elos entre essas memórias, que evidentemente são necessários, dado o conteúdo cognitivo idêntico das duas. Porém, as diferenças indicam claramente que não são partes de um mesmo processo, mas sim processos paralelos e independentes (Izquierdo e McGaugh, 2000).

1.1.4 Memória explícita

As memórias explícitas, também chamadas de memórias declarativas, são as memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos. É possível declarar

conscientemente que elas existem e relatar como as adquirimos, já que são adquiridas com plena intervenção da consciência.

São divididas em memórias episódicas e semânticas. As memórias episódicas são as mais afetadas nas doenças neurodegenerativas e se referem a eventos aos quais assistimos ou participamos (Danion et al., 2001), já as semânticas são as memórias de conhecimentos gerais (Izquierdo, 2002).

As principais estruturas nervosas responsáveis pelas memórias explícitas do tipo episódica são o hipocampo e o córtex entorrinal, tais regiões trabalham associadas e em comunicação com outras regiões do córtex, como o córtex cingulado e o córtex parietal (Izquierdo et al., 1998b).

1.1.5 Memórias implícitas

As memórias implícitas, também chamadas de memórias não-declarativas, podem ser representadas pelas memórias procedurais.

As memórias procedurais são memórias de habilidades motoras ou sensoriais. É difícil verbalizar que possuímos tais memórias, para demonstrar que as temos, devemos executar tais habilidades. As áreas responsáveis pelo processamento das memórias implícitas envolvem o núcleo caudato e o cerebelo (Packard et al., 1994).

A base neuroquímica dos diferentes sistemas de memória é bastante complexa, não havendo uma relação única entre um determinado sistema de neurotransmissão e um tipo de memória. No entanto, alguns dos sistemas de neurotransmissão, como o sistema glutamatérgico, GABAérgico e colinérgico, parecem ser mais recrutados pelos sistemas de memória. Destacaremos aqui o sistema colinérgico, que foi o alvo deste trabalho.

1.2 SISTEMA COLINÉRGICO

No início do século passado já era conhecida a atividade vaso depressora da acetilcolina (ACh) e sua capacidade em estimular nervos parassimpáticos. Entretanto, somente em 1921 a ACh foi identificada por Loewi como neurotransmissor (Brown, 2006). A ACh é o neurotransmissor do sistema nervoso autônomo, de alguns neurônios do sistema nervoso central (SNC) e das junções neuromusculares (JNM), sinapse especializada em transmitir impulsos nervosos do nervo motor para um músculo efector.

No sistema nervoso autônomo, a ACh é o neurotransmissor das fibras pré- e pós-ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando inúmeras funções mantenedoras da homeostase como a contração da musculatura gástrica e ritmo cardíaco (Gilman et al., 2001). Nas JNM a ACh é liberada pelo neurônio motor e se difunde na fenda sináptica até atingir os receptores nicotínicos no músculo efector. A abertura desses receptores permite a

entrada de íons sódio, produzindo um potencial despolarizante, que se adequado levará à abertura de canais de sódio dependentes de voltagem. O influxo de íons sódio inicia a geração de um potencial de ação que se espalha rapidamente pelo sarcolema e estimula a liberação de cálcio proveniente de estoques intracelulares. O aumento de cálcio no citosol dá início aos mecanismos moleculares da contração muscular (Ruff, 2003).

A biossíntese de ACh ocorre no citosol do terminal dos neurônios colinérgicos (Figura 1) onde a enzima colina acetiltransferase (ChAT) catalisa a transferência de um grupo acetil, proveniente da molécula de acetil-CoA, para a molécula de colina. Os níveis de acetil-CoA são mantidos através do metabolismo da glicose, sob ação da enzima ATP-citrato liase, que apresenta sua expressão aumentada em neurônios colinérgicos (Tomaszewicz et al., 2003) e o suprimento de colina é feito principalmente pela dieta (Zeisel, 1981).

A ChAT é encontrada como uma proteína solúvel no citoplasma, e apenas uma pequena proporção está associada à membrana e ao núcleo (Gill et al., 2003). Ferramentas bioquímicas e farmacológicas indicam que a ChAT encontra-se em excesso cinético em relação aos seus substratos, sugerindo que sua ação não é limitante da síntese de ACh (Blusztajn e Wurtman, 1983). Entretanto, uma redução excessiva na expressão da ChAT pode reduzir a disponibilidade de ACh, observada em algumas situações patológicas, como na doença de Alzheimer (DA) (Mesulam, 2004; Oda, 1999).

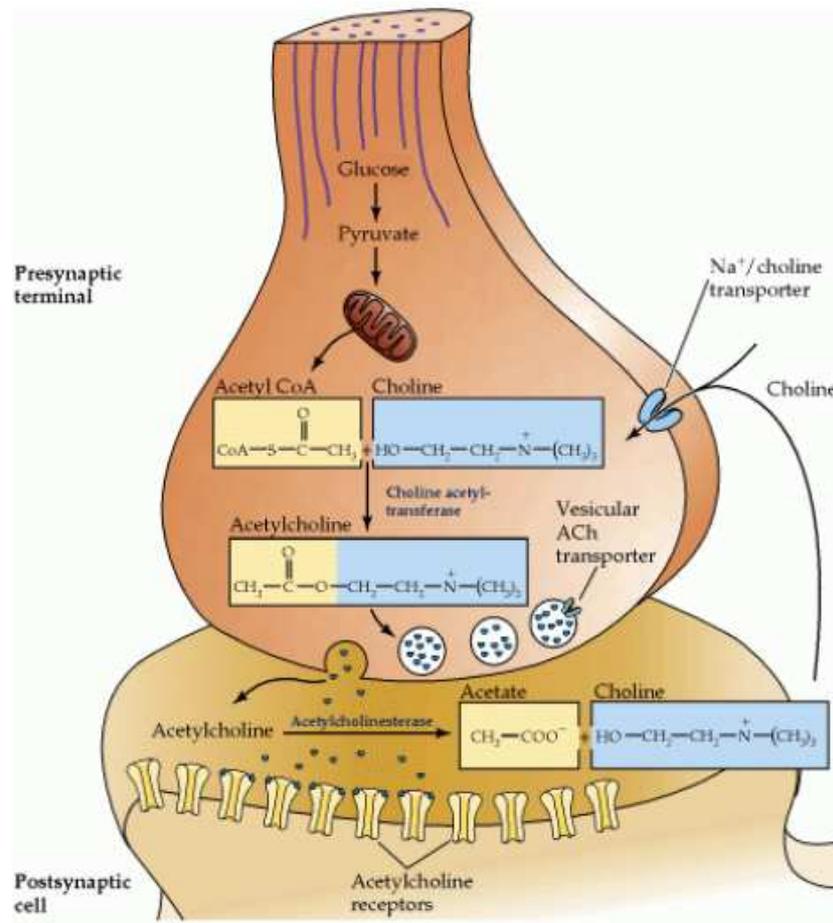


Figura 1 - Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica. Modificado de Purves et al., 2004.

A ACh sintetizada é transportada para o interior de vesículas sinápticas através da ação do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). A relação entre a concentração de ACh vesicular e citoplasmática é de 100:1, portanto, ACh é transportada ativamente pelo VACHT, o que é possível devido ao gradiente de prótons gerado por uma ATPase do tipo V com relação estequiométrica de dois prótons por molécula de ACh (Kim et al., 2003).

Após o preenchimento das vesículas sinápticas, essas são direcionadas para uma região subjacente à membrana sináptica denominada zona ativa. As vesículas são ancoradas à membrana sináptica e se tornam responsivas às mudanças na concentração intracelular do íon cálcio (Purves et al., 2004). Quando um potencial de ação atinge o terminal nervoso, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos, resultando no influxo deste íon. Esse influxo induz a fusão de vesículas sinápticas com a membrana e a consequente liberação de ACh na fenda sináptica (Sudhof, 2004). Ao ser liberada, a ACh interage reversivelmente com receptores muscarínicos e nicotínicos pré- e pós-sinápticos. Após se dissociar dos receptores, a ACh é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina. A AChE hidrolisa também moléculas de ACh que não se ligaram à receptores (Prado et al., 2002). Portanto, cabe à AChE limitar as concentrações de ACh na fenda sináptica.

A incapacidade em realizar a síntese *de novo* de colina torna a captação da colina para o interior neuronal essencial para manter a síntese de ACh. Assim, a colina é recaptada para o neurônio pré-sináptico através do transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e utilizada para síntese de novas moléculas de ACh (Ribeiro et al., 2006).

1.2.1 Classificação dos neurônios colinérgicos no SNC

O VAcHT, a ChAT e o CHT1 são proteínas características de neurônios colinérgicos e portanto, foram utilizadas para mapear a rede colinérgica no SNC. Vários trabalhos empregando técnicas de imunohistoquímica foram realizados a fim de definir a população de neurônios colinérgicos no cérebro e suas projeções (Roghani et al., 1996; Schafer et al., 1998a).

Existem alguns dados controversos sobre a presença de neurônios colinérgicos no córtex cerebral de mamíferos. Os estudos imunohistoquímicos iniciais apontaram a ausência de neurônios colinérgicos no córtex cerebral (Kimura et al., 1980) porém, trabalhos posteriores mostraram reatividade para ChAT em neurônios corticais de rato, gato, embriões de macacos e humanos (revisto por Oda, 1999).

Mesulam e colaboradores. classificaram os neurônios colinérgicos do SNC em seis grupos (Figura 2), que foram divididos de acordo com as semelhanças em suas características celulares e na topografia das projeções nervosas (Mesulam et al., 1983b).

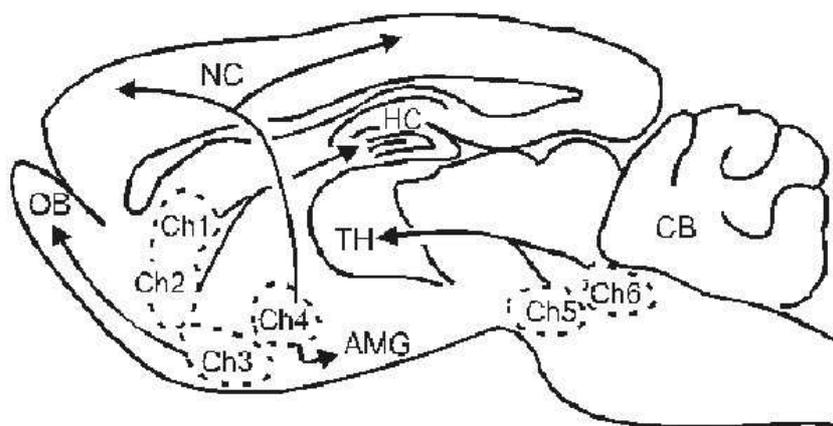


Figura 2 - Figura representativa da distribuição dos neurônios colinérgicos no SNC de ratos. Os neurônios Ch1 – Ch4 localizam-se na região do prosencéfalo basal e Ch5 - Ch6 na região do mesencéfalo. Abreviações: AMG - amígdala; CB – cerebelo; HC – hipocampo; NC – neocórtex; OB – bulbo olfatório; TH – tálamo. Modificado de Mesulam et al. 1983b.

O primeiro grupo, Ch1, é composto de neurônios colinérgicos da região do septo medial. No geral, são os menores neurônios dentro do grupo Ch1 – Ch6. Não há uma delimitação precisa entre os neurônios que pertencem aos grupos Ch1 e Ch2. Neurônios pertencentes ao grupo Ch2 estão situados na extremidade vertical da área de Broca. Estes dois grupos neuronais fornecem a principal fonte de projeções colinérgicas para inervar o hipocampo. Neurônios pertencentes ao grupo Ch3 estão situados na banda diagonal de Broca e grande parte de suas projeções inervam o bulbo olfatório. Já os neurônios do grupo Ch4, localizam-se no núcleo basal de Meynert, núcleo magnocelular pré-óptico e algumas partes da extremidade horizontal da banda de Broca e projetam para o neocórtex e amígdala. A região do prosencéfalo basal, responsável pela maioria das projeções colinérgicas enviadas para o córtex e hipocampo (Schafer et al., 1998b), contém

os neurônios dos grupos Ch1-4 que atuam modulando a memória e a excitabilidade cortical (Sarter e Bruno, 1997).

A formação reticular pontomesencefálica contém dois grupos de neurônios colinérgicos de tamanho médio dos grupos Ch5 e Ch6. Eles constituem o núcleo pedunculopontino e núcleo tegmental laterodorsal, respectivamente, e fazem projeção para o mesencéfalo, diencéfalo e bulbo. São importantes para processos como vigília e iniciação do sono (Mesulam et al., 1983a).

Não constam desta classificação, mas são observados grandes grupos de neurônios motores na região do tronco encefálico e medula espinhal. No tronco são encontradas populações de motoneurônios colinérgicos de tamanho médio próximos ao tegmento mesopontino e núcleo pedunculopontino. Na medula espinhal, são observados motoneurônios colinérgicos no corno ventral desde a região cervical até a sacral (VanderHorst e Ulfhake, 2006).

Os neurônios colinérgicos desempenham um papel essencial nos processos cognitivos (Beninger et al., 1989; Gibbs, 2000a; Gibbs et al., 1994) e lesões nestes neurônios mostraram causar déficits de atenção e aprendizado (Coyle et al., 1983; Whitehouse et al., 1982). Independentemente do grupo ao qual pertencem, os neurônios colinérgicos tem sido apontados como moduladores de diferentes vias neurais, além de serem potenciais alvos para a ação de outras moléculas sinalizadoras, diferentes da ACh, como por exemplo o 17β -estradiol, o principal hormônio feminino.

1.3 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS

Os principais hormônios sexuais femininos são os estrógenos e a progesterona (P_4), que são hormônios esteróides responsáveis pelo controle da função reprodutiva. A P_4 é produzida pelo corpo lúteo e os estrógenos são produzidos pelos folículos ovarianos a partir de andrógenos, androstenediona ou testosterona, em uma reação catalisada pela enzima aromatase. O estrógeno mais potente é o 17β -estradiol (E_2), seguido pela estrona e estriol (Gilman et al., 2001).

Os ovários são a principal fonte de circulação de estrógenos, mas a produção desses hormônios pode ocorrer em outros tecidos, como no cérebro (Simpson et al., 1999). No tecido neural o E_2 é obtido através da conversão de um precursor andrógeno e age de forma parácrina e intácrina. Apesar de neurônios e astrócitos expressarem aromatase, estudos mostraram que os astrócitos produzem, principalmente, andrógenos e os neurônios produzem, principalmente, estrógenos (Zwain e Yen, 1999).

Vários estudos mostram a importância do E_2 na função cerebral. Além dos seus efeitos na regulação neuroendócrina das ações hipotalâmicas e hipofisárias, ele age também em áreas do cérebro que não estão primariamente envolvidas com a reprodução, como hipocampo, córtex cerebral e prosencéfalo basal. Desta forma, o E_2 possui uma variedade de ações sobre humor, atividade locomotora, mecanismos de atenção e cognição (McEwen e Alves, 1999).

No SNC o E₂ promove uma melhora das funções cognitivas através de diversas ações, tais como: estimulação da produção de fatores neurotróficos e seus receptores, como o fator de crescimento do nervo (Birge, 1997; McEwen et al., 1997; McMillan et al., 1996), aumento da arborização dendrítica em CA1 (Dominguez et al., 2004; Woolley e McEwen, 1992), regulação da produção e liberação de neurotransmissores, regulação da atividade de enzimas, aumento da sinaptogênese (Desmond e Levy, 1997; McEwen et al., 1997) e ação sobre processos eletrofisiológicos envolvidos com a formação de memórias, como a LTP (Foy, 2001).

1.3.1 Neurônios colinérgicos, estrógenos e cognição

Diversos estudos apontam para uma relação anátomo-funcional entre componentes do sistema colinérgico e estrógenos. Shughrue *et al.* demonstraram que os receptores de estrógenos (RE: RE α e RE β) se co-localizam com a ChAT, indicativo de que esses são expressos em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (Shughrue et al., 2000). Após a ovariectomia (OVX) ocorre uma redução nos neurônios duplamente marcados com ChAT e RE α (Mufson et al., 1999), mas a TRH à base de E₂ é capaz de aumentar o número de células imunorreativas ChAT/RE α em camundongos idosos ou jovens OVX (Miller et al., 1999). Um estudo com ratas OVX usando E₂ marcado mostrou que os neurônios colinérgicos

concentram grande quantidade desse hormônio (Toranallierand et al., 1992), sugerindo que o E₂ pode modular diretamente a função colinérgica cerebral.

A demonstração de que neurônios colinérgicos contêm receptores de estrógenos e de que o E₂ efetivamente se liga a tais receptores corrobora a possibilidade do E₂ modular a atividade colinérgica e melhorar a função cognitiva através da modulação da produção e liberação de ACh (Gibbs et al., 1994; Luine, 1985; Yamamoto et al., 2007). Embora os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda sejam pouco conhecidos, existe a hipótese de que esses são, em parte, devido à habilidade do E₂ em melhorar a funcionalidade das projeções colinérgicas do prosencéfalo basal para o hipocampo e córtex frontal (Gabor et al., 2003).

Estudos em ratas testando essa hipótese demonstraram que a OVX causa déficit cognitivo e uma diminuição da função colinérgica do prosencéfalo basal, o que é evidenciado pela diminuição na expressão da ChAT e do CHT1 (O'Malley et al., 1987; Singh et al., 1994). Mas a TRH à base de E₂ é capaz de promover um aumento na expressão desses marcadores (Gibbs, 2000a; Gibbs e Pfaff, 1992; Luine, 1985; McMillan et al., 1996; Singh et al., 1994) e aumentar a liberação de ACh na ocorrência de estimulação neuronal, como em tarefas de aprendizado (Gabor et al., 2003; Gibbs et al., 1997; Marriott e Korol, 2003). Experimentos com roedores e primatas indicam que o E₂ também promove um aumento no número de receptores nicotínicos e muscarínicos (McEwen et al., 1997). Esses estudos

apontam a capacidade do E_2 de aumentar o padrão funcional das projeções colinérgicas.

Dentre os hormônios femininos o E_2 é o mais ativo, mas é preciso fazer algumas considerações sobre outro hormônio ovariano, a P_4 , no que tange aos efeitos deste sobre a memória e aprendizado. Apesar das ações da P_4 sobre os processos cognitivos ainda serem controversas, a maioria dos estudos atribuem os efeitos benéficos dos hormônios femininos sobre a cognição ao E_2 e não à P_4 .

Os receptores de progesterona (RP) estão largamente expressos em todo o cérebro e a distribuição desses receptores em áreas não hipotalâmicas, sugere um papel da P_4 na regulação de funções neurais. A P_4 tem várias funções não reprodutivas no SNC, atua regulando a cognição, humor, inflamação, função mitocondrial, neurogênese e regeneração. As respostas neurais reguladas pela P_4 são mediadas por uma variedade de RP, que incluem os receptores nucleares clássicos, RPA e RPB. A P_4 produz múltiplos efeitos no cérebro através da regulação da expressão gênica, modulação de sistemas neurotransmissores e ativação de cascatas de sinalização (Baulieu et al., 1996; Brinton et al., 2008).

Os estudos dos efeitos da P_4 sobre o aprendizado e memória são complexos pelo fato do seu metabolismo produzir metabólitos neuroativos que desempenham diversas ações neurobiológicas, mas apesar desta complexidade existem achados consistentes de que a P_4 exerce efeitos dramáticos sobre a função cerebral e

comportamentos, principalmente os relacionados à ansiedade (Reddy, 2003). A elevação endógena ou exógena da P_4 circulante diminui a ansiedade em uma variedade de tarefas, como o labirinto em cruz elevado e o teste do campo aberto (Dubrovsky, 2005; Frye e Walf, 2002), já o efeito da P_4 sobre processos cognitivos depende do paradigma comportamental utilizado.

O tratamento com P_4 mostrou ser inefetivo em melhorar a memória espacial (ME) quando administrado antes do treino no labirinto de oito braços (*“radial arm-maze”*) (Tanabe et al., 2004). Na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) com fêmeas intactas ou OVX a P_4 administrada após o treino melhorou a memória de RO em camundongos de meia-idade ou idosos (Frye e Walf, 2008a; Frye e Walf, 2008b; Harburger et al., 2008). No labirinto em T a P_4 aumentou o desempenho de fêmeas OVX (Frye e Walf, 2008b). Baixas doses de P_4 administradas em associação com o E_2 revertem o efeito benéfico do E_2 na tarefa de RO, ao passo que doses maiores não interferem no resultado (Harburger et al., 2009). Estudos com modelo animal de Doença de Alzheimer (DA) indicam que a P_4 bloqueia os efeitos benéficos do E_2 (Carroll et al., 2007).

Considerando a relação descrita entre memória, hormônios femininos e sistema colinérgico, faremos algumas considerações com relação à DA que é um elo entre os três itens abordados anteriormente.

1.4 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva das funções cognitivas, acometendo principalmente indivíduos com mais de 65 anos. Apesar da sua etiologia ser desconhecida a neuropatologia desta doença inclui deposição do peptídeo beta-amilóide (β A), agregados neurofibrilares e neuríticos, e degeneração de neurônios colinérgicos.

O β A é derivado de um processo enzimático que ocorre em duas etapas envolvendo a proteína precursora amilóide (APP), proteína presente na membrana plasmática (Evans et al., 1989). Na primeira etapa a enzima β -secretase cliva um sítio β da APP e libera o terminal N do β A, e na segunda, a γ -secretase cliva o sítio γ da APP e libera o terminal C do β A (Vassar et al., 1999). A clivagem inicial da APP pela β -secretase é crítica para formação do β A (Dewachter et al., 2000) e um estudo mostrou que a atividade da β -secretase aumenta com a idade e está elevada nos cérebros de pacientes com DA (Li et al., 2004).

A análise bioquímica demonstra que os agregados neurofibrilares encontrados no cérebro de pacientes com DA são formados principalmente pela proteína tau hiperfosforilada. Em condições saudáveis a proteína tau tem a função de estabilizar os microtúbulos axonais, componentes do citoesqueleto neuronal. Mas quando ocorre sua hiperfosforilação ela perde a função e se polimeriza, formando os agregados neurofibrilares (Kar et al., 2004).

A disfunção colinérgica desempenha um papel essencial na DA. Os neurônios colinérgicos são extensamente degenerados nos pacientes com DA, causando uma diminuição de marcadores colinérgicos, tais como, ChAT, CHT1 e receptores nicotínicos e muscarínicos, bem como, uma diminuição nos níveis de ACh (Blusztajn e Berse, 2000; Kar et al., 2004; Nordberg et al., 1992; Oda, 1999).

A correlação entre a hipofunção colinérgica e os déficits cognitivos observados nos pacientes com DA, evidenciada pelo quadro clínico dos pacientes com a concomitante diminuição dos marcadores colinérgicos (Perry et al., 1978), levou a formulação da hipótese colinérgica para a DA. Nessa hipótese a degeneração dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal são a principal causa da disfunção cognitiva dos pacientes (Bartus, 2000; Bartus et al., 1982; Whitehouse et al., 1982). No entanto, a hipótese colinérgica não é a única que tenta explicar o complexo quadro de neurodegeneração encontrado no cérebro de pacientes com DA. Especial interesse tem sido dado às alterações no balanço pró-oxidativo/anti-oxidativo encontrado no cérebro destes pacientes.

1.4.1 Estresse oxidativo e DA

O envelhecimento é um processo biológico inevitável causado por uma diminuição progressiva na função fisiológica. A teoria dos radicais livres no envelhecimento postula que prejuízos causados por exposição contínua a agentes oxidantes,

como as espécies reativas de oxigênio (ERO), é a força motriz na perda da função celular (Shigenaga et al., 1994).

A atividade biológica das ERO induz danos celulares, como o aumento da permeabilidade celular causado pela peroxidação lipídica, porém esses são limitados por defesas antioxidantes endógena. As enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase e sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase) constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante, pois eliminam os radicais livres que poderiam oxidar os substratos celulares (Yu, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta em danos a macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e tem sido chamado de estresse oxidativo (Ames et al., 1993; Sies, 1993).

Os neurônios são extremamente sensíveis aos ataques por radicais livres e o estresse oxidativo é responsável pelo declínio da função celular cerebral, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Beal, 2005a; Beal, 2005b; Lovell e Markesbery, 2007; Pratico et al., 2001). Danos oxidativos são frequentemente observados em pacientes com DA (Castegna et al., 2002) e o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese dessa doença (Nilsen, 2008). Alterações no metabolismo da glicose e disfunção mitocondrial antecedem o desenvolvimento da DA (Liang et al., 2008; Moreira et al., 2007), e níveis elevados dos marcadores de estresse oxidativo foram encontrados no cérebro de pacientes com DA antes do aparecimento de placas

β A, sugerindo que o estresse oxidativo é um evento inicial que contribui para esta patologia (Nunomura et al., 2001; Pratico et al., 2001).

Os estrógenos desempenham várias ações antioxidantes, como reduzem os danos ao DNA mitocondrial e ativam sistemas de defesa antioxidante contra as ERO (Behl et al., 1995). Assim, a diminuição nos níveis circulantes destes hormônios poderia desencadear um desequilíbrio pró-oxidativo/anti-oxidativo e levar ao desenvolvimento de DA (Atwood, 2005; Jaffe et al., 1994).

1.4.2 Estrógenos e DA

Embora haja controvérsia, a prevalência da DA é maior em mulheres (Baum, 2005) e as mulheres pós-menopausa são 1,5 a 3 vezes mais susceptíveis à DA do que os homens (Gao et al., 1998). Devido a estas razões, os efeitos do E_2 sobre o aprendizado e memória têm sido bastante investigados em pesquisas que estudam o papel dos hormônios gonadais femininos na neuroproteção (Behl e Manthey, 2000).

O declínio dos hormônios ovarianos, depois da menopausa ou após o processo cirúrgico de retirada dos ovários, é um fator que contribui para o aumento da incidência dos déficits cognitivos observados na DA. Isso ocorre porque a diminuição dos níveis de E_2 no cérebro torna os neurônios mais susceptíveis aos

processos degenerativos relacionados à idade (Buckwalter et al., 1993; Paganinihill e Henderson, 1994).

A deficiência de E_2 no cérebro acelera a formação de placas βA e causa déficits cognitivos (Li e Shen, 2005). Contrariamente, outros estudos afirmam que a TRH à base de E_2 não exerce efeito sobre o acúmulo de βA (Gresack e Frick, 2006) e não oferece nenhum benefício aparente ou aumenta o risco de desenvolvimento da DA (Henderson, 1997).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos positivos do E_2 na DA permanecem pobremente compreendidos. Mas, são conhecidas algumas vias pelas quais os estrógenos podem estar influenciando a patogênese desta doença, como por exemplo, o E_2 induz o processamento alterado da APP (Jaffe et al., 1994) e exerce efeitos antioxidantes (Behl et al., 1995), o que evita a formação de placas βA .

Nos neurônios os receptores de E_2 também estão presentes nas mitocôndrias (Yager e Chen, 2007; Yang et al., 2004), o que corrobora com outro possível mecanismo neuroprotetor do E_2 : sua ação sobre as mitocôndrias, organela que mantém a homeostase do cálcio e a sobrevivência da célula, protegendo os neurônios contra as consequências adversas do desequilíbrio da homeostase desse íon (Nilsen e Brinton, 2004).

Apesar de grande parte dos estudos sugerirem que a TRH pode reduzir o risco de desenvolvimento da DA (Henderson et al., 2000; Zandi et al., 2002) nem todos

concordam com esses resultados, e ainda existe considerável debate a respeito dos benefícios da TRH sobre o desempenho cognitivo (Hogervorst et al., 2002). Mas, mesmo divergindo quanto aos resultados mnemônicos obtidos após a TRH, a maioria dos estudos apontam para um mesmo alvo: os neurônios colinérgicos. A degeneração colinérgica, os déficits cognitivos e o estresse oxidativo são características neuropatológicas da DA e evidências sugerem que a depleção dos hormônios sexuais femininos é um fator de risco para o desenvolvimento dessa doença. O estudo destes fatores num único grupo experimental poderia esclarecer um pouco mais os pontos de convergência entre estes fatores.

1.5 MODELO ANIMAL VACHT “KNOCKDOWN” (VACHT KD)

Com o intuito de obter um modelo de hipofunção colinérgica central e periférica viável para estudos comportamentais Prado et al. caracterizaram um modelo animal com expressão diminuída do gene do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), o que leva a uma menor liberação de ACh em regiões cerebrais importante para os processos cognitivos, como o hipocampo e o córtex (Prado et al., 2006).

Os animais machos knockdown heterozigotos (VACHT KD^{HET}), assim denominados por expressarem apenas 60% da proteína VACHT, apresentaram déficits de memória de reconhecimento social e de objetos. Já os animais machos knockdown homozigotos (VACHT KD^{HOM}), assim denominados por expressarem

apenas 30% da proteína VAcHT, apresentaram pronunciadas alterações neuromusculares (de Castro et al., 2009; Prado et al., 2006).

Utilizamos neste trabalho fêmeas VAcHT KD como um modelo para o estudo da relação entre sistema colinérgico, hormônios ovarianos e funções cognitivas e também da relação entre sistema colinérgico, hormônios ovarianos e estresse oxidativo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

Muitas das queixas das mulheres pós-menopausa são de origem neurológica, o que ocorre devido ao fato do cérebro ser um dos principais órgãos alvo dos estrógenos (Sherwin, 1999). Dentre as queixas neurológicas, as alterações mnemônicas são as mais frequentes e abrangem um espectro que vai desde a diminuição da capacidade cognitiva até a possibilidade do desenvolvimento de demência senil do tipo DA. Um forte argumento em favor do papel dos hormônios sexuais femininos na expressão desta patologia pode ser inferido examinando a sua epidemiologia, que mostra uma maior incidência da DA em mulheres pós-menopausa.

Os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal sofrem as primeiras e mais pronunciadas alterações degenerativas da DA. O acometimento destes neurônios está relacionado com os déficits cognitivos observados nos pacientes com DA e sabe-se que os estrógenos são capazes de aumentar a funcionalidade do sistema colinérgico. Logo, a relação entre processos cognitivos, sistema colinérgico e níveis circulantes dos hormônios sexuais femininos impulsionou e norteou o desenvolvimento deste trabalho.

A menopausa, que ocorre nos humanos, se deve a uma redução no pool de folículos ovarianos ao longo da vida, já a estropausa, que ocorre em roedores, se

deve a uma redução nos hormônios ovarianos, principalmente, devido à alteração no eixo hipotalâmico-hipofisário. Porém, tanto a menopausa quanto a estropausa são caracterizadas pela falência da função ovariana. Além disso, através da remoção dos ovários, os roedores são amplamente utilizados como modelos para estudo de alterações fisiológicas decorrentes da privação hormonal. Sendo assim, a utilização de fêmeas mutantes VChT KD para a avaliação de aprendizado e memória basal, ou seja, na presença de hormônios ovarianos circulantes e a posterior análise comportamental em resposta à privação hormonal promovida pela OVX possibilitou o estudo da relação entre sistema colinérgico, memória e hormônios femininos num mesmo modelo animal. Além disso, ao analisarmos o ciclo estral de fêmeas mutantes, foi possível verificar, parcialmente, a modulação colinérgica sobre a função ovariana.

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar se uma hipofunção colinérgica, presente ao longo do desenvolvimento, afeta o desempenho cognitivo das fêmeas VChT KD e verificar se a privação hormonal pode desencadear o surgimento de marcadores neuropatológicos, como déficit cognitivo e estresse oxidativo, neste modelo animal.

2.2.1 Objetivos específicos

- Verificar o ciclo estral das fêmeas com manipulação genética do VACHT - VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM};
- Analisar a memória de trabalho das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM};
- Analisar a memória episódica de curta duração das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM};
- Analisar a memória episódica de longa duração das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM};
- Analisar a memória espacial das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM};
- Verificar os efeitos cognitivos da privação dos hormônios ovarianos durante sete dias em fêmeas VACHT KD^{HET};
- Verificar os efeitos cognitivos da privação dos hormônios ovarianos durante noventa dias em fêmeas VACHT KD^{HET}; e
- Analisar os níveis de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo no hipocampo e córtex das fêmeas VACHT KD^{HET} após longo período de privação dos hormônios ovarianos.

MATERIALE MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas de 5 a 11 meses VACHT KD^{HET}, VACHT KD^{HOM}, e para controle camundongos C57BL/6 (WT – *wild type*) da mesma geração e *background* genético. Os animais foram fornecidos pelo biotério de animais transgênicos do Laboratório de Neurobiologia Molecular do ICB, coordenado pela professora Dr^a. Vânia Prado, e pelo biotério de animais transgênicos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, coordenado pela professora Dr^a. Silvia Guatimosin.

Os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo 5 animais por gaiola) dentro de uma estante ventilada, com temperatura constante de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%. Tiveram água e ração *ad libitum* e foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº 150/2007. Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados.

Os procedimentos experimentais foram realizados por um experimentador cego ao genótipo e condições experimentais dos animais.

3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL POR ESFREGAÇO VAGINAL

Mamíferos que não menstruam, como os roedores, têm seu ciclo sexual chamado de ciclo estral. Nessas espécies, não há sangramento vaginal episódico, mas os eventos endócrinos subjacentes são essencialmente os mesmos que aqueles no ciclo menstrual.

O ciclo estral de um camundongo fêmea tem duração média de 4 – 5 dias. As fases do ciclo foram determinadas de acordo com a citologia vaginal (Zarnani et al., 2006), e os esfregaços foram classificados em proestro, estro, metaestro e diestro (Figura 3).

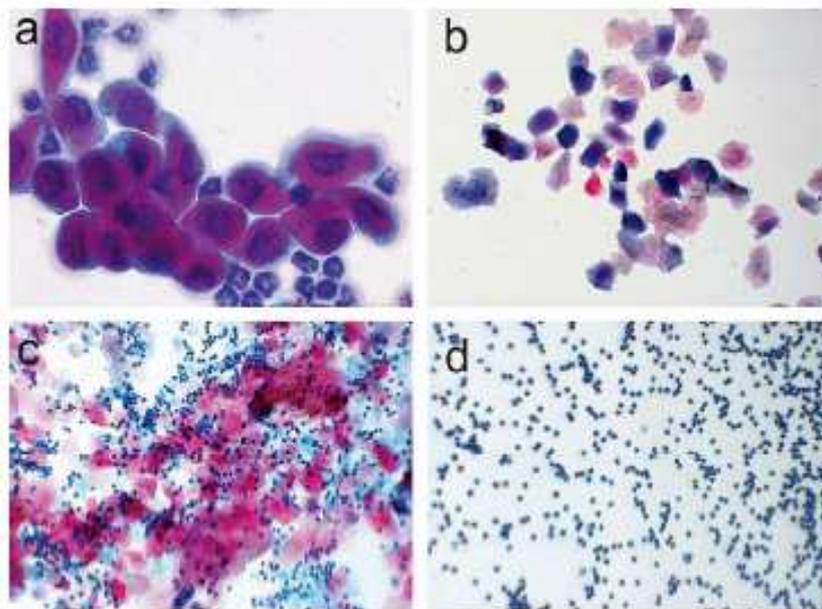


Figura 3 - Citologia do esfregaço vaginal de camundongos em diferentes fases do ciclo estral: a - proestro, b - estro, c - metaestro, d - diestro. Imagem na objetiva de 1000x (a) e objetiva de 400x (b-d). Modificado de Zarnani et al., 2006.

A fase **proestro** (período do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas e dos esteróides ovarianos E_2 e P_4) é representada por um número variável de leucócitos e um grande número de células epiteliais nucleadas, com poucas ou nenhuma célula cornificada. A fase **estro** (período de receptividade sexual e ovulação) é representada pela ausência de leucócitos, poucas ou nenhuma células epiteliais nucleadas, e muitas células epiteliais cornificadas. Já a fase **metaestro** é caracterizada por um infiltrado de leucócitos, poucas células epiteliais nucleadas, e um variável número de células cornificadas e a fase **diestro** é caracterizada pela predominância de leucócitos, um variável número de células epiteliais nucleadas, e poucas ou nenhuma célula epitelial cornificada. As duas últimas fases são caracterizadas por períodos de quiescência ovariana com baixa secreção hormonal (Cooper, 1993).

A verificação diária da fase do ciclo estral foi realizada entre 8 e 10 horas da manhã durante 19 dias. Uma pipeta estéril contendo 20 μ L de solução salina estéril foi introduzida na abertura do trato vaginal do animal. O lavado obtido, contendo as células epiteliais da mucosa vaginal, foi colocado sobre uma lâmina e analisado a fresco no microscópio óptico *OLYMPUS CX31*[®] nas objetivas 10x e 40x. Complementando a análise a fresco, as lâminas foram fixadas por imersão durante 1 minuto em metanol, coradas por imersão durante 10 minutos em solução metanólica do corante giemsa (Sigma Chemical Co) e lavadas com água corrente. Após a secagem as lâminas foram analisadas microscopicamente.

3.3 AVALIAÇÃO COGNITIVA

Cinco dias antes do início das tarefas cognitivas os animais foram manuseados diariamente por cinco minutos, para que se habituassem ao experimentador e uma hora antes do início dos experimentos as gaiolas dos animais foram colocadas na sala de comportamento, para que os animais se habituassem ao ambiente.

3.3.1 Labirinto em Y

O labirinto em Y é um paradigma comportamental utilizado para investigação do comportamento de alternância espontânea (CAE), que compreende na tendência do animal em alternar duas escolhas e que depende de uma MT intacta.

O CAE permite avaliar a MT de roedores e em nosso estudo a tarefa do labirinto em Y foi especialmente útil já que esta é sensível às interferências que afetam o sistema colinérgico do prosencéfalo basal e a função hipocampal em ratos e camundongos (Miller et al., 1999).

O labirinto em Y possui três braços, cada um com 30 cm de comprimento, 20 cm de altura e 6 cm de largura. O animal foi colocado em um dos braços do labirinto e foram anotadas as seqüências dos braços visitados durante 8 minutos. Nesta tarefa o animal deve se lembrar do braço em que esteve numa ocasião prévia

para poder entrar em outro braço, assim, uma alternância ocorre quando a cada 3 braços visitados, o animal visitou 3 braços diferentes (Pych et al., 2005).

A análise da porcentagem de alternância, calculada pela fórmula a seguir, foi utilizada para avaliação da MT (Pych et al., 2005). Uma escolha randomizada dos braços reflete um desempenho mínimo de 50% de CAE, desta forma CAE menor do que 50% caracterizou déficit de MT (de Castro et al., 2009).

$$\% \text{ CAE} = \text{Total de alternância} / (\text{Total de braços visitados} - 2) \times 100$$

A análise do número total de braços visitados foi utilizada como parâmetro de atividade locomotora, apesar de não ser uma evidência direta para tal (Pych et al., 2006).

3.3.2 Tarefas de reconhecimento de objetos - RO

A memória episódica é a mais afetada nas doenças neurodegenerativas e já foi descrita como uma memória estritamente humana (Suddendorf e Corballis, 1997; Tulving e Markowitsch, 1998). No entanto, em 1998 Clayton (Clayton e Dickinson, 1998) mostrou evidências claras de que animais possuíam características desta memória e a descreveu como uma memória semelhante à episódica (*episodic-like memory*). Portanto, a memória declarativa em animais é considerada memória

“semelhante” à episódica por não existirem formas de identificar se esta lembrança é, conscientemente, acompanhada de recordação (Clayton et al., 2007; Griffiths et al., 1999).

Uma das formas de investigar o processamento de uma memória do tipo episódica em animais é através da tarefa de RO. Em roedores, esta tarefa foi descrita por Ennaceur e Delacour (Ennaceur e Delacour, 1988) como um teste de memória baseado na exploração diferencial de um objeto familiar e outro não familiar através do comportamento espontâneo.

A tarefa de RO é especialmente útil para testar os efeitos de intervenções farmacológicas e genéticas sobre o aprendizado e memória. Essa tarefa tem a vantagem de necessitar de uma única sessão de treino, não requerer exposição a um estímulo aversivo e não requerer restrição hídrica ou alimentar (Bevins e Besheer, 2006; Dere et al., 2007).

No primeiro dia, cada animal foi exposto durante 20 minutos a uma caixa plástica branca retangular (50 cm x 40 cm x 15 cm), para se habituarem ao aparato. No dia seguinte iniciamos as tarefas de RO, compostas por uma sessão de treino e uma sessão de teste. Cada sessão teve duração de 10 minutos e objetos e caixa foram limpos com álcool 70% entre uma sessão e outra.

Para realização das tarefas de RO, utilizamos o software *ANY-mazeTM*, que cronometra automaticamente o tempo de exploração dos objetos. Por meio deste

software, um halo de dois centímetros foi delimitado ao redor dos objetos utilizados e o focinho do animal foi constantemente detectado. Desta forma, foi possível computar o tempo (em segundos) que o animal permaneceu com o focinho nos halos delimitados, o que caracterizou tempo de exploração de cada objeto.

Uma baixa atividade exploratória dos animais pode levar a conclusão equivocada em relação à capacidade cognitiva dos grupos experimentais, a fim de excluir esta possibilidade foi avaliado o tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino e eliminado da análise o animal que explorou os objetos por menos de dez segundos durante essa sessão.

Os resultados das sessões de treino e de teste das tarefas de RO foram expressos em Índice de Reconhecimento (IR) calculado segundo a fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo ou do objeto na localização espacial nova (s)}}{\text{Tempo total de exploração dos dois objetos (s)}}$$

O IR pode alcançar valores no intervalo de 0 até 1.0. Um IR igual a 0.5 indica que o tempo de exploração aos dois objetos foi o mesmo e um IR significativamente maior que 0.5 indica que houve uma maior exploração do objeto novo ou do objeto na localização espacial nova, ou seja, exploraram este objeto mais do que 50% do tempo total de exploração e, portanto, apresentam a memória de RO intacta.

Em uma mesma sessão foram usados objetos do mesmo material (vidro, plástico ou metal), para que os animais não os discriminassem através de pistas olfativas, mas com diferentes formas, cores e texturas. Não utilizamos objetos pontiagudos e nem objetos muito baixos, para que os animais não se sentissem atraídos a roê-los e nem subissem nos mesmos.

Os objetos utilizados nas tarefas de RO foram criteriosamente selecionados, para evitar a preferência inata dos animais por um material ou objeto particular. Portanto, asseguramos que os objetos foram facilmente discriminados pelos animais, porém nenhum deles foi diferencialmente preferido.

Usando variações da tarefa de RO avaliamos diferentes tipos de memórias de objetos: a memória de reconhecimento de objeto novo e a memória espacial (ME) de objeto (Eacott e Norman, 2004; Hannesson et al., 2004; Mitchell e Laiacona, 1998). O córtex pré-frontal, entorrinal, perirrinal e região CA1 hipocampal são cruciais para o reconhecimento de novidade em testes com objetos ou contextos. O hipocampo dorsal está envolvido, principalmente, com o aprendizado espacial, portanto, a tarefa de ME de objetos envolve, principalmente, vias hipocampais (Dere et al., 2007; Steckler et al., 1998).

3.3.2.1 Memória de reconhecimento do objeto novo

A memória de reconhecimento do objeto novo foi avaliada em dois períodos, 90 minutos e 24 horas após a sessão de treino, o que permitiu a avaliação da MCD e MLD, respectivamente.

- Avaliação da MCD:
 - Sessão de treino - O animal foi exposto a dois objetos idênticos (A1 e A2).
 - Sessão de teste - 90 minutos após o treino o animal foi colocado na caixa contendo um objeto familiar (A1) e outro novo (B) (Figura 4A).
- Avaliação da MLD:
 - Sessão de treino - O animal foi exposto a dois objetos idênticos (C1 e C2).
 - Sessão de teste - 24 horas após o treino o animal foi colocado na caixa contendo um objeto familiar (C1) e outro novo (D) (Figura 4B).

Nesta tarefa os animais com MCD ou MLD intacta gastam mais tempo explorando o objeto novo durante a sessão de teste, sugerindo que o objeto familiar foi reconhecido (Dix e Aggleton, 1999).

3.3.2.2 Memória da localização espacial de objeto

- Sessão de treino - O animal foi exposto a dois objetos idênticos (E1 e E2).

- Sessão de teste – Após o intervalo de 1 hora, o animal foi exposto aos mesmos objetos apresentados no treino, porém um deles foi colocado numa localização espacial diferente (Figura 4C).

Animais com ME intacta gastam mais tempo explorando o objeto que está na localização nova durante a sessão de teste, sugerindo que os roedores não somente adquirem e armazenam as características do objeto como também a sua localização espacial (Dix e Aggleton, 1999; Ennaceur et al., 1997).

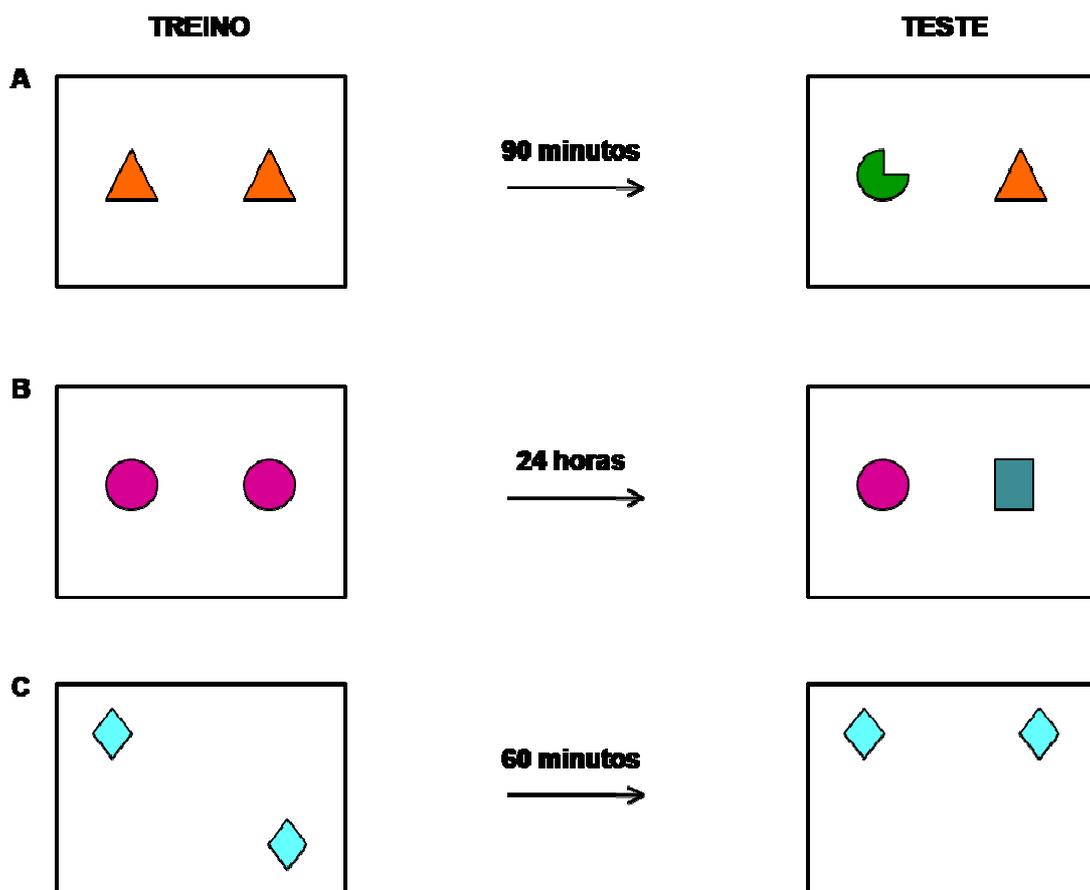


Figura 4 - Desenho representativo dos testes de reconhecimento de objetos: (A) Avaliação da MCD, (B) Avaliação da MLD, (C) Avaliação da ME.

3.4 PRIVAÇÃO HORMONAL

3.4.1 Cirurgia de ovariectomia (OVX) e cirurgia *sham*

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg peso) e xilazina (10 mg/Kg peso) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região abaixo da última costela e próxima ao nível do rim. O ovário, a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados e a pele foi posteriormente suturada. Esse procedimento cirúrgico foi realizado bilateralmente em cada animal.

Os animais dos grupos *sham*, foram submetidos à falsa OVX. Eles tiveram seus ovários identificados e expostos, mas não removidos. Estes animais foram um controle experimental do processo cirúrgico de OVX.

3.4.2 Controle da eficiência da cirurgia

O controle do processo cirúrgico foi realizado através da verificação do peso do útero (descrito na sequência) e do esfregaço vaginal diário (já descrito) durante quatro dias. Os animais que tiveram os ovários bilateralmente removidos permaneceram nas fases do ciclo estral em que são observadas menores

concentrações hormonais, metaestro ou diestro (Cooper, 1993), e o peso do útero foi menor do que o dos animais submetidos à cirurgia *sham*.

Após o sacrifício, o útero dos animais submetidos à cirurgia de OVX ou cirurgia *sham* foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma tesoura de microdissecação e pesado em balança semi-analítica. O peso do útero foi comparado entre os grupos para confirmação do processo cirúrgico de retirada dos ovários.

3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Os procedimentos experimentais descritos abaixo foram realizados no laboratório de Nutrição Experimental, coordenado pelo Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos, do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

3.5.1 Preparo do homogenato

Os animais foram decapitados com o auxílio de uma tesoura de corte e, em seguida, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados sobre papel de filtro em uma placa de petri com gelo.

O córtex e o hipocampo foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, córtex e hipocampo foram devidamente identificados, pesados e acondicionados separadamente em tubo plástico de 1,5 ml. Estas amostras foram armazenadas a -70°C até o momento dos testes bioquímicos.

Foram preparados homogenatos a 11% (p/v) do córtex e hipocampo, separadamente, em tampão fosfato de sódio 50mM, acrescido de KCl 140mM, pH 7,4. Foi realizada uma centrifugação a 750xg, por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi armazenado em tubo plástico de 1 ml e estes mantidos em freezer -70°C até a realização das seguintes análises bioquímicas: dosagem de proteínas, quantificação da peroxidação lipídica e atividade da SOD. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.5.2 Dosagem de proteínas

Para determinação da quantidade de proteínas nos homogenatos de córtex e hipocampo utilizamos o método de Lowry modificado (Hartree, 1972) e como padrão usamos a albumina de soro bovino.

Uma diluição a 20% (v/v) da amostra em água deionizada foi realizada e alíquotas de 100 μ L desta diluição foram colocadas em tubos de vidro em duplicata. O volume final dos tubos foi completado com água deionizada até 1,0 ml.

Foi adicionado a cada tubo um volume de 0,9 ml da solução A (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 100,0 g de carbonato de sódio e 500 ml de solução de NaOH 1N) e aqueceu-se os tubos em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se um volume de 0,1 ml da solução B (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 1,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 10 ml de NaOH 1N), seguindo-se de homogeneização. Após repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 3,0 ml da solução C (1 volume de reativo de Folin-Ciocalteu para cada 15 volumes de água destilada), seguido de agitação. Logo após, incubou-se em banho a 50°C por mais 10 minutos. Após resfriamento, foi efetuada a leitura das amostras em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 650 nm.

3.5.3 Medida da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma reação pró-oxidante na qual os ácidos graxos poliinsaturados são degradados pelas ERO e o malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos desta reação. Em nosso trabalho a concentração de MDA foi determinada de acordo com a metodologia conhecida como TBARS (substâncias

reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Esterbauer e Cheeseman, 1990; Ohkawa et al., 1979; Yagi, 1984).

O TBARS se baseia na reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo colorido MDA-TBA, que pode ser quantificado espectrofotometricamente. Trezentos microlitros de ácido tricloroacético 10% gelado foram adicionados a 150 μL da amostra. Foi realizada, então, uma centrifugação a 300xg por 10 minutos. Em seguida, 300 μL do sobrenadante foram incubados em água fervente por 25 minutos com 300 μL de TBA 0,67% em sulfato de sódio 7,1%. Após resfriamento foi feita a leitura no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 532 nm. Os resultados foram expressos em nMol MDA por mg de proteína (PTN) e a concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do complexo MDA-TBA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.4 Atividade da superóxido dismutase - SOD

A SOD é uma enzima antioxidante que protege o organismo contra as reações danosas do radical superóxido, uma das principais ERO. A medida de atividade da SOD se baseou na inibição da auto-oxidação do pirogalol (Marklund e Marklund, 1974).

Em resumo, 780 μL de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,4), 20 μL de EDTA 50mM e 100 μL da amostra foram adicionados a 100 μL de pirogalol 2mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) durante cinco minutos. O resultado foi expresso como U/mg proteína, sendo U a quantidade de enzima que inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

🔪 Protocolo 1 - Caracterização do ciclo estral das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM}

A caracterização do ciclo estral foi realizada com o objetivo de verificar se a hipofunção colinérgica afeta o padrão de ciclagem das fêmeas VACHT KD. Esse é um parâmetro importante a ser avaliado antes dos estudos cognitivos, posto que os resultados obtidos nos estudos comportamentais podem ser influenciados pelas fases do ciclo estral, ou seja, pelos níveis circulantes dos hormônios sexuais femininos encontrados em cada fase (Sutcliffe et al., 2007; Walf et al., 2006).

Para execução deste delineamento experimental (Figura 5) foi realizado o procedimento de esfregaço vaginal já descrito. Neste protocolo foram utilizados 24 animais, oito de cada genótipo, de 5 meses de idade.

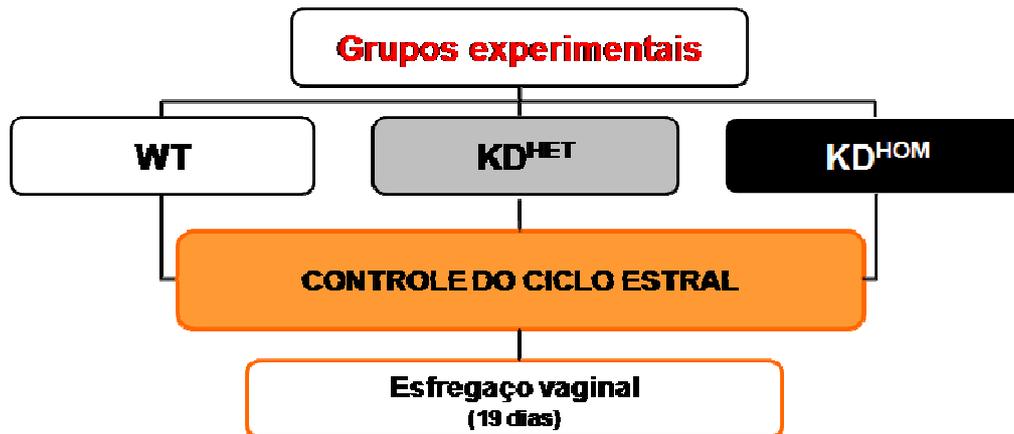


Figura 5 - Design Experimental: Caracterização do ciclo estral das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM}.

🔧 Protocolo 2 - Avaliação do desempenho cognitivo das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM}

O desempenho cognitivo das fêmeas VACHT KD intactas foi avaliado através das tarefas comportamentais descritas anteriormente. A ordem de realização das tarefas foi aleatória, sendo realizada apenas uma por dia.

Para execução deste delineamento experimental (Figura 6) foram utilizados 54 animais (WT n=18, VACHT KD^{HET} n=18, VACHT KD^{HOM} n=18) de 5 – 6 meses de idade.

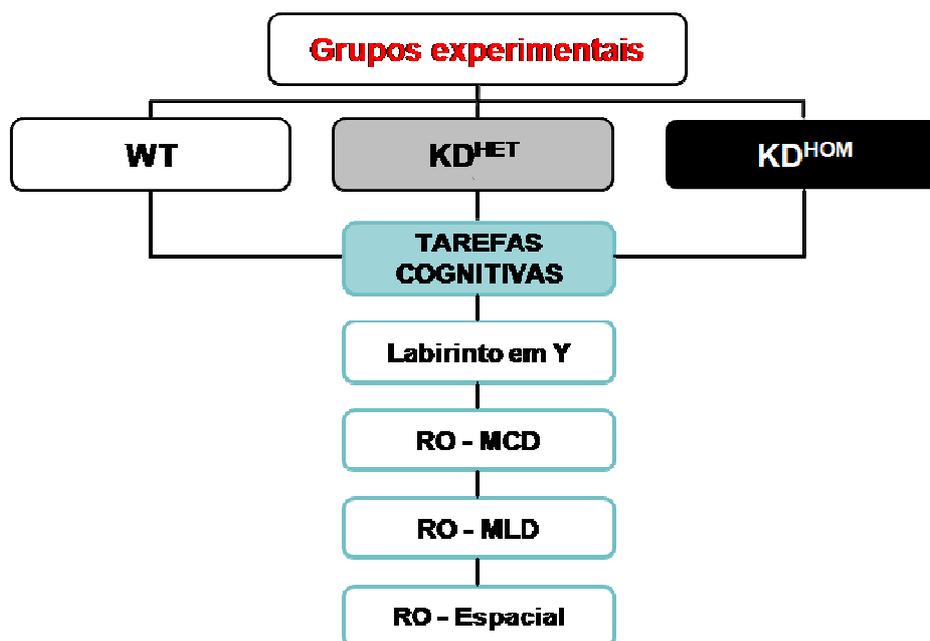


Figura 6 - Design experimental: Avaliação do desempenho cognitivo das fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM} .

🔧 Protocolo 3 - Avaliação do efeito de diferentes períodos de privação dos hormônios ovarianos sobre o desempenho cognitivo das fêmeas VACHT KD^{HET}

Neste protocolo avaliamos a influência dos hormônios ovarianos em tarefas cognitivas através da utilização de grupos experimentais submetidos a diferentes períodos de privação hormonal. Considerando que a duração da privação dos hormônios sexuais femininos pode interferir nos efeitos sobre a memória (Wallace et al., 2006), a realização das tarefas 7 e 90 dias após a cirurgia, nos permitiu avaliar os efeitos cognitivos de uma privação hormonal de curta duração e de longa duração, respectivamente.

Para execução deste delineamento experimental (Figura 7) foram utilizados oito grupos experimentais, sendo eles: WT OVX 7 dias (n=20), WT *sham* 7 dias (n=11), VAcHt KD^{HET} OVX 7 dias (n=20), VAcHt KD^{HET} *sham* 7 dias (n=11), WT OVX 90 dias (n=13), WT *sham* 90 dias (n=12), VAcHt KD^{HET} OVX 90 dias (n=14), VAcHt KD^{HET} *sham* 90 dias (n=16).

As tarefas cognitivas foram realizadas com animais de 6-7 meses durante os experimentos com privação hormonal de curta duração e de 9-10 meses durante os experimentos com privação hormonal de longa duração. Camundongos C57BL/6 apresentam uma cessação do ciclo estral em média com 20 meses de idade (Felicio et al., 1984; Nelson et al., 1982), por isso estas idades foram escolhidas para excluir qualquer efeito do envelhecimento nas tarefas realizadas.

Sete ou noventa dias após a cirurgia (OVX ou *sham*), os animais foram submetidos às tarefas cognitivas já descritas, labirinto em Y, RO – MCD, RO – MLD e RO – ME. A ordem de realização das tarefas foi aleatória e foi realizada apenas uma por dia.

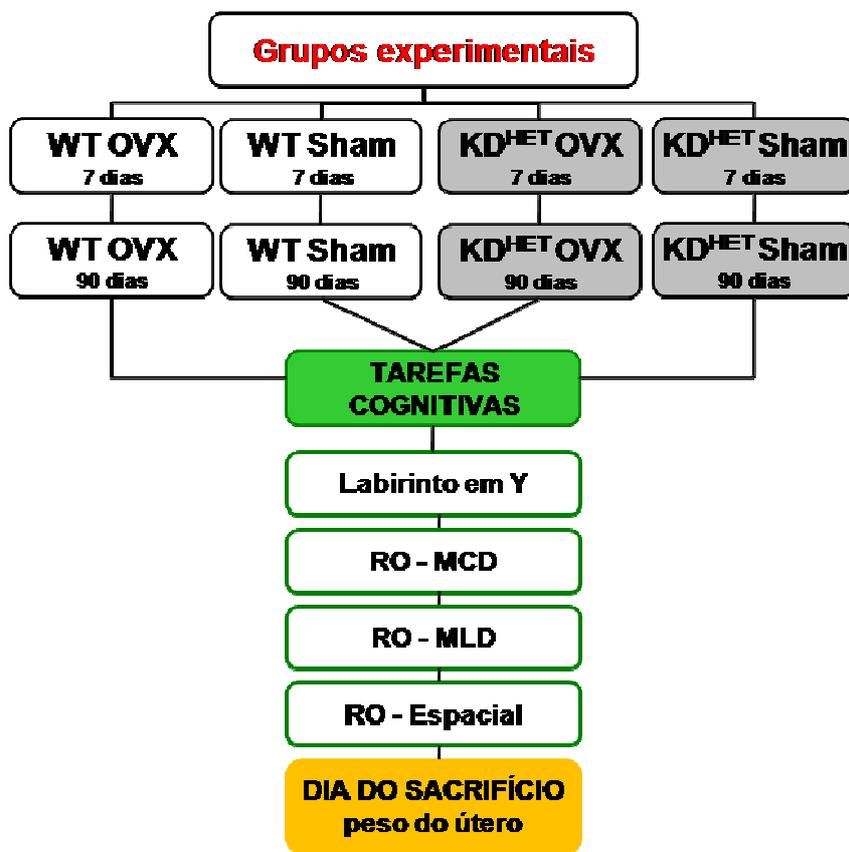


Figura 7 - Design experimental: Avaliação do desempenho cognitivo das fêmeas VACHT KD^{HET} submetidas à privação dos hormônios ovarianos por 7 dias e 90 dias.

🔧 Protocolo 4 - Medidas bioquímicas dos marcadores de estresse oxidativo em fêmeas VACHT KD^{HET} submetidas à privação de longa duração dos hormônios ovarianos

Neste delineamento experimental (Figura 8) utilizamos os animais do Protocolo 3 submetidos à privação de longa duração dos hormônios ovarianos. No momento das dosagens bioquímicas os animais estavam com um período maior de privação

hormonal, aproximadamente 100 dias, já que anteriormente os mesmos foram submetidos às tarefas cognitivas.

Para avaliação do estresse oxidativo cerebral utilizamos a medida da peroxidação lipídica por TBARS e da atividade da SOD em duas estruturas cerebrais, córtex e hipocampo.



Figura 8 - Design experimental: Medidas bioquímicas dos marcadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex de animais submetidos à privação dos hormônios ovarianos por aproximadamente 100 dias.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cada resultado foi analisado através de testes estatísticos específicos. Segue abaixo os testes estatísticos utilizados em cada análise:

- **Avaliação do ciclo estral:**

Ciclos completos - *One-way* ANOVA, *post-hoc* Student-Newman-Keuls (SNK)

Ciclos irregulares - *One-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

Duração dos ciclos estrais completos - Teste de Kruskal-Wallis

Dias em cada fase do ciclo estral - *One-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

- **Avaliação cognitiva:**

CAE - *One-sample* teste-*t* (50%)

Braços visitados no labirinto em Y - *One-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

IR - *One-sample* teste-*t* (0,5)

Tempo de exploração na sessão de treino - *One-way* ANOVA, *post-hoc* SNK

- **Eficiência da cirurgia:**

Peso do útero - Teste-*t* não-pareado

- **Medidas bioquímicas:**

Peroxidação lipídica e SOD - Teste-*t* não-pareado

Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CONTROLE DO CICLO ESTRAL

Foram utilizados 8 animais por genótipo e em cada animal foram realizadas 19 observações da fase do ciclo estral e estas foram cronologicamente acompanhadas a fim de determinar o padrão de ciclagem de cada genótipo.

Os ciclos estrais foram divididos em ciclos completos e ciclos irregulares. Os ciclos completos, ou seja, com a sequência proestro – estro – metaestro – diestro, podem ser observados na Figura 9A e os ciclos irregulares, marcados pela sequência incorreta das fases estrais ou pela persistência de uma única fase, podem ser observados na Figura 9B. Foram avaliados 27 ciclos estrais em cada genótipo, portanto, três ou quatro ciclos por animal. Animais WT tiveram 24 ciclos completos e apenas 3 ciclos irregulares, VACHT KD^{HET} tiveram 18 completos e 9 irregulares, enquanto os animais VACHT KD^{HOM} tiveram 10 completos e 17 irregulares (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado do acompanhamento do ciclo estral durante 19 dias em oito animais de cada genótipo.

Genótipos	Ciclos completos		Ciclos irregulares	
	Total	Média	Total	Média
WT	24	3	3	0,37
VACHT KD ^{HET}	18	2,25	9	1,12
VACHT KD ^{HOM}	10	1,25	17	2,12

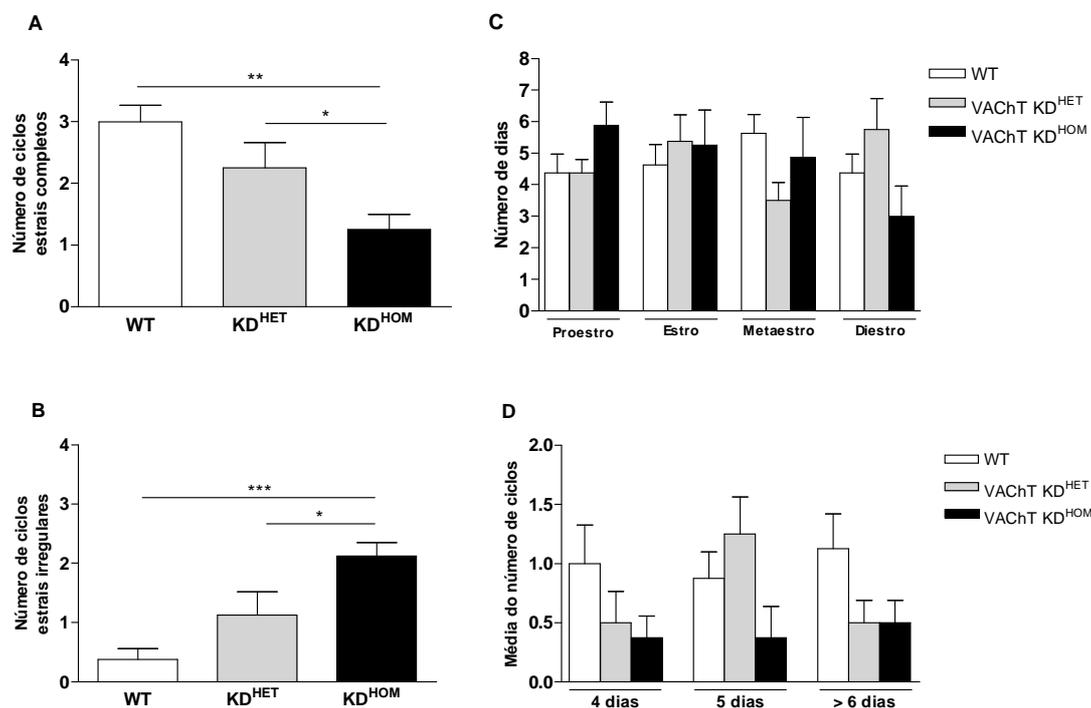


Figura 9 - Ciclo estral de fêmeas do grupo controle, VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM}. Número de ciclos estrais completos (A) e irregulares (B). Dias em cada fase do ciclo estral durante os 19 dias de análise (C). Duração dos ciclos estrais completos (D). Resultados expressos como média \pm EPM do número de ciclos estrais por animal. Número de animais por genótipo = 8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Houve um efeito significativo do genótipo na quantidade de ciclos completos ($F[2,21]=7,6$, $p=0,003$) e irregulares ($F[2,21]=9,5$, $p=0,001$); e os animais VACHT KD^{HOM} apresentam menos ciclos completos e, portanto, um número maior de ciclos irregulares comparado com os outros dois genótipos avaliados.

Para verificar se a maior observação de ciclos irregulares nos VACHT KD^{HOM} poderia ser causada pela maior duração dos ciclos completos, procedemos a análise da duração dos ciclos estrais completos. Os ciclos completos foram

divididos em 3 grupos conforme seu tempo de duração: 4 dias, 5 dias e ≥ 6 dias. Os dados obtidos desta análise (Figura 9D) mostraram que não há diferença entre os genótipos nos ciclos de 4 dias ($KW=2,38$, $p=0,304$), 5 dias ($KW=4,74$, $p=0,093$) e 6 dias ou mais ($KW=3,53$, $p=0,17$). Apesar dos animais VACHT KD^{HOM} terem menos ciclos completos esses animais apresentam ciclos estrais com duração semelhante a dos animais controle.

Durante o período em que o ciclo estral foi acompanhado, não houve diferença entre os genótipos nos dias em cada fase do ciclo estral (Figura 9C), ou seja, o número de dias em proestro ($F[2,21]=2,078$, $p=0,15$), estro ($F[2,21]=0,203$, $p=0,817$), metaestro ($F[2,21]=3,333$, $p=0,055$) ou diestro ($F[2,21]=0,5654$, $p=0,576$) foi comparável nos três genótipos avaliados. Portanto, mesmo as fêmeas VACHT KD^{HOM} tendo mais ciclos não detectáveis, o tempo em que ficam em cada fase do ciclo se compara ao das fêmeas com ciclos completos.

4.2 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VACHT KD

4.2.1 Memória de trabalho - MT

A MT foi testada através do CAE no labirinto em Y. Os animais controle e VACHT KD^{HET} tiveram CAE acima da chance de 50% (Figura 10A; WT: $t_{(11)}=6,878$, $p<0,0001$; KD^{HET}: $t_{(13)}=3,321$, $p=0,0055$), mas os VACHT KD^{HOM} não alternaram acima da chance (KD^{HOM}: $t_{(10)}=1,870$, $p=0,091$). Não houve diferença significativa

entre os genótipos quanto ao número de braços visitados (Figura 10B; $F[2,34]=2,879$, $p=0,07$).

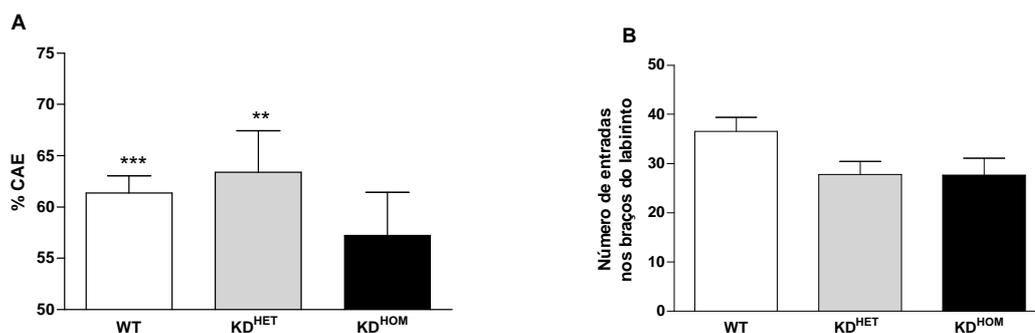


Figura 10 - CAE e número de entradas nos braços do labirinto em Y das fêmeas WT, VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM}. (A) CAE. (B) Número de entradas nos braços. Resultados expressos como média \pm EPM. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ com relação aos 50% de CAE.

4.2.2 Memória de reconhecimento de objetos: MCD

Para análise da MCD usamos o IR da sessão de teste. O IR foi avaliado para verificar se a exploração do objeto novo foi significativamente maior do que a chance (50% do tempo). Durante o teste da MCD os animais controle ($t_{(14)}=5,499$, $p<0,0001$), VACHT KD^{HET} ($t_{(17)}=2,315$, $p=0,033$) e VACHT KD^{HOM} ($t_{(17)}=5,099$, $p<0,0001$) exploraram mais tempo o objeto novo (Figura 11).

Durante a sessão de treino não houve diferença entre os grupos no tempo gasto explorando os objetos (Tabela 2). Os resultados obtidos mostraram que as fêmeas VACHT KD^{HET} e VACHT KD^{HOM} não possuem déficit da MCD, ou seja, diferentes

porcentagem de redução do VAcHT não causou efeito deletério a este tipo de memória.

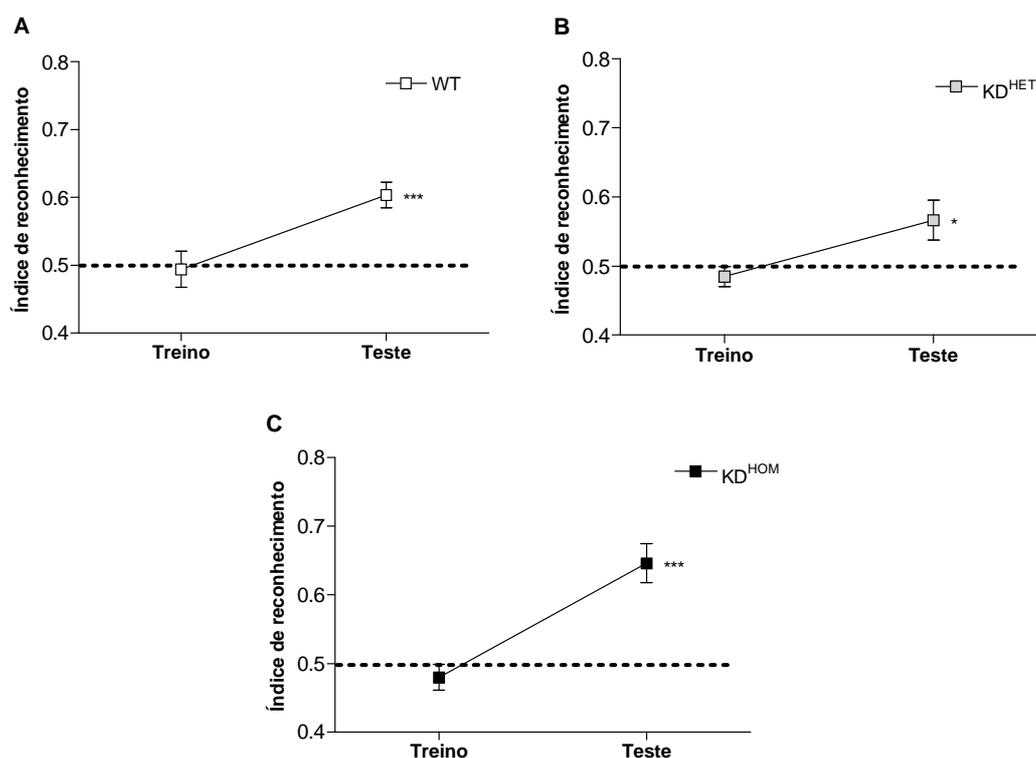


Figura 11 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MCD de fêmeas intactas: (A) WT, (B) VAcHT KD^{HET} e (C) VAcHT KD^{HOM}. Resultados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$.**

Tabela 2 - Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino de diferentes tarefas de RO: MCD, MLD e ME.

Genótipos	Tempo total de exploração*		
	MCD	MLD	ME
WT	59,5 ± 10,2	53,6 ± 5,7	54,8 ± 4,9
VAcHT KD ^{HET}	65,9 ± 6,2	54,7 ± 6,5	46,3 ± 4,6
VAcHT KD ^{HOM}	50,3 ± 6,3	43,0 ± 6,5	44,3 ± 4,9

* Dados expressos como média ± EPM (segundos).

4.2.3 Memória de reconhecimento de objetos: MLD

Durante o teste da MLD os animais controle ($t_{(17)}=2,582$, $p=0,019$) e VACHT KD^{HET} ($t_{(17)}=2,271$, $p=0,036$) exploraram mais tempo o objeto novo. Em contraste, animais VACHT KD^{HOM} foram incapazes de distinguir entre o objeto conhecido e o objeto novo ($t_{(14)}=0,1917$, $p=0,85$) (Figura 12).

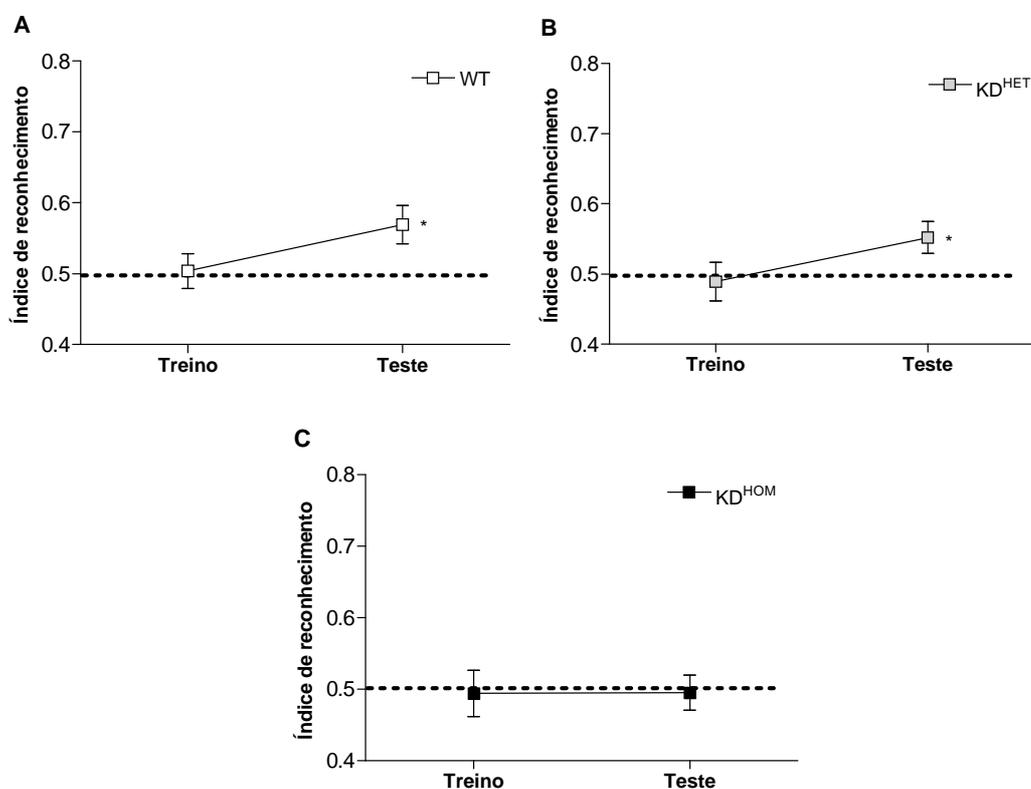


Figura 12 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MLD de fêmeas intactas: (A) WT, (B) VACHT KD^{HET} e (C) VACHT KD^{HOM}. Resultados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos mostraram que apenas as fêmeas VACHT KD^{HOM} possuem déficit da MLD. Durante a sessão de treino não houve diferença entre os genótipos no tempo gasto explorando os objetos (Tabela 2).

4.2.4 Memória de localização espacial de objetos: ME

O IR foi avaliado para verificar se a exploração do objeto na localização espacial nova foi significativamente maior do que a chance (50% do tempo). Durante a sessão de teste os animais controle ($t_{(15)}=4,371$, $p=0,0005$), VACHT KD^{HET} ($t_{(17)}=4,014$, $p=0,0009$) e VACHT KD^{HOM} ($t_{(16)}=5,159$, $p<0,0001$) exploraram mais tempo o objeto na posição nova (Figura 13).

Os resultados obtidos mostraram que as fêmeas VACHT KD^{HOM} não possuem déficit da ME e portanto são capazes de distinguir entre o objeto na posição já conhecida conhecido e o objeto na localização espacial nova. Não houve diferença entre os grupos no tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino (Tabela 2).

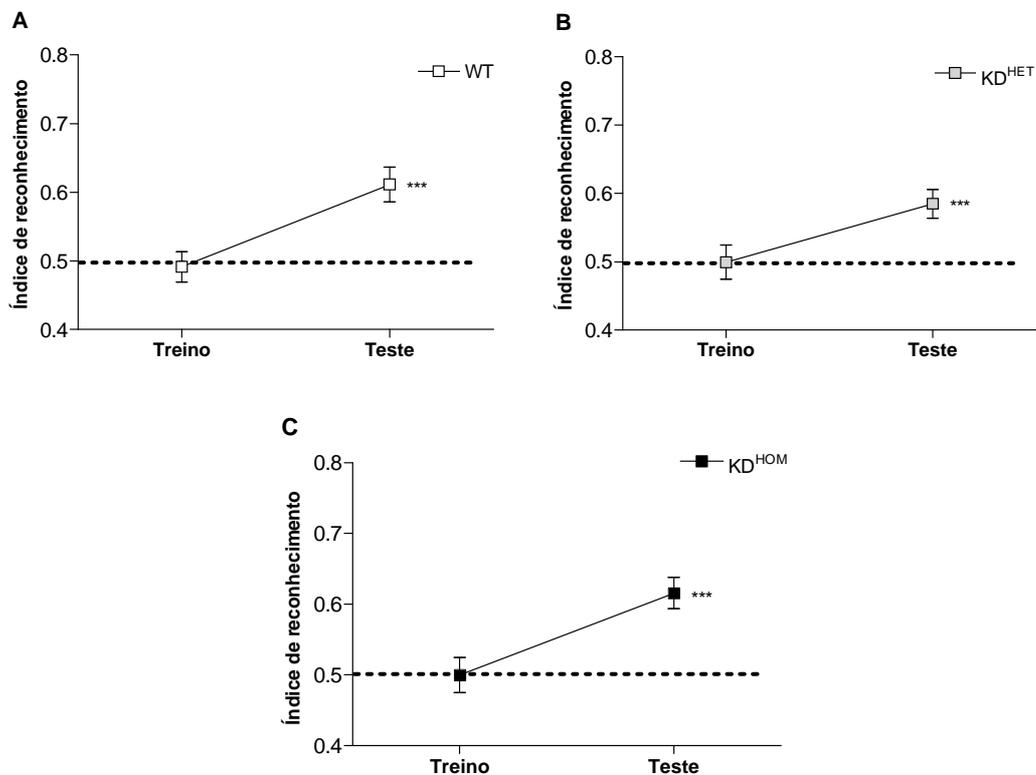


Figura 13 - Índice de reconhecimento na tarefa de localização espacial do objeto para avaliação da ME de fêmeas intactas: (A) WT, (B) VChT KD^{HET} e (C) VChT KD^{HOM}. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,001$.**

4.3 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VChT KD^{HET} SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS

4.3.1 Memória de trabalho - MT

Vários autores sugerem que a MT é sensível à privação dos hormônios sexuais femininos (Luine et al., 1998), e esta memória é fortemente afetada em modelos

animais da DA (Carroll et al., 2007). Para verificar se a OVX prejudica a MT das fêmeas VACHT KD^{HET}, submetemos estes animais ao labirinto em Y 7 dias após a cirurgia de OVX ou *sham* (Figura 14A). Observamos que 7 dias de privação hormonal não prejudicou o desempenho das fêmeas WT e VACHT KD^{HET} e todos os grupos alcançaram o critério do CAE, ou seja, alternaram acima de 50%, (WT *sham*: $t(10)=4,69$, $p=0,0008$; WT OVX: $t(13)=3,9$, $p=0,0018$; KD^{HET} *sham*: $t(9)=3,22$, $p=0,01$; KD^{HET} OVX: $t(11)=3,62$, $p=0,004$). Não houve diferença entre os grupos no número de entradas nos braços do labirinto (Figura 14B, $F[3,43]=0,6729$, $p=0,5734$).

No entanto, um período maior de privação dos hormônios ovarianos pode desencadear os efeitos deletérios da privação hormonal sobre o desempenho cognitivo (Wallace et al., 2006). Para avaliar se a privação hormonal de longa duração afeta a MT dos animais WT e VACHT KD^{HET} os submetemos ao labirinto em Y 90 dias após a cirurgia OVX ou *sham*, e observamos que os animais dos grupos *sham* alternaram normalmente (Figura 14C, WT *sham*: $t_{(6)}=4,681$, $p=0,003$; VACHT KD^{HET} *sham*: $t_{(6)}=2,846$, $p=0,029$), mas ambos os grupos OVX foram incapazes de alternar mais do que 50% (Figura 14C, WT OVX: $t_{(6)}=1,941$, $p=0,100$; VACHT KD^{HET} OVX: $t_{(5)}=1,145$, $p=0,304$). Não houve diferença entre os grupos no número de entradas nos braços do labirinto (Figura 14D, $F[3,23]=0,206$, $p=0,891$).

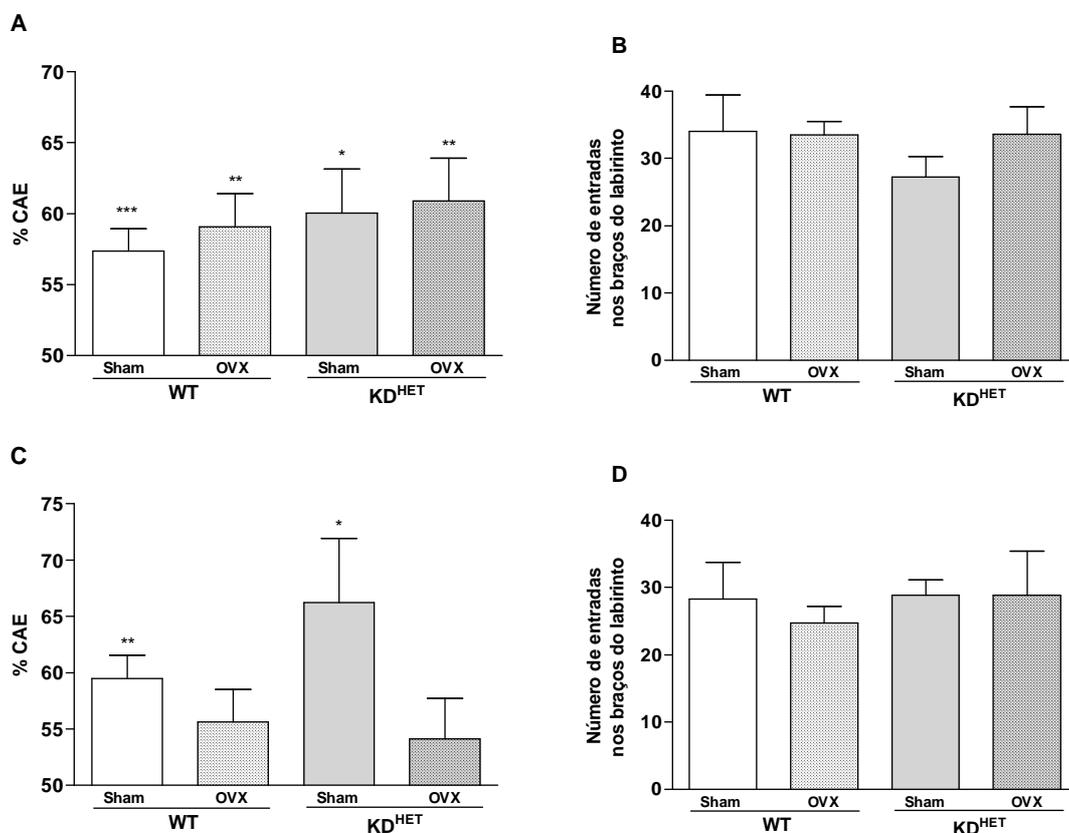


Figura 14 - CAE e número de entradas nos braços do labirinto em Y em fêmeas WT e VChT KD^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração. (A) CAE 7 dias após a cirurgia de OVX ou *sham*. (B) Número de entradas nos braços 7 dias após a cirurgia. (C) CAE 90 dias após a cirurgia de OVX ou *sham*. (D) Número de braços visitados 90 dias após a cirurgia. Resultados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ com relação aos 50% de CAE.

Tomados juntos, estes resultados sugerem que a manipulação genética do VChT não afetou o prejuízo da MT causado pela OVX, já que tanto os animais WT quanto os VChT KD^{HET} foram afetados com este período de privação hormonal.

4.3.2 Memória de reconhecimento de objetos: MCD

Usamos a tarefa de reconhecimento do objeto novo para acessar a MCD dos grupos submetidos à privação dos hormônios ovarianos por uma curta e longa duração. Não houve diferença entre os grupos no tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino (Tabela 3).

Quando avaliamos a MCD 7 dias após a cirurgia ambos os grupos WT, OVX e *sham*, foram capazes de reconhecer o objeto novo (Figura 15A, WT *sham*: $t(10)=2,92$, $p=0,015$; WT OVX: $t(11)=2,41$, $p=0,034$). Entretanto, quando os animais VAcHt KD^{HET} foram testados, somente o grupo *sham* alcançou o critério (Figura 15B, KD^{HET} *sham*: $t(11)=4,09$, $p=0,001$; KD^{HET} OVX: $t(12)=0,44$, $p=0,664$).

Os resultados indicam que a privação de curta duração dos hormônios sexuais femininos não afeta a MCD de animais com função colinérgica normal, mas é suficiente para induzir déficit desta memória em fêmeas com expressão reduzida do VAcHt e, conseqüentemente, com hipofunção colinérgica.

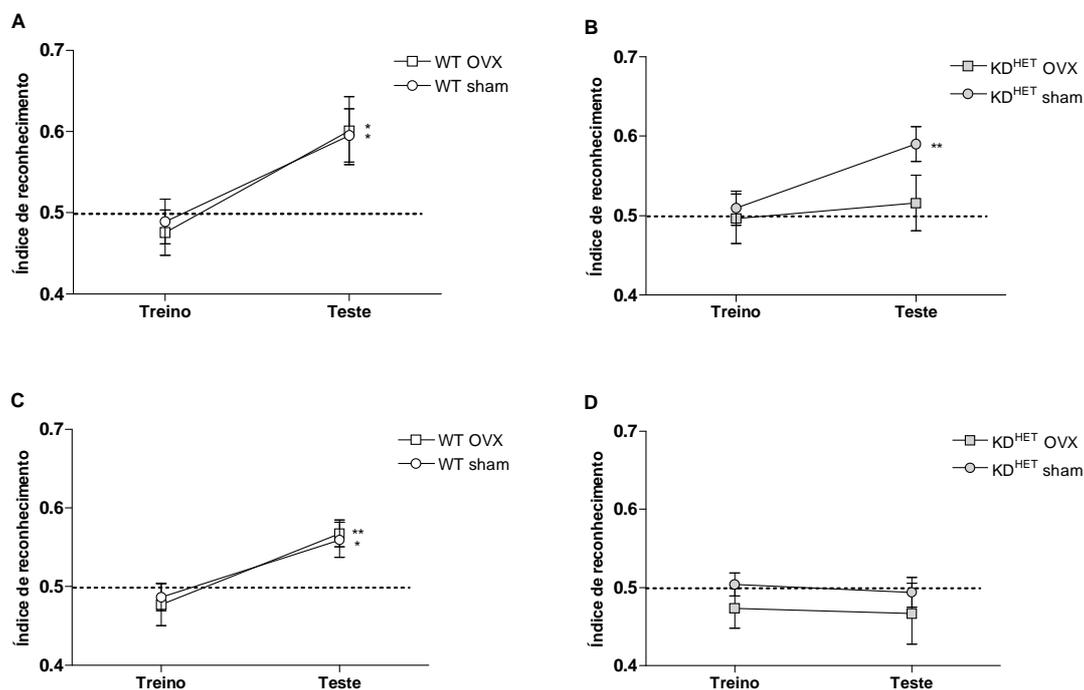


Figura 15 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MCD de fêmeas WT e VACHT KD^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração. A e B - Treino e teste 7 dias após a cirurgia de OVX ou sham. C e D - Treino e teste 90 dias após a cirurgia de OVX ou sham. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Ao avaliarmos a MCD 90 dias após a cirurgia, novamente, ambos os grupos WT foram capazes de reconhecer o objeto novo (Figura 15C, WT sham: $t(9)=2,68$, $p=0,025$; WT OVX: $t(10)=3,92$, $p=0,002$), mas, quando os VACHT KD^{HET} foram testados observamos um prejuízo em ambos os grupos, independente dos níveis dos hormônios sexuais femininos (Figura 15D KD^{HET} sham: $t(12)=0,318$, $p=0,755$; KD^{HET} OVX: $t(11)=0,854$, $p=0,411$).

Diante dos resultados é possível verificar que a privação de longa duração dos hormônios ovarianos não afetou a MCD dos animais com sistema colinérgico normal. E o déficit desta memória observado nas fêmeas mutantes não foi devido à privação hormonal, já que o grupo *sham* também foi prejudicado.

4.3.3 Memória de reconhecimento de objetos: MLD

Quando testamos a MLD dos animais 7 dias depois da OVX, ambos os grupos WT (Figura 16A, WT *sham*: $t(10)=2,59$, $p=0,026$; WT OVX: $t(13)=4,32$, $p<0,001$), bem como as fêmeas mutantes (Figura 16B KD^{HET} *sham*: $t(9)=2,5$, $p=0,033$; KD^{HET} OVX: $t(13)=2,75$, $p=0,016$) apresentaram MLD intacta. Este resultado indica que a MLD das fêmeas mutantes é mais resistente do que a MCD aos efeitos deletérios causados pela privação de curta duração dos hormônios ovarianos.

Os resultados encontrados quando testamos os animais 90 dias após a cirurgia mostraram que os grupos *sham*, independente do genótipo, apresentaram a MLD intacta (Figura 16C, WT *sham*: $t(11)=2,3$, $p=0,04$) (Figura 16D, KD^{HET} *sham*: $t(11)=3,89$, $p=0,002$). Entretanto, ambos os grupos OVX foram incapazes de reconhecer o objeto novo (Figura 16C, WT OVX: $t(9)=1,71$, $p=0,12$; Figura 16D, KD^{HET} OVX: $t(8)=0,24$, $p=0,80$).

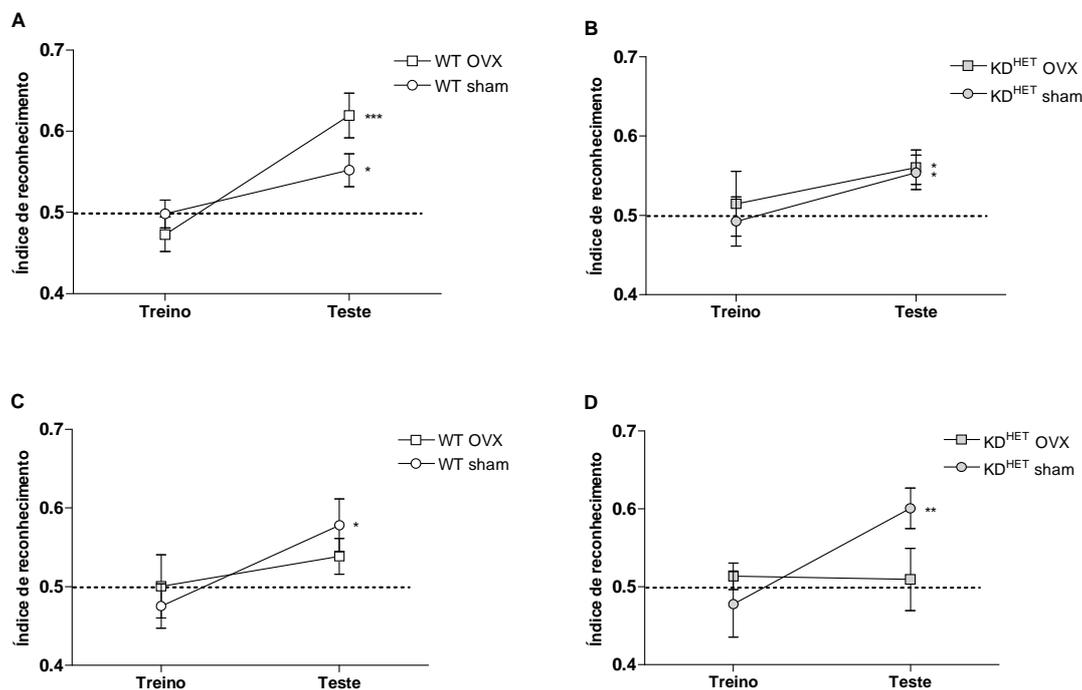


Figura 16 - Índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo para avaliação da MLD de fêmeas WT e VACHT KD^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração. A e B - Treino e teste 7 dias após a cirurgia de OVX ou sham. C e D - Treino e teste 90 dias após a cirurgia de OVX ou sham. Resultados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

Tendo em vista que durante a sessão de treino desta tarefa não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo total de exploração (Tabela 3), estes dados sugerem que a privação dos hormônios sexuais femininos durante uma longa duração prejudica a MLD independente da funcionalidade do sistema colinérgico.

4.3.4 Memória de localização espacial de objetos: ME

A privação hormonal de curta duração não exerceu efeito deletério à ME dos animais WT (Figura 17A, WT *sham*: $t(9)=2,41$, $p=0,039$; WT OVX: $t(7)=3,74$, $p=0,007$). E mesmo 90 dias após a cirurgia, as fêmeas WT OVX, foram capazes de reconhecer a localização espacial dos objetos e tiveram desempenho similar ao das WT *sham* (Figura 17C, WT *sham*: $t(7)=2,74$, $p=0,028$; WT OVX: $t(8)=2,81$, $p=0,022$).

Por outro lado, assim como a MCD, a ME das fêmeas VACHT KD^{HET} foi prejudicada por 7 dias de privação hormonal (Figura 17B, VACHT KD^{HET} *sham*: $t(10)=4,72$, $p<0,001$; VACHT KD^{HET} OVX: $t(9)=1,46$, $p=0,175$) e 90 dias de privação hormonal (Figura 17D, VACHT KD^{HET} *sham*: $t(10)=2,97$, $p=0,013$; VACHT KD^{HET} OVX: $t(7)=1,08$, $p=0,315$).

Não houve diferença entre os grupos no tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino desta tarefa (Tabela 3) e os resultados indicam que a diminuição do VACHT fez com que as fêmeas se tornassem mais sensíveis aos efeitos deletérios sobre a ME causados pela privação hormonal.

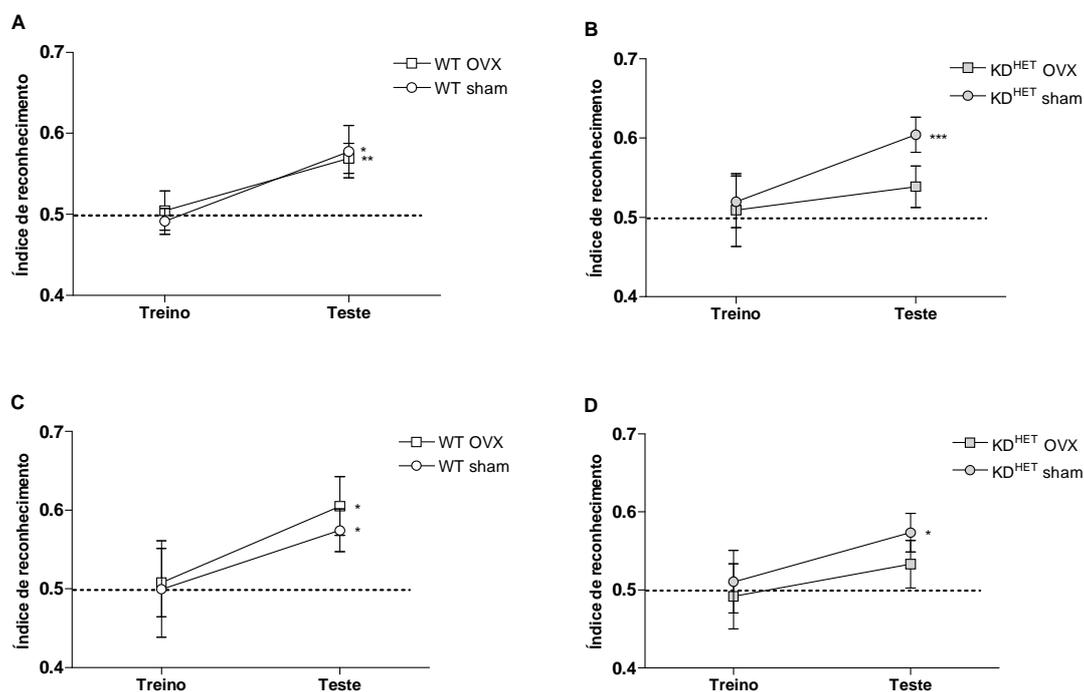


Figura 17 - Índice de reconhecimento na tarefa de localização espacial do objeto para avaliação da ME de fêmeas WT e VACHT KD^{HET} submetidas à privação hormonal de curta duração e de longa duração. A e B - Treino e teste 7 dias após a cirurgia de OVX ou sham. C e D - Treino e teste 90 dias após a cirurgia de OVX ou sham. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,001$.**

Tabela 3 - Tempo total de exploração dos objetos durante as sessões de treino em diferentes tarefas de reconhecimento de objetos: MCD, MLD e ME.

	Genótipos	Tempo total de exploração*		
		MCD	MLD	ME
7 DIAS APÓS A CIRURGIA	WT OVX	44,9 \pm 7,7	39,4 \pm 7,1	38,6 \pm 5,8
	VACHT KD ^{HET} OVX	49,0 \pm 6,6	53,0 \pm 8,3	44,1 \pm 5,5
	WT sham	58,9 \pm 7,6	60,7 \pm 9,1	57,2 \pm 11,3
	VACHT KD ^{HET} sham	54,0 \pm 8,9	47,4 \pm 8,8	47,7 \pm 12,2
90 DIAS APÓS A CIRURGIA	WT OVX	51,3 \pm 9,3	50,3 \pm 9,6	51,4 \pm 14,7
	VACHT KD ^{HET} OVX	46,3 \pm 6,7	33,4 \pm 6,2	50,0 \pm 9,2
	WT sham	56,7 \pm 6,7	47,1 \pm 7,7	63,9 \pm 11,9
	VACHT KD ^{HET} sham	61,7 \pm 7,9	44,2 \pm 6,0	49,9 \pm 8,4

* Dados expressos como média \pm EPM (segundos).

4.3.5 Eficiência da cirurgia

O peso do útero dos animais submetidos à cirurgia OVX foi significativamente menor, comparado ao grupo submetido à cirurgia *sham*, independente do genótipo e do tempo de privação hormonal ser de 7 (WT: $t(9)=5,117$, $p=0,0006$; VACHT KD^{HET}: $t(9)=2,902$, $p=0,017$) ou 90 dias (WT: $t(9)=5,986$, $p=0,0002$; VACHT KD^{HET}: $t(10)=4,783$, $p=0,0007$).

4.4 ESTRESSE OXIDATIVO EM FÊMEAS VACHT KD^{HET} SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS DURANTE 90 DIAS

Em situação de desequilíbrio oxidativo ocorre um aumento nos níveis dos marcadores antioxidantes, como a SOD, e dos pró-oxidantes, como as TBARS. Considerando os efeitos induzidos pela privação dos hormônios ovarianos sobre o equilíbrio oxidativo (Razmara et al., 2007), verificamos se os níveis destes marcadores de estresse oxidativo estavam alterados em fêmeas expostas à um longo período de privação hormonal.

No córtex das fêmeas WT OVX e VACHT KD^{HET} OVX não foi observado aumento da peroxidação lipídica (Figura 18A, VACHT KD^{HET}: $t(10)=0,894$, $p=0,392$; WT: $t(7)=0,393$, $p=0,705$) e da atividade da SOD (Figura 18B, VACHT KD^{HET}: $t(10)=1,428$, $p=0,183$; WT: $t(7)=0,271$, $p=0,793$) quando comparado com o grupo *sham* do mesmo genótipo.

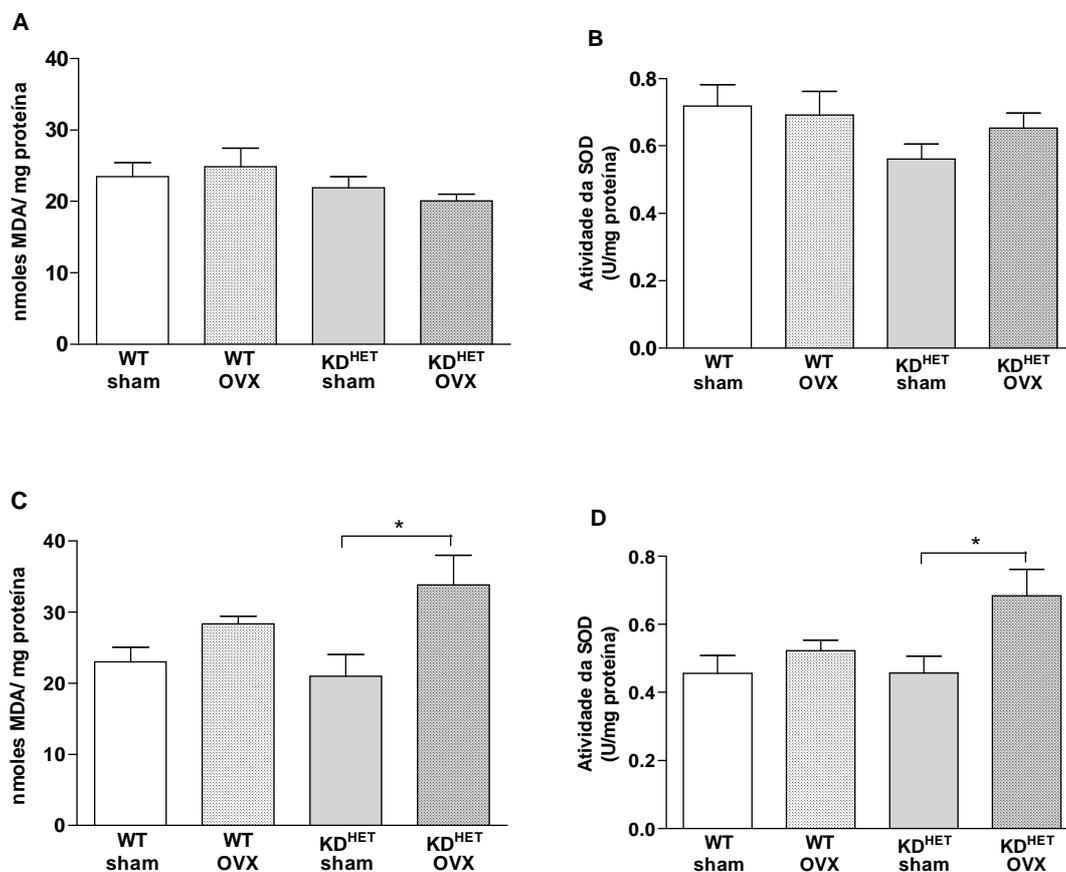


Figura 18 - Níveis dos marcadores de estresse oxidativo no córtex e hipocampo de animais WT e VACHT KD^{HET} após privação hormonal de longa duração. (A) TBARS em amostras de córtex. (B) Atividade da SOD em amostras de córtex. (C) TBARS em amostras de hipocampo. (D) Atividade da SOD em amostras de hipocampo. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

As amostras de hipocampo das fêmeas WT sham apresentaram os mesmos níveis de peroxidação lipídica (Figura 18C, $t(6)=2,33$, $p=0,058$) e atividade da SOD (Figura 18D, $t(6)=1,09$, $p=0,31$) quando comparado com WT OVX. Por outro lado, as amostras hipocampais das fêmeas VACHT KD^{HET} OVX apresentaram níveis elevados de peroxidação lipídica (Figura 18C, $t(9)=2,49$, $p=0,034$) e atividade da

SOD (Figura 18D, $t(9)=2,60$, $p=0,028$) quando comparado com o grupo *sham* do mesmo genótipo.

Portanto, nas análises de amostras do córtex não encontramos o mesmo padrão de resultados das amostras de hipocampo. O aumento dos marcadores de estresse oxidativo encontrados nas amostras hipocámpais das fêmeas VChT KD^{HET} OVX não foi observado nas amostras de córtex dos mesmos animais.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 SISTEMA COLINÉRGICO E CICLO ESTRAL

Os resultados obtidos no protocolo de caracterização do ciclo estral mostraram que o padrão de ciclagem das fêmeas VACHT KD^{HET} foi semelhante ao das fêmeas controle, indicando que a redução do VACHT presente nestes animais não é suficiente para alterar o ciclo estral.

Em estudo realizado por Prestes e colaboradores (dados não publicados) casais de machos WT e fêmeas WT ou VACHT KD^{HET} foram acompanhados durante nove meses. Os dados deste estudo mostraram que não há diferença entre fêmeas WT e VACHT KD^{HET} quanto ao número de gestações e intervalo entre as gestações e as fêmeas VACHT KD^{HET} até tiveram mais filhotes por ninhada do que as fêmeas controle. Assim como os nossos resultados, este estudo não observou diferenças no ciclo estral de animais WT e VACHT KD^{HET}. Estes dados indicam que as fêmeas VACHT KD^{HET} apresentam uma fertilidade comparável à das fêmeas controle, um indício de que nesse genótipo a função ovariana está normal. Os autores não analisaram fêmeas KD^{HOM}.

Por outro lado, uma maior redução da expressão do VACHT, observada nas fêmeas VACHT KD^{HOM}, acarretou na predominância de ciclos estrais irregulares. A irregularidade dos ciclos estrais das fêmeas VACHT KD^{HOM} pode estar relacionada

com ações colinérgicas central e periférica que podem modular as funções reprodutivas.

O controle neuroendócrino do ciclo ovulatório é mediado pela neurosecreção pulsátil do hormônio hipotalâmico GnRH (hormônio de liberação das gonadotrofinas). O GnRH age sobre a hipófise promovendo a síntese e a liberação dos hormônios gonadotróficos, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante). As gonadotrofinas agem em receptores ovarianos regulando a esteroidogênese, a foliculogênese e a ovulação (Morrison et al., 2006).

Os neurônios hipotalâmicos são inervados por vias colinérgicas aferentes e no hipotálamo a ACh exerce efeito modulatório positivo sobre a frequência e amplitude de secreção do GnRH. Esta ação colinérgica central regula a secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, as funções reprodutivas (Krsmanovic et al., 1998; Turi et al., 2008). As fêmeas VACHT KD^{HOM} possivelmente falham em modular a liberação de GnRH, o que pode ter contribuído para os resultados observados no acompanhamento do ciclo estral das fêmeas deste genótipo.

Além do sistema regulatório neuroendócrino clássico, hipotálamo-hipófise-ovário, existe uma ligação direta entre o SNC e os ovários, através de uma via neuronal multi-sináptica, pela qual o cérebro também controla as funções ovarianas (Gerendai et al., 1995; Gerendai et al., 1998). As fibras nervosas que alcançam os ovários consistem em fibras simpáticas, fibras sensoriais e poucas fibras parassimpáticas (Gioia, 1996). A inervação parassimpática dos ovários é

constituída por fibras colinérgicas e alcança a glândula via eferentes do nervo vago ou ramos do plexo hipogástrico, já a inervação simpática é representada, principalmente, por fibras adrenérgicas, e alcança os ovários pelo plexo ovariano e nervo ovariano superior (Aguado, 2002; Gerendai et al., 2000; Morales-Ledesma et al., 2004).

Esta inervação autonômica ovariana é importante para regulação das funções reprodutivas (Gerendai et al., 2005). Estudos demonstraram que as fibras simpáticas estimulam a esteroidogênese, a maturação dos oócitos e controlam a contração ovariana, enquanto as fibras parassimpáticas também regulam a esteroidogênese e exercem efeito inibitório sobre a maturação dos oócitos (ver Morales-Ledesma et al., 2004). Mas, sabendo que a inervação ovariana predominante é noradrenérgica (Aguado e Ojeda, 1984; Bahr e Ben-Jonathan, 1981; Mayerhofer e Fritz, 2002), no modelo VAcHT KD a função ovariana pode não ser drasticamente afetada pela menor liberação de ACh pelas fibras autonômicas colinérgicas.

No entanto, a inervação parassimpática não é a principal fonte de ACh para os ovários e evidências recentes mostraram que os ovários são capazes de produzir ACh, apontando a existência de um sistema colinérgico não neuronal ovariano (Fritz et al., 2001; Mayerhofer et al., 2003).

As células da granulosa (CG) dos folículos antrais expressam ChAT, VAcHT e receptores muscarínicos (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001), e são capazes de

produzir ACh através da estimulação pelo hormônio FSH (Mayerhofer et al., 2006). Estudos com cultura de CG de camundongos, humanos e de outras espécies demonstraram que a ACh ovariana funciona como uma molécula de sinalização, um citotransmissor (Mayerhofer e Fritz, 2002; Mayerhofer e Kunz, 2005).

A ACh liberada age de maneira autócrina e parácrina sobre os ovócitos e CG. Suas ações consistem na ativação de canais iônicos, aumento dos níveis de cálcio intracelular, prejuízo das junções comunicantes, estimulação da proliferação celular e da esteroidogênese ovariana (Kornya et al., 2001; Luck, 1990; Mayerhofer e Kunz, 2005). A ACh eleva os níveis de cálcio intracelular, promovendo a abertura dos canais de potássio ativados por cálcio, resultando na hiperpolarização da membrana (Kunz et al., 2002), evento envolvido com a esteroidogênese (Kunz et al., 2006; Kunz et al., 2007; Traut et al., 2009).

A ACh exerce efeito modulatório direto sobre a produção dos hormônios ovarianos e esse efeito pode exercer um papel fisiológico na regulação do ciclo estral (Kornya et al., 2001). Portanto, a menor liberação de ACh pelos ovários pode implicar em uma menor produção de esteróides e, conseqüentemente, em alterações do ciclo estral, sendo o último observado nas fêmeas VAcHT KD^{HOM}.

Além disso, Mayerhofer e colaboradores com o intuito de verificar a importância do sistema colinérgico sobre as funções ovarianas, utilizaram em seus estudos animais nocautes para a ChAT. Este modelo de hipofunção colinérgica permite somente o estudo da função ovariana neonatal, já que os animais são natimortos.

Nos nocautes neonatais o desenvolvimento ovariano foi normal com relação ao tamanho do órgão e composição celular (Mayerhofer et al., 2006). Mas a ACh ovariana começa a ser produzida na vida pós-natal, quando os folículos ovarianos iniciam seu desenvolvimento. Logo, camundongos VAcHT KD tornam-se um modelo ideal para a avaliação pós-natal da função ovariana na presença de baixos níveis de ACh.

O padrão aberrante de ciclagem das fêmeas VAcHT KD^{HOM} é um indicativo de que neste genótipo as funções reprodutivas estão alteradas, mas as análises revelaram que estas não tiveram estro ou diestro vaginal constante, condição relacionada com a falta de ciclicidade. Portanto, a realização de análises histológicas ovarianas e dosagens plasmáticas de E₂, P₄, FSH e LH em diferentes fases do ciclo estral são passos importantes para inferências a respeito da relação entre o sistema colinérgico e as funções reprodutivas das fêmeas VAcHT KD.

5.2 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VAcHT KD INTACTAS

Existe controvérsia sobre a capacidade de diferentes fases do ciclo estral influenciar a memória em roedores. Alguns autores afirmam que diferentes fases do ciclo estral não influenciam a memória de RO (Sutcliffe et al., 2007), porém outros afirmam que diferentes fases podem alterar o desempenho da MT e da memória de RO (Walf et al., 2009; Walf et al., 2006). Portanto, ainda não é claro

se flutuações nos níveis dos hormônios sexuais femininos podem influenciar os componentes desses tipos de memória.

O nosso objetivo neste estudo não foi verificar os efeitos mnemônicos das flutuações endógenas dos esteróides ovarianos nas fêmeas VACHT KD intactas, por isso, os animais foram randomizados com respeito à fase do ciclo estral e nossos resultados são de fêmeas em diferentes fases do ciclo.

Os resultados cognitivos das fêmeas intactas mostraram que as fêmeas VACHT KD^{HET} tiveram desempenho similar ao das fêmeas controle quando submetidas ao labirinto em Y, mas os animais VACHT KD^{HOM} apresentaram prejuízo da MT.

Alguns autores mostraram que o prejuízo colinérgico promovido por injeções intraseptal da imunotoxina seletiva para neurônios colinérgicos - IgG-192 saporina (Gibbs, 2002; Gibbs e Johnson, 2007) ou de antagonistas colinérgicos (Redrobe et al., 2009) promove déficits na MT. O CAE é normal nos animais VACHT KD^{HET} machos (de Castro et al., 2009) e fêmeas. Portanto, a ausência de comprometimento da MT no modelo genético VACHT KD pode refletir um mecanismo de adaptação não observado nos modelos farmacológicos. E uma explicação alternativa para a ausência de déficit na MT no modelo genético é o tipo da tarefa de MT que utilizamos. Realizamos o labirinto em Y com apenas uma sessão, uma tarefa mais simples, baseada no CAE. A demanda de atenção é menor do que a necessária em tarefas, como o labirinto de oito braços, em que são necessárias diversas sessões de aprendizado.

Nenhum dos genótipos apresentou déficit da MCD. E, novamente, apenas as fêmeas VAcHT KD^{HOM} apresentaram prejuízo da MLD. Portanto, verificamos que a redução de 45% do VAcHT (KD^{HET}) não foi suficiente para prejudicar a MT e MLD, porém, uma redução de 65% (KD^{HOM}) promoveu efeitos deletérios à estas memórias.

Em modelos farmacológicos de hipofunção colinérgica induzida pelo uso da IgG-192 saporina foi observado que extensivas lesões colinérgicas diminuem o efeito positivo dos hormônios femininos sobre o desempenho cognitivo (Gibbs, 2002; Gibbs, 2007). Em pacientes com DA o declínio progressivo nos níveis corticais, hipocámpais e estriatais de ACh se correlacionam positivamente com o declínio cognitivo (Shughrue et al., 2000). Estes achados corroboram com os nossos resultados, pois uma menor liberação central de ACh nas fêmeas VAcHT KD^{HOM} resultou em maior prejuízo cognitivo.

Os animais VAcHT KD^{HOM} apresentaram MCD intacta, mas déficit da MLD. A dicotomia destes resultados é apenas aparente, pois de fato, existem diferenças entre a MCD e MLD (Izquierdo et al., 1998a). Na tarefa de RO é possível ter prejuízo da consolidação da MLD sem ocorrer déficit da MCD (Rossato et al., 2007) (ver tópico 5.7 - Modulação diferencial da MCD e MLD).

Avaliamos também a ME nos animais VAcHT KD e nossos resultados mostraram que todos os genótipos apresentaram ME intacta. Sabe-se que a neurotransmissão colinérgica participa na formação da ME de objetos, e a

administração pré-treino de escopolamina causa efeito deletério a esta memória (Murai et al., 2007). Mas, embora as evidências indiquem que a ACh desempenha um papel importante na modulação hipocampal da ME (Rogers e Kesner, 2003), a hipofunção colinérgica das fêmeas VAcHT KD^{HET} e KD^{HOM} não é suficiente para causar déficit da ME na tarefa de localização de objetos.

A região CA1 hipocampal é uma região recrutada durante a tarefa de reconhecimento de objetos e um recente estudo demonstrou que esta região também está envolvida na tarefa de localização espacial de objetos (Assini et al., 2009). Considerando que usamos um intervalo de 60 minutos entre a sessão de treino e de teste, conhecido na literatura como suficiente para avaliação da ME (Murai et al., 2007), e que o processo de síntese proteica envolvido com a consolidação da memória de objetos ocorre somente após 180 minutos do aprendizado (Rossato et al., 2007), avaliamos o componente espacial de uma MCD, e não de uma MLD. Portanto, os resultados similares obtidos nas tarefas de MCD e de ME sugerem que o funcionamento das vias hipocampais recrutadas para a formação destas memórias não são afetadas pela hipofunção colinérgica induzida pela diminuição na expressão do VAcHT.

Claramente, as fêmeas VAcHT KD^{HOM} possuem déficit da MT e MLD devido à hipofunção colinérgica. Porém, a irregularidade do ciclo estral e, portanto, possíveis alterações nos níveis circulantes e cerebrais dos hormônios femininos podem ter contribuído para este déficit.

5.3 DIFERENÇAS COGNITIVAS ENTRE MACHOS E FÊMEAS VACHT KD

Os machos VACHT KD^{HET} apresentam déficit da MCD e MLD (Prado et al., 2006), com MT intacta (de Castro et al., 2009). Já as fêmeas VACHT KD^{HET} não apresentaram prejuízo em nenhuma dessas memórias, o que pode ser um indicativo de dimorfismo sexual cognitivo (tabela 4).

Tabela 4 - Quadro comparativo do desempenho cognitivo de machos e fêmeas WT e VACHT KD.

	MT	MCD	MLD
FÊMEAS - VACHT KD^{HET}	+	+	+
MACHOS - VACHT KD^{HET}	+		

O sinal + significa que nestes grupos, para o tipo de memória em questão, não houve déficit cognitivo.

Sabe-se que os estrógenos podem melhorar as funções cognitivas através de suas ações sobre o sistema colinérgico, modulando a produção e liberação de ACh, seus sítios de ação e os fatores tróficos que apóiam os neurônios colinérgicos (Shughrue et al., 2000). Logo, a diferença no desempenho cognitivo de fêmeas e machos VACHT KD^{HET} pode ser resultado dos efeitos plásticos dos hormônios femininos sobre o sistema colinérgico, já que as fêmeas VACHT KD^{HET} apresentam um ciclo estral normal.

Apoiando esta hipótese, estudos ultra-estruturais mostraram que marcadores de neurônios colinérgicos, como o VACHT, se co-localizam com os RE α , na região

CA1 hipocampal (Towart et al., 2003) e que os neurônios colinérgicos de fêmeas, mas não de machos, respondem morfológicamente ao tratamento com E₂ (Dominguez et al., 2004). Portanto, é razoável supor que os níveis de estrógenos podem estar modulando positivamente o sistema colinérgico das fêmeas VAcHT KD^{HET}, possibilitando que elas armazenem estas memórias mesmo com expressão diminuída do VAcHT. No entanto, essa modulação parece não ser suficiente quando se trata de uma maior diminuição na expressão do VAcHT.

O desempenho cognitivo de machos (dados não publicados) e fêmeas VAcHT KD^{HOM} foi similar, quando a memória testada foi a MLD, ou seja, ambos os gêneros apresentam prejuízos nesta memória. Porém, as fêmeas VAcHT KD^{HOM} possuem MCD intacta, ao passo que os machos do mesmo genótipo não. Mas, o déficit de MT observado em fêmeas VAcHT KD^{HOM} foi ausente em machos do mesmo genótipo (dados não publicados). Como as fêmeas VAcHT KD^{HOM} apresentam uma maior quantidade de ciclos estrais irregulares em relação às fêmeas com funcionamento colinérgico normal, o possível desequilíbrio na produção de hormônios femininos nestas fêmeas pode ter sido um fator agravante sobre a MT, que é uma memória diferente da MCD, MLD e ME.

5.4 DESEMPENHO COGNITIVO DAS FÊMEAS VAcHT KD^{HET} APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE PRIVAÇÃO HORMONAL

Devido aos achados de que as fêmeas VAcHT KD^{HOM} apresentam irregularidade no ciclo estral e possuem déficit da MT e MLD, optamos por avaliar os efeitos da privação hormonal sobre diferentes memórias apenas em fêmeas VAcHT KD^{HET}.

São escassos os estudos cognitivos com fêmeas submetidas a diferentes períodos de privação hormonal, por isso os resultados das fêmeas VAcHT KD^{HET}, assim como das fêmeas WT, são valiosos no entendimento da relação temporal e funcional entre a perda dos hormônios femininos e a cognição (tabela 5). Alguns estudos afirmam que a OVX não exerce efeito significativo sobre o desempenho cognitivo, porém a maioria utilizou um período curto de privação hormonal. E, no entanto, os principais efeitos da privação hormonal sobre a cognição são encontrados depois de longo período de OVX. Por isso, os efeitos plásticos da perda dos hormônios ovarianos sobre os sistemas neurais requererem algum tempo para que sejam observados e, seguramente, alguns deles são encontrados somente após longo período de OVX (Singh et al., 1994; Vaucher et al., 2001).

5.4.1 Efeito da privação hormonal na MT

Nossos resultados demonstraram um efeito tempo-dependente e genótipo-independente da OVX na MT. Após longo período de privação hormonal tanto os camundongos WT quanto os VAcHT KD^{HET} tiveram prejuízo na MT. Este resultado indica que independente do funcionamento colinérgico, este tipo de memória responde igualmente aos efeitos deletérios da OVX.

De fato, a ausência de hormônios sexuais femininos por aproximadamente 30 dias induz déficits da MT, quando a tarefa utilizada foi o labirinto de oito braços (Bimonte e Denenberg, 1999) ou o labirinto em T (Fader et al., 1998; Miller et al., 1999), sendo que este efeito foi revertido pela TRH com E₂. Provavelmente, nesses casos, a TRH reverteu os déficits da MT por mecanismos que não envolvem o sistema colinérgico, pois como vimos em nossos resultados a privação hormonal de longa duração afetou igualmente a MT de fêmeas WT e VChT KD^{HET}.

Utilizando um modelo animal da DA, Carroll e colaboradores mostraram que 90 dias de OVX reduz o CAE no labirinto em Y e que este efeito é revertido com TRH, mas, ao contrário dos nossos achados, 90 dias de privação hormonal não causou prejuízo aos animais WT (Carroll et al., 2007). O protocolo do labirinto em Y e o tempo de privação hormonal que utilizamos foram iguais ao do estudo citado, mas sabemos que o efeito deletério da OVX é maior em fêmeas de mais idade (Markowska e Grinnell, 1999; Markowska e Savonenko, 2002). Em nossos experimentos as fêmeas WT OVX após 90 dias de privação hormonal se encontravam com 9-10 meses de idade, portanto, a ausência de déficit nas fêmeas WT OVX do estudo de Carroll et al (2007) pode ter sido em decorrência do fato dos autores terem utilizados fêmeas de 6 meses de idade para a tarefa do labirinto em Y.

Inicialmente, esperávamos que apenas as fêmeas VAcHt KD^{HET} OVX apresentassem uma deterioração da MT após 90 dias de OVX. No entanto, ambos os genótipos foram afetados pela privação hormonal de longa duração.

De fato, ratas OVX são mais sensíveis do que ratas *sham* aos prejuízos induzidos pela escopolamina na MT (Markowska e Savonenko, 2002). Além disso, a TRH com E₂ em ratas jovens OVX previne o efeito amnésico da escopolamina sobre a MT (Fader et al., 1999; Gibbs, 1999), mas não em ratas idosas OVX (Gibbs, 2000b; Markowska e Savonenko, 2002). O mesmo ocorre em ratas idosas com perda natural da função ovariana, nas quais a TRH com E₂ é capaz de reverter o efeito deletério da idade sobre a memória, mas não o induzido pela escopolamina (Markowska e Savonenko, 2002). Tomados em conjunto, estes estudos indicam claramente que nem todos os efeitos estrogênicos são dependentes do sistema colinérgico.

5.4.2 Efeito da privação hormonal na MCD das fêmeas VAcHt KD^{HET}

Não houve efeito da OVX sobre a MCD em camundongos WT testados 7 ou 90 dias após a cirurgia, mostrando que este tipo de memória, em condições colinérgicas normais, é resistente aos eventos plásticos promovidos pela privação dos hormônios femininos.

Já as fêmeas VAcHT KD^{HET} OVX testadas 7 dias após a cirurgia foram incapazes de reconhecer o objeto novo, mostrando um efeito específico da OVX sobre o genótipo. Existem várias evidências mostrando um forte efeito do E₂ sobre o sistema colinérgico. Usando uma abordagem *in vivo*, Ping e colaboradores trataram ratas OVX com E₂ e observaram um aumento no tamanho do soma celular e na atividade da CHAT em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (Ping et al., 2008). O contrário também ocorre, ou seja, a privação dos hormônios femininos pela OVX induz diminuição da atividade da CHAT (Heikkinen et al., 2002), da recaptação de colina (O'Malley et al., 1987) e da liberação de ACh (Gibbs et al., 1997; Yamamoto et al., 2007).

Além dos estudos com roedores, existem pesquisas com humanos sobre os efeitos dos estrógenos no sistema colinérgico. O bloqueio colinérgico causa prejuízo no desempenho da tarefa de reconhecimento verbal e quando associado com a perda da função ovariana ocorre aumento nos erros cometidos no desempenho desta tarefa (Craig et al., 2009). Em mulheres pós-menopausa, um longo período de TRH com E₂ se correlaciona com o aumento na expressão do VAcHT no córtex frontal e córtex cingulado, áreas essenciais para a aprendizagem e memória (Smith et al., 2001). Portanto, várias evidências básico-clínicas indicam que os neurônios colinérgicos podem ser alvos para os estrógenos em áreas cerebrais não diretamente envolvidas com a reprodução.

5.4.3 Efeito da idade na MCD das fêmeas VAcHT KD^{HET}

Um resultado marcante foi o déficit da MCD apresentado pelas fêmeas VACHT KD^{HET} OVX e *sham* 90 dias após a cirurgia. Não podemos atribuir este resultado à privação hormonal, já que mesmo o grupo VACHT KD^{HET} *sham* apresentou déficit. No entanto, inferimos que o prejuízo da MCD está associado com a idade, ou seja, a hipofunção colinérgica faz com que as fêmeas VACHT KD^{HET} sejam mais vulneráveis aos efeitos deletérios da idade, sendo possível observar neste genótipo um início precoce dos efeitos da idade sobre o desempenho cognitivo.

No protocolo de acompanhamento do ciclo estral, realizado com fêmeas de 5 meses de idade, as fêmeas VACHT KD^{HET} tiveram um padrão de ciclagem normal. Por termos observado um início precoce dos efeitos deletérios da idade sobre o desempenho cognitivo dos animais VACHT KD^{HET}, especulamos que após 90 dias da cirurgia, já com 9-10 meses de idade, estas fêmeas apresentem alterações no ciclo estral, o que somado à hipofunção colinérgica, leva à déficits cognitivos.

O início do declínio mnemônico em ratos (Bimonte et al., 2003; Markowska, 1999) e camundongos (Frick et al., 2000; Grootendorst et al., 2004) de meia-idade é concomitante com a cessação do ciclo estral. Animais WT *sham* não apresentaram prejuízo da MCD quando avaliados entre 9-10 meses de idade, indicando que em animais com função colinérgica normal nesta idade, provavelmente, ainda não ocorre a diminuição idade-dependente de ACh hipocampal e nem a irregularidade dos ciclos estrais, o que poderia acarretar em

déficits cognitivos (Ikarashi et al., 2004). Assim, a redução da expressão do VAcHt pode ser o fator responsável pelo déficit na MCD.

5.4.4 Efeito da privação hormonal na ME

A privação hormonal de curta e longa duração causou prejuízo da ME em fêmeas VAcHt KD^{HET} OVX, mas não em fêmeas WT, um indicativo de que a hipofunção colinérgica aumentou a susceptibilidade aos efeitos deletérios da privação dos hormônios ovarianos sobre a ME. Além disso, o déficit na ME foi observado apenas nos animais KD^{HET} OVX, o que exclui qualquer efeito da idade dos animais com hipofunção colinérgica submetidos ao teste de ME 90 dias após a cirurgia.

Lesões bilaterais do córtex pré-frontal medial e córtex perirrinal não foram capazes de prejudicar a ME de ratos, porém prejudicaram a MCD (Barker et al., 2007). Lesões no córtex perirrinal de macacos não causou déficit num teste de localização espacial de objeto, porém prejudicou o teste de reconhecimento de objeto novo (Bachevalier e Nemanic, 2008). Estes estudos apontam para uma modulação diferencial das ME e MCD, ou seja, o córtex perirrinal parece ser essencial para a manutenção da MCD, mas não para a ME.

Nossos resultados mostraram que a MCD e ME das fêmeas VAcHt KD^{HET} foram igualmente afetadas pela privação hormonal, portanto, é razoável assumir que a concomitante hipofunção colinérgica e ovariana afetam igualmente as regiões

cerebrais recrutadas durante a tarefa de reconhecimento e de localização espacial de objetos.

Entretanto, nas fêmeas com hipofunção colinérgica as regiões envolvidas com a formação da MCD, como o córtex perirrinal, são as primeiras a sofrer danos relacionados à idade que afetam o desempenho cognitivo. Já as estruturas recrutadas para formação da ME são mais resistentes ao efeito deletério da idade nas fêmeas com hipofunção colinérgica.

Os estudos sobre os efeitos dos hormônios sexuais femininos na ME são controversos. Alguns estudos dizem que os estrógenos promovem efeitos deletérios em tarefas de ME, como no labirinto aquático (Frye, 1995), e que fêmeas em estro, fase de baixos níveis hormonais, desempenham melhor a tarefa de localização espacial de objeto (Sutcliffe et al., 2007), por outro lado outros trabalhos afirmam que o tratamento com estrógenos melhora o desempenho cognitivo, como no labirinto aquático (Heikkinen et al., 2002) e no labirinto de oito braços (Ziegler e Gallagher, 2005).

Nossos resultados não apóiam a hipótese de os estrógenos exercem um efeito negativo sobre a ME, já que as fêmeas controle não apresentaram déficit da ME. No entanto, utilizamos o intervalo de 1 hora entre a sessão de treino e a sessão de teste, e já foi demonstrado que este é o período máximo para que os animais discriminem o objeto na localização espacial nova, independente do nível hormonal circulante (Sutcliffe et al., 2007).

5.4.5 Privação dos hormônios ovarianos prejudica seletivamente algumas memórias

Nossos resultados mostraram que algumas memórias específicas são prejudicadas pela privação hormonal de longa duração, independente da função colinérgica. Ambos os genótipos analisados, 90 dias após OVX, foram incapazes de alternar acima da chance no labirinto em Y e de reconhecer o objeto novo quando testado 24 horas após o treino. Em contraste, nenhum efeito específico da OVX sobre a MCD foi observado. De fato, a MT e MLD compartilham algumas características em comum.

A MT é o sistema que mantém as informações armazenadas temporariamente durante o planejamento e execução de uma tarefa. Embora trabalhos iniciais tenham sugerido que os sistemas da MT e da MLD eram funcionalmente independentes (Baddeley e Warrington, 1973; Shallice e Warrington, 1970), outros estudos sugeriram haver uma forte inter-relação entre esses dois sistemas de memória (Atkinson e Shiffrin, 1971). Em apoio a esta última sugestão, achados recentes de estudos de imagem funcional afirmam que as estruturas do lobo temporal medial, uma região fortemente associado com a MLD, podem também desempenhar um papel fundamental na MT (Ranganath et al., 2005; Ranganath e D'Esposito, 2001). A associação entre MT e MLD é recíproca, além de receber *inputs* da MLD, a MT funciona como um canal para a aquisição de mais representações de conhecimentos permanentes (Baddeley et al., 1998).

Após 90 dias de privação dos hormônios ovarianos observamos que as fêmeas WT e VAcHt KD^{HET} foram igualmente prejudicadas nas tarefas de MT e MLD, e portanto, hipotetizamos que a ausência dos hormônios femininos durante um longo período promoveu efeitos deletérios sobre os sistemas de memórias semelhantes através de um mecanismo não dependente do sistema colinérgico. Entretanto, existe a possibilidade das fêmeas com hipofunção colinérgica serem mais sensíveis a privação hormonal e apresentem déficit cognitivo antes das fêmeas WT, no entanto protocolos experimentais utilizando tempos intermediários de privação hormonal, entre 7 e 90 dias, são necessários para que esta hipótese seja confirmada.

5.4.6 Modulação diferencial da MCD E MLD

Como revisado por Ranganath e Blumenfeld (Ranganath e Blumenfeld, 2005) foi demonstrado por vários autores, mas nem todos, que MCD e MLD são processos distintos, pelo menos em alguns níveis (Izquierdo et al., 1998a; Morice et al., 2008). Na tarefa de RO, a inibição hipocampal da tradução do RNAm (Myskiw et al., 2008) ou da síntese proteica (Rossato et al., 2007) imediatamente ou 180 minutos após o treino prejudicou a consolidação da MLD, sem afetar a retenção da MCD.

Como visto nos resultados cognitivos das fêmeas intactas, os animais VAcHt KD^{HOM} tiveram MLD prejudicada mas apresentaram MCD normal. Mostramos também que em camundongos WT a privação hormonal de longa duração

prejudicou a MLD, mas não a MCD. É razoável assumir que para MLD ser consolidada a ativação dos fatores de transcrição e, conseqüentemente, síntese proteica é necessária.

Considerando que como resultado das vias de sinalização reguladas pelos estrógenos estão o aumento da expressão dos receptores NMDA, aumento da transmissão glutamatérgica (Bi et al., 2001; Cyr et al., 2000) e o aumento da ativação do CREB (“*cAMP responsive-element binding protein*”) (Murphy e Segal, 2000), podemos inferir que a ausência prolongada de estrógenos, com 90 dias de OVX, causou *downregulation* nas vias ativadas por esses hormônios. Sendo algumas dessas vias indispensáveis para a consolidação da memória, a MLD deveria ser prejudicada após longos períodos de OVX. Corrobora com esta idéia o fato de que E₂ é neuroprotetor quando administrado imediatamente após a OVX, mas não quando administrado após longo período de hipoestrogenicidade (Gibbs et al., 2009; Suzuki et al., 2007).

Quanto às fêmeas VAcHT KD^{HET} é difícil argumentar sobre diferenças na MCD e MLD, uma vez que mesmo o grupo VAcHT KD^{HET} *sham* apresentou déficits de MCD quando avaliado 90 dias após a cirurgia. Entretanto, quando analisamos os resultados da privação hormonal de curta duração, nossos resultados demonstraram claramente que MCD e MLD são eventos distintos, uma vez que depois de 7 dias de OVX as fêmeas VAcHT KD^{HET} apresentaram MLD intacta, mas não MCD.

Os resultados indicam que a diferença entre MCD e MLD, vista em fêmeas WT depois de 90 dias de privação dos hormônios ovarianos, aparece mais cedo (com apenas 7 dias de privação hormonal), quando o tônus colinérgico é diminuído. Curiosamente, a TRH aguda com E₂ aumenta os marcadores colinérgicos (Gibbs et al., 1994; Kaufman et al., 1988; Luine, 1985), porém mais do que 2 semanas de exposição ao E₂ resulta em mudanças inesperadas. Em algumas regiões cerebrais os marcadores aumentam, em algumas eles diminuem e em outras eles não se alteram (Gibbs, 1997; Lapchak et al., 1990; Singh et al., 1994).

Com base nestes dados é possível especular que assim como a modulação dos estrógenos sobre os marcadores colinérgicos é dependente de regiões cerebrais específicas, a ausência destes hormônios poderia agir de forma semelhante, o que significa que 7 dias de OVX poderia induz *downregulation* na expressão de proteínas colinérgicas em regiões recrutadas para o desempenho da MCD. Considerando que as fêmeas VAcHT KD^{HET} já possuem menor liberação de ACh, os efeitos a curto prazo da OVX foram mais pronunciados nesses animais. No entanto, esta hipótese precisa ser confirmada com experimentos analisando a expressão de proteínas envolvidas na neurotransmissão colinérgica após a OVX.

Tabela 5 - Quadro comparativo do desempenho cognitivo de fêmeas WT e VACHT KD submetidas à ovariectomia.

		MT	MCD	MLD	ME
7 dias de OVX	WT	+	+	+	+
	VACHT KD ^{HET}	+		+	
90 dias de OVX	WT		+		+
	VACHT KD ^{HET}				
		TGI	G	TGI	G

T= tempo dependente; G=genótipo dependente; GI=genótipo independente, + = ausência de déficit para o tipo de memória em questão

5.5 FÊMEAS VACHT KD^{HET} OVX APRESENTAM AUMENTO NOS NÍVEIS DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Nós analisamos dois marcadores de estresse oxidativo em fêmeas WT e VACHT KD^{HET} após privação hormonal de longa duração. Não vimos qualquer efeito da OVX sobre os marcadores de estresse oxidativo em camundongos WT, apesar de alguns autores sugerirem que a OVX *per si* induz o estresse oxidativo cerebral (Prediger et al., 2004; Topçuoğlu et al., 2009).

No entanto, os estudos com medidas de marcadores de estresse oxidativo após OVX são controversos e é importante considerar os marcadores que dosaram, o tempo de privação hormonal e a idade dos animais que utilizaram. Utilizando ratos de 4 meses de idade Pregiger e colaboradores não observaram aumento dos

marcadores oxidativos no cérebro após 40 dias de OVX (Prediger et al., 2004), mas um período de 120 dias de OVX aumentou os marcadores de estresse oxidativo cerebral em ratos de 8 meses de idade (Feng e Zhang, 2005). Com o delineamento experimental utilizado não observamos aumento dos marcadores SOD e MDA nas fêmeas WT após 100 dias de privação hormonal, mas um período maior de OVX, possivelmente, induziria o aumento destes marcadores.

Por outro lado, observamos um aumento da peroxidação lipídica e da atividade SOD no hipocampo das fêmeas VChT KD^{HET} OVX. Provavelmente, o aumento da atividade da SOD é uma tentativa de diminuir os danos causados pelo aumento da peroxidação lipídica. Em pesquisa recente usando camundongos triplo-transgênicos fêmeas intactas, os pesquisadores observaram um aumento da peroxidação lipídica e da atividade da SOD, o que está de acordo com nossos resultados (Resende et al., 2008).

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um evento inicial que contribui para DA antes do aparecimento de placas β A (Gu et al., 2008; Nunomura et al., 2001; Pratico et al., 2001; Resende et al., 2008). Na patogênese da DA, o estresse oxidativo está associado com a formação de placas β A e de agregados neurofibrilares. Modificações oxidativas que ocorrem em proteínas alteram a sua solubilidade e resultam na formação de agregados protéicos. O estresse oxidativo pode induzir proteínas solúveis a adotarem uma forma insolúvel com conformação β , induzindo o acúmulo de placas β A que ocorre na DA. Além disso, a peroxidação lipídica, através de seus subprodutos, é capaz de aumentar a hiperfosforilação da

proteína tau em cultura de neurônios, e esta ação é correlacionada com a formação dos agregados neurofibrilares que ocorrem no cérebro de pacientes com DA (Nilsen, 2008).

Apesar de o estresse oxidativo ter sido observado apenas em amostras de hipocampo, uma região cerebral relacionada com a aprendizagem e memória, não é possível correlacionar os resultados bioquímicos com os resultados cognitivos. Depois de 100 dias de OVX, as fêmeas VChT KD^{HET} e WT apresentaram comprometimento cognitivo, mas o estresse oxidativo foi observado somente em fêmeas VChT KD^{HET}. Então, provavelmente, os déficits cognitivos e o estresse oxidativo observados em modelos de DA (Carroll et al., 2007; Resende et al., 2008) são processos concomitantes, mas não dependentes. O estresse oxidativo observado no hipocampo das fêmeas VChT KD^{HET} OVX pode ser um evento propulsor do acúmulo futuro de placas β A e agregados neurofibrilares, porém esta idéia é apenas especulativa já que não realizamos nenhum experimento que comprovasse esta hipótese.

A hipofunção colinérgica faz com que as fêmeas VChT KD^{HET} sejam mais vulneráveis às alterações bioquímicas cerebrais decorrentes da perda dos hormônios ovarianos e as evidências de que existe uma relação entre estresse oxidativo e a DA torna importante as ações antioxidantes dos estrógenos neste modelo animal. Apesar da privação hormonal de longa duração ter prejudicado igualmente o desempenho cognitivo de fêmeas WT e VChT KD^{HET}, o fato das

últimas apresentarem aumento dos marcadores oxidativos às tornam mais susceptíveis às alterações morfológicas observadas na DA.

Como revisado por Barron e colaboradores, as alterações nos níveis dos hormônios sexuais femininos que ocorrem na senescência ovariana podem aumentar o risco da DA, como resultado de uma proteção reduzida contra os insultos oxidativos (Barron et al., 2006). Experimentos futuros são necessários para verificar se 90 dias ou períodos maiores de privação hormonal são capazes de desencadear o surgimento de placas β A em animais VChT KD^{HET}. Mas inferimos que o nosso modelo, apesar de não ser um modelo para DA, é uma boa ferramenta para o estudo das características neuropatológicas da DA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A redução de 65% do VAcHT causou alteração no padrão de ciclagem e déficit cognitivo no modelo VAcHT KD^{HOM}, mas a redução de 45% não alterou os ciclos estrais e nem prejudicou o desempenho cognitivo das fêmeas VAcHT KD^{HET}.
- A hipofunção colinérgica faz com que as fêmeas VAcHT KD^{HET} sejam mais vulneráveis aos efeitos deletérios da privação hormonal sobre o desempenho cognitivo.
- A hipofunção colinérgica faz com que as fêmeas VAcHT KD^{HET} sejam mais susceptíveis ao desequilíbrio oxidativo decorrente da privação hormonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguado, L. I., 2002. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech.* 59, 462-73.

Aguado, L. I., Ojeda, S. R., 1984. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology.* 114, 1944-6.

Ames, B. N., et al., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 7915-22.

Assini, F. L., et al., 2009. Object Location Memory in Mice: Pharmacological Validation and Further Evidence of Hippocampal Ca1 Participation. *Behav Brain Res.*

Atkinson, R. C., Shiffrin, R. M., 1971. The control of short-term memory. *Sci Am.* 225, 82-90.

Atwood, C. S., 2005. Alzheimer's disease: the impact of age-related changes in reproductive hormones. *Cell Mol Life Sci.* 62, 255-6.

Bachevalier, J., Nemanic, S., 2008. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. *Hippocampus.* 18, 64-80.

Baddeley, A., et al., 1998. Random generation and the executive control of working memory. *Q J Exp Psychol A.* 51, 819-52.

Baddeley, A. D., Warrington, E. K., 1973. Memory coding and amnesia. *Neuropsychologia.* 11, 159-65.

Bahr, J. M., Ben-Jonathan, N., 1981. Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology.* 108, 1815-20.

Barker, G. R., et al., 2007. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci.* 27, 2948-57.

Barron, A. M., et al., 2006. Reproductive hormones modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 8, 2047-59.

Bartus, R. T., 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* 163, 495-529.

Bartus, R. T., et al., 1982. The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science.* 217, 408-417.

Baulieu, E. E., et al., 1996. Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 16, 143-54.

Baum, L. W., 2005. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60, 736-43.

Beal, M. F., 2005a. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 58, 495-505.

Beal, M. F., 2005b. Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 26, 585-6.

Behl, C., Manthey, D., 2000. Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol.* 29, 351-8.

Behl, C., et al., 1995. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 216, 473-82.

Beninger, R. J., et al., 1989. Animal Studies of Brain Acetylcholine and Memory. *Archives of Gerontology and Geriatrics.* 71-89.

Bevins, R. A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc.* 1, 1306-11.

Bi, R., et al., 2001. Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13391-5.

Bimonte, H. A., Denenberg, V. H., 1999. Estradiol facilitates performance as working memory load increases. *Psychoneuroendocrinology.* 24, 161-73.

Bimonte, H. A., et al., 2003. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol Aging.* 24, 37-48.

Birge, S. J., 1997. The role of ovarian hormones in cognition and dementia. *Neurology.* 48, S1-S1.

Blusztajn, J. K., Berse, B., 2000. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 15, 45-64.

Blusztajn, J. K., Wurtman, R. J., 1983. Choline and cholinergic neurons. *Science.* 221, 614-20.

Brinton, R. D., et al., 2008. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 29, 313-39.

Brown, D. A., 2006. Acetylcholine. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S120-6.

Buckwalter, J. G., et al., 1993. Gender Differences on A Brief Measure of Cognitive-Functioning in Alzheimers-Disease. *Archives of Neurology.* 50, 757-760.

Cammarota, M., et al., 2000. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res.* 76, 36-46.

Carroll, J. C., et al., 2007. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J Neurosci.* 27, 13357-65.

Castegna, A., et al., 2002. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem.* 82, 1524-32.

Clayton, N. S., Dickinson, A., 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature.* 395, 272-4.

Clayton, N. S., et al., 2007. Episodic memory. *Curr Biol.* 17, R189-91.

Cooper, R. L., J. M. Goldman, J. G. Vandenberg, 1993. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Methods in toxicology.* 3B, 45-56.

Coyle, J. T., et al., 1983. Alzheimers-Disease - A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation. *Science.* 219, 1184-1190.

Craig, M. C., et al., 2009. The interactive effect of the cholinergic system and acute ovarian suppression on the brain: an fMRI study. *Horm Behav.* 55, 41-9.

Cyr, M., et al., 2000. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol.* 12, 445-52.

Danion, J. M., et al., 2001. Intact implicit learning in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 158, 944-8.

de Castro, B. M., et al., 2009. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav.*

Dere, E., et al., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 31, 673-704.

Desmond, N. L., Levy, W. B., 1997. Ovarian steroidal control of connectivity in the female hippocampus: An overview of recent experimental findings and speculations on its functional consequences. *Hippocampus*. 7, 239-245.

Dewachter, I., et al., 2000. Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci*. 20, 6452-8.

Dix, S. L., Aggleton, J. P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res*. 99, 191-200.

Dominguez, R., et al., 2004. Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*. 24, 982-90.

Dubrovsy, B. O., 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 169-92.

Eacott, M. J., Norman, G., 2004. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci*. 24, 1948-53.

Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31, 47-59.

Ennaceur, A., et al., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*. 113, 509-19.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 186, 407-21.

Evans, P. H., et al., 1989. Alzheimer's disease: a pathogenic role for aluminosilicate-induced phagocytic free radicals. *Free Radic Res Commun.* 6, 317-21.

Fader, A. J., et al., 1998. Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnestic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiology of Learning and Memory.* 69, 225-240.

Fader, A. J., et al., 1999. Estrogen improves working but not reference memory and prevents amnestic effects of scopolamine of a radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 62, 711-7.

Felicio, L. S., et al., 1984. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol Reprod.* 31, 446-53.

Feng, Z., Zhang, J. T., 2005. Long-term melatonin or 17beta-estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free Radic Biol Med.* 39, 195-204.

Foy, M. R., 2001. 17beta-estradiol: effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* 76, 239-52.

Frick, K. M., et al., 2000. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience.* 95, 293-307.

Fritz, S., et al., 1999. Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 1744-50.

Fritz, S., et al., 2001. Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 349-54.

Frye, C. A., 1995. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol Behav.* 57, 5-14.

Frye, C. A., Walf, A. A., 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav.* 41, 306-15.

Frye, C. A., Walf, A. A., 2008a. Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks. *Neurosci Lett.* 437, 116-20.

Frye, C. A., Walf, A. A., 2008b. Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. *Neurobiol Learn Mem.* 90, 171-7.

Gabor, R., et al., 2003. Estrogen enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the rat hippocampus. *Brain Res.* 962, 244-7.

Gao, S., et al., 1998. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 55, 809-15.

Gerendai, I., et al., 2005. Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine.* 28, 309-18.

Gerendai, I., et al., 1995. Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53, 299-305.

Gerendai, I., et al., 1998. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology.* 68, 244-56.

Gerendai, I., et al., 2000. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Syst.* 80, 40-5.

Gibbs, R. B., 1997. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons vary as a function of dose and duration of treatment. *Brain Res.* 757, 10-6.

Gibbs, R. B., 1999. Estrogen replacement enhances acquisition of a spatial memory task and reduces deficits associated with hippocampal muscarinic receptor inhibition. *Horm Behav.* 36, 222-33.

Gibbs, R. B., 2000a. Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience.* 101, 931-8.

Gibbs, R. B., 2000b. Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiol Aging.* 21, 107-16.

Gibbs, R. B., 2002. Basal forebrain cholinergic neurons are necessary for estrogen to enhance acquisition of a delayed matching-to-position T-maze task. *Horm Behav.* 42, 245-57.

Gibbs, R. B., 2007. Estradiol enhances DMP acquisition via a mechanism not mediated by turning strategy but which requires intact basal forebrain cholinergic projections. *Horm Behav.* 52, 352-9.

Gibbs, R. B., et al., 1997. Effects of estrogen on potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus and overlying cortex of adult rats. *Brain Res.* 749, 143-6.

Gibbs, R. B., Johnson, D. A., 2007. Cholinergic lesions produce task-selective effects on delayed matching to position and configural association learning related to response pattern and strategy. *Neurobiol Learn Mem.* 88, 19-32.

Gibbs, R. B., et al., 2009. Donepezil treatment restores the ability of estradiol to enhance cognitive performance in aged rats: Evidence for the cholinergic basis of the critical period hypothesis. *Horm Behav.*

Gibbs, R. B., Pfaff, D. W., 1992. Effects of estrogen and fimbria/fornix transection on p75NGFR and ChAT expression in the medial septum and diagonal band of Broca. *Exp Neurol.* 116, 23-39.

Gibbs, R. B., et al., 1994. Effects of estrogen replacement on the relative levels of choline acetyltransferase, trkA, and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. *Exp Neurol.* 129, 70-80.

Gill, S. K., et al., 2003. Identification of a novel nuclear localization signal common to 69- and 82-kDa human choline acetyltransferase. *J Biol Chem.* 278, 20217-24.

Gilman, A. G., et al., 2001. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, Rio de Janeiro.

Gioia, L., 1996. Control of ovarian innervation. *Zygote.* 4, 295-8.

Goldman-Rakic, P. S., 1996. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 13473-80.

Gresack, J. E., Frick, K. M., 2006. Effects of continuous and intermittent estrogen treatments on memory in aging female mice. *Brain Res.* 1115, 135-47.

Griffiths, D., et al., 1999. Episodic memory: what can animals remember about their past? *Trends Cogn Sci.* 3, 74-80.

Grootendorst, J., et al., 2004. Increased corticosterone secretion and early-onset of cognitive decline in female apolipoprotein E-knockout mice. *Behav Brain Res.* 148, 167-77.

Gu, F., et al., 2008. Enhanced oxidative stress is an early event during development of Alzheimer-like pathologies in presenilin conditional knock-out mice. *Neurosci Lett.* 440, 44-8.

Hannesson, D. K., et al., 2004. Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *J Neurosci.* 24, 4596-604.

Harburger, L. L., et al., 2008. Post-training progesterone dose-dependently enhances object, but not spatial, memory consolidation. *Behav Brain Res.* 194, 174-80.

Harburger, L. L., et al., 2009. Dose-dependent effects of post-training estradiol plus progesterone treatment on object memory consolidation and hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation in young ovariectomized mice. *Neuroscience.* 160, 6-12.

Hartree, E. F., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 48, 422-7.

Heikkinen, T., et al., 2002. Effects of ovariectomy and estrogen treatment on learning and hippocampal neurotransmitters in mice. *Horm Behav.* 41, 22-32.

Henderson, V. W., 1997. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology.* 48, S27-35.

Henderson, V. W., et al., 2000. Estrogen for Alzheimer's disease in women - Randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology.* 54, 295-301.

Hogervorst, E., et al., 2002. Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* CD003122.

Ikarashi, Y., et al., 2004. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. *Neurobiol Aging.* 25, 483-90.

Izquierdo, I., 2002. *Memória.* Artmed, Porto Alegre.

Izquierdo, I., et al., 1998a. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 393, 635-6.

Izquierdo, I., et al., 1998b. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol.* 9, 421-7.

Izquierdo, I., McGaugh, J. L., 2000. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol.* 11, 517-34.

Izquierdo, I., Medina, J. H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.

Izquierdo, I., et al., 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 103, 1-11.

Jaffe, A. B., et al., 1994. Estrogen Regulates Metabolism of Alzheimer Amyloid-Beta Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry.* 269, 13065-13068.

Kar, S., et al., 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.* 29, 427-41.

Kaufman, H., et al., 1988. Effects of estradiol and dexamethasone on choline acetyltransferase activity in various rat brain regions. *Brain Res.* 453, 389-92.

Kim, M. H., et al., 2003. Specificity of the rat vesicular acetylcholine transporter. *Neurochem Res.* 28, 473-6.

Kimura, H., et al., 1980. Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science.* 208, 1057-9.

Kornya, L., et al., 2001. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest.* 52, 104-7.

Krsmanovic, L. Z., et al., 1998. Muscarinic regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 139, 4037-43.

Kunz, L., et al., 2006. Voltage-dependent K⁺ channel acts as sex steroid sensor in endocrine cells of the human ovary. *J Cell Physiol*. 206, 167-74.

Kunz, L., et al., 2007. Ovarian acetylcholine and ovarian KCNQ channels: insights into cellular regulatory systems of steroidogenic granulosa cells. *Life Sci*. 80, 2195-8.

Kunz, L., et al., 2002. Ca²⁺-activated, large conductance K⁺ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 87, 5566-74.

Lapchak, P. A., et al., 1990. Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotinic autoreceptor function. *Brain Res*. 525, 249-55.

Li, R., et al., 2004. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 3632-7.

Li, R., Shen, Y., 2005. Estrogen and brain: Synthesis, function and diseases. *Frontiers in Bioscience*. 10, 257-267.

Liang, W. S., et al., 2008. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 4441-6.

Lovell, M. A., Markesbery, W. R., 2007. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 85, 3036-40.

Luck, M. R., 1990. Cholinergic stimulation, through muscarinic receptors, of oxytocin and progesterone secretion from bovine granulosa cells undergoing spontaneous luteinization in serum-free culture. *Endocrinology*. 126, 1256-63.

Luine, V. N., 1985. Estradiol Increases Choline-Acetyltransferase Activity in Specific Basal Forebrain Nuclei and Projection Areas of Female Rats. *Experimental Neurology*. 89, 484-490.

Luine, V. N., et al., 1998. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav*. 34, 149-62.

Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 47, 469-74.

Markowska, A. L., 1999. Sex dimorphisms in the rate of age-related decline in spatial memory: relevance to alterations in the estrous cycle. *J Neurosci*. 19, 8122-33.

Markowska, A. L., Grinnell, D., 1999. Hormonal interaction with cognition during aging. *Soc Neurosci Abstr*. 25, 1062.

Markowska, A. L., Savonenko, A. V., 2002. Effectiveness of estrogen replacement in restoration of cognitive function after long-term estrogen withdrawal in aging rats. *J Neurosci*. 22, 10985-95.

Marriott, L. K., Korol, D. L., 2003. Short-term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal acetylcholine release during place learning. *Neurobiol Learn Mem*. 80, 315-22.

Mayerhofer, A., et al., 2003. The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci*. 72, 2039-45.

Mayerhofer, A., Fritz, S., 2002. Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech.* 59, 503-8.

Mayerhofer, A., Kunz, L., 2005. A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat.* 187, 521-8.

Mayerhofer, A., et al., 2006. FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 4, 37.

McEwen, B. S., Alves, S. E., 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 20, 279-307.

McEwen, B. S., et al., 1997. Ovarian steroids and the brain: Implications for cognition and aging. *Neurology.* 48, S8-S15.

McGaugh, J. L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science.* 287, 248-51.

McMillan, P. J., et al., 1996. The effects of ovariectomy and estrogen replacement on *trkA* and choline acetyltransferase mRNA expression in the basal forebrain of the adult female Sprague-Dawley rat. *Journal of Neuroscience.* 16, 1860-1865.

Mesulam, M. M., 2004. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 145, 67-78.

Mesulam, M. M., et al., 1983a. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 214, 170-97.

Mesulam, M. M., et al., 1983b. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience.* 10, 1185-201.

Miller, M. M., et al., 1999. Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience*. 91, 1143-1153.

Mitchell, J. B., Laiacona, J., 1998. The medial frontal cortex and temporal memory: tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behav Brain Res*. 97, 107-13.

Morales-Ledesma, L., et al., 2004. Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Arch Med Res*. 35, 279-83.

Moreira, P. I., et al., 2007. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci*. 257, 206-14.

Morice, E., et al., 2008. Preservation of long-term memory and synaptic plasticity despite short-term impairments in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Learn Mem*. 15, 492-500.

Morrison, J. H., et al., 2006. Estrogen, menopause, and the aging brain: How basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *Journal of Neuroscience*. 26, 10332-10348.

Mufson, E. J., et al., 1999. Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Res*. 849, 253-74.

Murai, T., et al., 2007. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav*. 90, 116-24.

Murphy, D. D., Segal, M., 2000. Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology*. 72, 133-43.

Myskiw, J. C., et al., 2008. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 89, 338-51.

Nelson, J. F., et al., 1982. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod.* 27, 327-39.

Nilsen, J., 2008. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol.* 29, 463-75.

Nilsen, J., Brinton, R. D., 2004. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3, 297-313.

Nordberg, A., et al., 1992. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J Neurosci Res.* 31, 103-11.

Nunomura, A., et al., 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60, 759-67.

O'Malley, C. A., et al., 1987. Effects of ovariectomy and estradiol benzoate on high affinity choline uptake, ACh synthesis, and release from rat cerebral cortical synaptosomes. *Brain Res.* 403, 389-92.

Oda, Y., 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 49, 921-37.

Ohkawa, H., et al., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-8.

Packard, M. G., et al., 1994. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8477-81.

Paganinihill, A., Henderson, V. W., 1994. Estrogen Deficiency and Risk of Alzheimers-Disease in Women. *American Journal of Epidemiology.* 140, 256-261.

Perry, E. K., et al., 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J.* 2, 1457-9.

Ping, S. E., et al., 2008. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning. *J Neurosci Res.* 86, 1588-98.

Prado, M. A., et al., 2002. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int.* 41, 291-9.

Prado, V. F., et al., 2006. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron.* 51, 601-12.

Pratico, D., et al., 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.* 21, 4183-7.

Prediger, M. E., et al., 2004. Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. *Neurochem Res.* 29, 1923-30.

Purves, D., et al., 2004. *Neuroscience.* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Pych, J. C., et al., 2005. Acetylcholine release in hippocampus and striatum during testing on a rewarded spontaneous alternation task. *Neurobiol Learn Mem.* 84, 93-101.

Pych, J. C., et al., 2006. Effects of injections of glucose into the dorsal striatum on learning of place and response mazes. *Behav Brain Res.* 167, 373-8.

Ranganath, C., Blumenfeld, R. S., 2005. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. *Trends Cogn Sci.* 9, 374-80.

Ranganath, C., et al., 2005. Working memory maintenance contributes to long-term memory formation: neural and behavioral evidence. *J Cogn Neurosci.* 17, 994-1010.

Ranganath, C., D'Esposito, M., 2001. Medial temporal lobe activity associated with active maintenance of novel information. *Neuron*. 31, 865-73.

Razmara, A., et al., 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res*. 1176, 71-81.

Reddy, D. S., 2003. Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol*. 15, 197-234.

Redrobe, J. P., et al., 2009. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates scopolamine-induced behavioural changes in a modified continuous Y-maze task in mice. *Eur J Pharmacol*. 602, 58-65.

Resende, R., et al., 2008. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 44, 2051-7.

Ribeiro, F. M., et al., 2006. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem*. 97, 1-12.

Rogers, J. L., Kesner, R. P., 2003. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiol Learn Mem*. 80, 332-42.

Roghani, A., et al., 1996. Differential distribution of the putative vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 43, 65-76.

Rossato, J. I., et al., 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem*. 14, 36-46.

Ruff, R. L., 2003. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci*. 998, 1-10.

Sarter, M., Bruno, J. P., 1997. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 23, 28-46.

Schafer, M. K., et al., 1998a. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience*. 84, 331-59.

Schafer, M. K., et al., 1998b. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience*. 84, 361-76.

Shallice, T., Warrington, E. K., 1970. Independent functioning of verbal memory stores: a neuropsychological study. *Q J Exp Psychol*. 22, 261-73.

Sherwin, B. B., 1999. Can estrogen keep you smart? Evidence from clinical studies. *J Psychiatry Neurosci*. 24, 315-21.

Shigenaga, M. K., et al., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 10771-8.

Shughrue, P. J., et al., 2000. Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER alpha and ER beta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*. 96, 41-49.

Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 215, 213-9.

Simpson, E., et al., 1999. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer*. 6, 131-7.

Singh, M., et al., 1994. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res*. 644, 305-12.

Smith, Y. R., et al., 2001. Effects of long-term hormone therapy on cholinergic synaptic concentrations in healthy postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 86, 679-84.

Steckler, T., et al., 1998. Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. *Prog Neurobiol.* 54, 313-32.

Suddendorf, T., Corballis, M. C., 1997. Mental time travel and the evolution of the human mind. *Genet Soc Gen Psychol Monogr.* 123, 133-67.

Sudhof, T. C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 27, 509-47.

Sutcliffe, J. S., et al., 2007. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res.* 177, 117-25.

Suzuki, S., et al., 2007. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 6013-8.

Tanabe, F., et al., 2004. Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spatial memory. *J Med Dent Sci.* 51, 89-98.

Tomaszewicz, M., et al., 2003. Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *J Neurochem.* 87, 318-24.

Topçuoğlu, A., et al., 2009. Effects of estrogens on oxidative protein damage in plasma and tissues in ovariectomised rats. *Clin Invest Med.* 32, E133-43.

Toranallerand, C. D., et al., 1992. Estrogen-Receptors Colocalize with Low-Affinity Nerve Growth-Factor Receptors in Cholinergic Neurons of the Basal Forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 89, 4668-4672.

Towart, L. A., et al., 2003. Subcellular relationships between cholinergic terminals and estrogen receptor-alpha in the dorsal hippocampus. *J Comp Neurol.* 463, 390-401.

Traut, M. H., et al., 2009. Identification and characterization of Ca²⁺-activated K⁺ channels in granulosa cells of the human ovary. *Reprod Biol Endocrinol.* 7, 28.

Tulving, E., Markowitsch, H. J., 1998. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus.* 8, 198-204.

Turi, G. F., et al., 2008. Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem Int.* 52, 723-8.

VanderHorst, V. G., Ulfhake, B., 2006. The organization of the brainstem and spinal cord of the mouse: relationships between monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Chem Neuroanat.* 31, 2-36.

Vassar, R., et al., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286, 735-41.

Vaucher, E., et al., 2001. Ovariectomy up-regulates neuronal neurofilament light chain mRNA expression with regional and temporal specificity. *Neuroscience.* 103, 629-37.

Walf, A. A., et al., 2009. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav Brain Res.* 196, 254-60.

Walf, A. A., et al., 2006. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiol Learn Mem.* 86, 35-46.

Wallace, M., et al., 2006. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res.* 1126, 176-82.

Whitehouse, P. J., et al., 1982. Alzheimers-Disease and Senile Dementia - Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science*. 215, 1237-1239.

Woolley, C. S., McEwen, B. S., 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 12, 2549-54.

Yager, J. D., Chen, J. Q., 2007. Mitochondrial estrogen receptors--new insights into specific functions. *Trends Endocrinol Metab*. 18, 89-91.

Yagi, K., 1984. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol*. 105, 328-31.

Yamamoto, H., et al., 2007. Effects of estrogens on cholinergic neurons in the rat basal nucleus. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 107, 70-79.

Yang, S. H., et al., 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 4130-5.

Yu, B. P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 74, 139-62.

Zandi, P. P., et al., 2002. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women - The Cache County Study. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 288, 2123-2129.

Zarnani, A. H., et al., 2006. Analysis of endometrial myeloid and lymphoid dendritic cells during mouse estrous cycle. *J Reprod Immunol*. 71, 28-40.

Zeisel, S. H., 1981. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu Rev Nutr*. 1, 95-121.

Ziegler, D. R., Gallagher, M., 2005. Spatial memory in middle-aged female rats: assessment of estrogen replacement after ovariectomy. *Brain Res*. 1052, 163-73.

Zwain, I. H., Yen, S. S., 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. 140, 3843-52.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)