



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gabrielle de Paula Lopes Gonzalez

**Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia  
sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o  
desenvolvimento corporal de ratas adultas**

Rio de Janeiro

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Gabrielle de Paula Lopes Gonzalez

**Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia  
sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o  
desenvolvimento corporal de ratas adultas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção  
do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Celly Cristina Alves do Nascimento-Saba

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

G643 Gonzalez, Gabrielle de Paula Lopes  
Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o desenvolvimento corporal de ratas adultas / Gabrielle e de Paula Lopes – 2010. 91 f.

Orientadores: Celly Cristina Alves do Nascimento Saba, Alex Christian Manhães.

Dissertação (mestrado)-Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estrogênio. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Comportamento. 4. Tecido adiposo. I. Saba, Celly Cristina Alves do Nascimento. II. Manhães, Alex Christian. III

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Gabrielle de Paula Lopes Gonzalez

**Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia  
sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o  
desenvolvimento corporal de ratas adultas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção  
do título de Mestre.

Apresentada em \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Celly Cristina Alves do Nascimento Saba (orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patricia Cristina Lisboa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Regina Célia Cussa Kubrusly  
Instituto Biomédico da UFF

Rio de Janeiro

2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia (LN) e no Laboratório de Análises Morfofuncionais (LAMF) do Depto. de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) sob a orientação dos professores Celly Cristina Alves do Nascimento-Saba e Alex Christian Manhães, na vigência de auxílio concedido pela Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## **DEDICATÓRIA**

A Deus em sua bondade e infinita misericórdia me orientou nos momentos mais difíceis da minha vida, me mostrando o verdadeiro sentido da fé, me guiando pelo caminho da verdade, esperança e confiança sempre num dia melhor.

À minha família, em especial a minha mãe e a minha avó, que me educaram com carinho, amor, dedicação e incentivo sempre.

## AGRADECIMENTOS

À professora Celly Cristina Alves do Nascimento Saba - Por ter acompanhado a minha trajetória desde iniciação científica até o presente estudo e por ser uma pessoa, com a qual eu construí um sentimento de amizade, carinho e admiração profissional ao longo desses anos.

Ao professor Alex Christian Manhães por ter me aceitado como orientanda e confiado no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, obtidos em sua companhia e o admiro pelo exemplo de dedicação e acima de tudo amor à pesquisa.

À Mabel Fraga por ter me ensinado os primeiros passos da neurociência, com muito amor, paciência e sabedoria e acima de tudo, por ter me inserido de forma tão especial, que eu me apaixonei pela neurociência.

À professora Rachel Moreira Moraes dos Santos que em todos os momentos necessários esteve presente para me orientar e ajudar nas etapas a serem vencidas.

À minha psicóloga Livia Todt Seelig que me orientou a ter serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar e ter coragem para modificar o que eu posso modificar e sabedoria para saber distinguir uma da outra.

Aos amigos mestrandos e doutorandos do LAMF Silvio Sandro Cornélio, Aluana Santana, Carlos Alberto Soares, Larissa Paixão e Rejane Pontes.

Às amigas de iniciação científica do LAMF Aline Santos, Mariana Ribeiro e Iara Karisse.

Aos alunos do laboratório de Neurofisiologia: Danielle, Juliana Oliveira, Sylvio e Fabiana Rodrigues pelo apoio e amizade.

Agradecimento especial aos alunos do laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento por terem me acolhido como membro do grupo, pelo imenso carinho e receptividade: Bruninha Lotufo, Fabio Damasceno, Gabriela Skinner, Marcinha, Michael, Paulinho, Thiago, Vivi, Ive, Andre, Everton e Léo.

Ao secretário do Depto de Ciências Fisiológicas, Henrique pelas constantes orientações e pela amizade.

À secretária do FISCLINEX Amélia Gomes por sua paciência em me ajudar por todos esses anos.

Ao bioterista Carlos Roberto pelo cuidado com os animais.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia porque o mundo pertence a quem se atreve...

A vida é muito para ser insignificante.

*Charles Chaplin*

## RESUMO

GONZALEZ, Gabrielle de Paula Lopes. Efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia sobre aspectos comportamentais, lipídeos séricos e o desenvolvimento corporal de ratas adultas. 2010. 91 folhas. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

O aumento da longevidade evidenciou nas mulheres os efeitos deletérios da deficiência ovariana como, a obesidade central e as doenças neurodegenerativas. Os hábitos alimentares modernos favorecem o consumo excessivo de gorduras, que contribuem para efeitos adversos sobre a saúde, incluindo alteração da composição corporal e da função nervosa. Assim, objetivamos estudar como a dieta hiperlipídica (DH), contendo óleo de soja, associada à perda da função gonadal influenciam o comportamento e o desenvolvimento corporal de ratas adultas. Ratas Wistar adultas foram ovariectomizadas (OVX) ou pseudo-operadas (C) e após 7d passaram a receber dieta contendo 4%(normo) ou 19%(hiperlipídica) de óleo de soja: C4 (n=29), OVX4 (n=30), C19 (n=30), OVX19 (n=30). Foram avaliados a massa e o comprimento corporais e a ingestão alimentar, e aspectos comportamentais de ansiedade, através de teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE); de busca pela novidade, por testes no Campo Vazado (CV); e aprendizagem/memória avaliada no labirinto aquático radial de 8 braços (LAROB). Ao final dos testes, os animais foram anestesiados, exsanguinados e o tecido adiposo intra-abdominal foi coletado e pesado. O soro foi utilizado para dosagens de triglicerídeo (TG), VLDL-c, colesterol (COL), HDL-c e estradiol. A ingestão alimentar média e o comprimento corporal não diferiram entre os grupos, mas o grupo OVX19 mostrou ganho significativo (13,6%) de massa corporal mais precocemente que os demais. O mesmo padrão foi observado quanto à massa de tecido adiposo, que foi 86% maior no OVX19. Os TG, VLDL e COL aumentaram cerca de 28% no OVX19, porém sem alteração de HDL-c (33,76±2,2 mg/dl). A DH e a ovariectomia se mostraram ansiogênicos e quando associados, a DH parece reverter o efeito ansiogênico da castração. Padrão similar de resposta foi observado na resposta ao teste de busca por novidade. No teste de aprendizagem/memória o OVX4 apresentou maior tempo de latência no primeiro dia, e todos responderam de forma semelhante nos demais dias. Conclui-se que a deficiência de estradiol acompanhada da ingestão de dieta hiperlipídica mantém o desempenho cognitivo, o comportamento emocional e a motivação, embora prejudique a adiposidade e o metabolismo lipídico.

Palavras chaves: estrogênio, dieta hiperlipídica, comportamento, tecido adiposo.

## ABSTRACT

The increase in longevity in women showed the deleterious effects of ovarian failure such as central obesity and neurodegenerative diseases. The modern feeding habits are associated with increased consumption of fats that contribute to adverse health effects, including changes in body composition and nervous function. The aim of present study was to assess how a hyperlipidic diet (HD) containing soybean oil, coupled with the loss of the gonadal function influence behavior and body development of adult rats. Adult female rats were ovariectomized (OVX) or pseudo-op (C) and after 7d began to receive a diet containing 4% (normo) or 19% (hyperlipidic) of soybean oil: C4 (n = 29), OVX4 (n = 30), C19 (n = 30), OVX19 (n = 30). We evaluated the length and body mass and food intake, and behavioral aspects of anxiety through the test Plus Maze (EPM), the search for novelty, for testing in the field not (CV) and learning / memory evaluated in the maze Water radial eight arms (LAROB). At the end of testing, animals were anesthetized, exsanguinated and intra-abdominal adipose tissue was collected and weighed. The serum was used for total serum triglyceride (TG), VLDL-C, cholesterol (COL), HDL-C and estradiol. The average dietary intake and body length did not differ between groups, but the group showed significant gain OVX19 (13.6%) body mass earlier than the others. The same pattern was observed for adipose tissue mass, which was 86% higher in OVX19. TG, VLDL and COL increased by about 28% in OVX19, but no change in HDL-C ( $33.76 \pm 2.2$  mg / dl). The DH and ovariectomy proved anxieties and when combined, the DH appears to reverse the anxiogenic effect of castration. Similar pattern of response was observed in response to the test to search for novelty. In the test of learning/memory the OVX4 showed higher latency on the first day, and all responded similarly in the other days. It is concluded that deficiency of estradiol followed by the intake of fat diet keeps the cognitive, emotional behavior and motivation, although detrimental to adiposity and lipid metabolism.

Key words: estrogen, high fat diet, behavior, adipose tissue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b>	Relações anatômicas do Sistema Límbico	21
<b>FIGURA 2:</b>	Fases do ciclo estral	27
<b>FIGURA 3:</b>	Sinalização neuroprotetora do estrogênio na DA	30
<b>FIGURA 4:</b>	Vista superior do labirinto em cruz elevado	45
<b>FIGURA 5:</b>	Vista superior do campo vazado	46
<b>FIGURA 6:</b>	Vista superior do labirinto aquático radial de 8 braços	47
<b>GRÁFICO 1:</b>	Evolução da massa corporal entre os 90 e 155 dias	50
<b>GRÁFICO 2:</b>	Evolução do comprimento corporal entre os 90 e 155 dias	51
<b>GRÁFICO 3:</b>	Evolução da ingestão alimentar entre os 90 e 155 dias	52
<b>GRÁFICO 4:</b>	Massa de tecido adiposo intra-abdominal, aos 155 dias	53
<b>GRÁFICO 5:</b>	Concentrações séricas de colesterol aos 155 dias	54
<b>GRÁFICO 6:</b>	Concentrações séricas de HDL colesterol aos 155 dias	55
<b>GRÁFICO 7:</b>	Concentrações séricas de triglicerídeo colesterol aos 155 dias	56
<b>GRÁFICO 8:</b>	Concentrações séricas de VLDL colesterol aos 155 dias	57
<b>GRÁFICO 9:</b>	Concentrações séricas de estradiol aos 155 dias	58
<b>GRÁFICO 10:</b>	A. Tempo de permanência no braço aberto (Tempo BA) no LCE. B. Percentual de tempo de permanência no braço aberto (%Tempo BA) no LCE.	60
<b>GRÁFICO 11:</b>	A. Entradas no braço aberto (Entradas BA) no LCE. B. Percentual de entradas no braço aberto (%Entradas BA) no LCE.	61
<b>GRÁFICO 12:</b>	A. Entradas totais (Entradas BA+BF) no LCE B. Percentual de tempo no centro (%Tempo CN) no LCE	62
<b>GRÁFICO 13:</b>	A. Entradas totais (Entradas BA+BF) no LCE B. Percentual de tempo no centro (%Tempo CN) no LCE	63
<b>GRÁFICO 14:</b>	Número de orifícios explorados no CV	64
<b>GRÁFICO 15:</b>	A. Número de verticalizações B. Número de autolimpeza	65
<b>GRÁFICO 16:</b>	Latência para encontrar a plataforma submersa no LAROB	66

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Divisão do Sistema Nervoso Central	19
<b>TABELA 2</b>	Composição nutricional das rações purificadas, segundo o AIN-93M	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
A $\beta$	Peptídeo beta-amilóide
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AIN	American Institute of Nutrition
ANOVA	Análise de variância
BA	Braço aberto
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CA1	Neurônios hipocâmpais
CaMKII	Miosina-V e Ca <sup>2+</sup> /calmodulina quinase
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CV	Campo vazado
DHA	Docosaexaenóico
EPA	Ácido alfa-linoléico-eicosapentanóico
ERK	Cascatas extracelulares regulada
E 1	Estrona
E 2	17 $\beta$ estradiol
E 3	Estriol
FSH	Hormônio folículo estimulante
HD	<i>Head dipping</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol trifosfato
LA	Ácido Linoleico
LAROB	Labirinto aquático de 8 braços
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LNA	Ácido Linolênico
LTP	Potenciação de longa duração
PKA	Proteína Cinase A
PKC	Proteína Cinase C
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO	Óxido Nítrico
NR	Subunidade dos receptores de NMDA
OVX	Ovariectomizada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
ER $\alpha$	Receptor estrogênio alfa
ER $\beta$	Receptor estrogênio beta
SE	Sistema Endócrino
SL	Sistema Límbico
SN	Sistema Nervoso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso central
SNP	Sistema Nervoso parassimpático
SNS	Sistema Nervoso simpático
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>1.1 Sistema Nervoso</b>	19
1.1.1 <u>Sistema límbico</u>	20
1.1.2 <u>Aprendizado e memória</u>	21
1.1.3 <u>Motivação</u>	23
1.1.4 <u>Ansiedade</u>	24
<b>1.2 Ovários Aspectos Gerais</b>	25
1.2.1 <u>Ciclo menstrual e ciclo estral</u>	26
1.2.2 <u>Estrogênio e sistema nervoso</u>	28
1.2.3 <u>Estrogênio e função cognitiva</u>	30
1.2.4 <u>Estrogênio e comportamento</u>	31
1.2.5 <u>Estrogênio e controle da ingestão alimentar</u>	31
<b>1.3 Ácidos Graxos</b>	33
1.3.1 <u>Ácidos graxos e sistema nervoso central</u>	34
1.3.2 <u>Óleo de soja e atividade estrogênica</u>	35
<b>1.4 Modelos experimentais de estudo do comportamento animal, nutrição e de menopausa</b>	36
1.4.1 <u>Comportamento associado à ansiedade</u>	36
1.4.2 <u>Comportamento associado à busca pela novidade</u>	37
1.4.3 <u>Modelo de memória e aprendizagem</u>	37
1.4.4 <u>Modelo de menopausa</u>	38
1.4.5 <u>Modelo de nutrição</u>	38
<b>1.5 JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>2. OBJETIVOS</b>	40
<b>3. MATERIAIS e MÉTODOS</b>	41
3.1 <u>Animais</u>	41
3.1.1 <u>Observação dos ciclos estrais</u>	41
3.2 <u>Delineamento Experimental</u>	41
3.3 <u>Ração Purificada</u>	42
3.4 <b>Testes comportamentais</b>	43
3.4.1 <u>Labirinto em Cruz elevada</u>	44
3.4.2 <u>Campo Vazado</u>	45

3.4.3 <u>Labirinto aquático radial de oito braços</u>	46
3.5 <u>Análises séricas</u>	47
3.6 <u>Análise estatística</u>	47
3.6.1 <u>Composição corporal, ingestão alimentar e análises séricas</u>	48
3.6.2 <u>Labirinto em cruz elevada</u>	48
3.6.3 <u>Campo vazado</u>	48
3.6.4 <u>Labirinto aquático radial de oito braços</u>	49
<b>4. RESULTADOS</b>	50
4.1 <u>Avaliação da composição corporal e da ingestão alimentar</u>	50
4.1.1 <u>Evolução da massa corporal</u>	50
4.1.2 <u>Comprimento corporal</u>	51
4.1.3 <u>Consumo Alimentar.</u>	52
4.1.4 <u>Massa de tecido adiposo</u>	53
4.2 <u>Avaliações séricas</u>	54
4.2.1 <u>Colesterol</u>	54
4.2.2 <u>HDL-colesterol</u>	55
4.2.3 <u>Triglicerídeos</u>	56
4.2.4 <u>VLDL-colesterol</u>	57
4.2.5 <u>Estradiol</u>	58
4.3 <u>Avaliações comportamentais</u>	59
4.3.1 <u>Labirinto em cruz elevada</u>	59
4.3.2 <u>Campo vazado</u>	64
4.3.3 <u>Labirinto aquático radial de oito braços</u>	66
<b>5. DISCUSSÃO</b>	68
<b>6. CONCLUSÃO</b>	73
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	74
<b>8. ANEXO</b>	91

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o Brasil passou por uma transição demográfica caracterizada pelo aumento da expectativa de vida, que atualmente atinge 72,3 anos. A pirâmide populacional brasileira apresenta um perfil aproximado do padrão vigente nos países desenvolvidos, com a participação crescente de pessoas com mais de 50 anos nos patamares medianos e superiores de sua estrutura. Algumas das melhorias que contribuíram para o aumento da longevidade foram o acesso aos serviços de saúde, o aumento da escolaridade e a prevenção de doenças. Para as mulheres a expectativa de vida é maior do que a dos homens, cerca de 76 anos, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006). Dessa forma, as mulheres passaram a viver mais tempo com os efeitos deletérios da menopausa que incluem além do ganho de massa corporal alterações degenerativas do sistema nervoso (RAPP e cols, 2003).

A mudança dos padrões alimentares e do estilo de vida da sociedade moderna vem contribuindo para um consumo alimentar inadequado e excessivo e para o sedentarismo. Em conjunto, esses fatores aumentam a prevalência de sobrepeso e obesidade e suas conseqüentes comorbidades como hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemias, componentes da Síndrome Metabólica (FREITAS e cols, 2005; SCHMITT e cols, 2008).

A inadequação nutricional da mulher na pós-menopausa, com a ingestão excessiva de alimentos de alta densidade energética, favorece ainda mais o desenvolvimento da obesidade e é um fator de risco para inúmeras doenças (NAGATA e cols, 2005; GELLER & STUDEE, cols, 2006). Em relação aos lipídeos, estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de ácidos graxos poliinsaturados tem um papel benéfico à cognição, ao passo que uma ingestão rica em ácidos graxos saturados e colesterol podem contribuir para o declínio cognitivo (KALMIJN e cols, 2004).

## 1.1 O Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso (SN) recebe, analisa e integra informações além de controlar a vida de relação com o ambiente. O componente central apresenta uma divisão baseada em critérios anatômicos (Tabela 1), cujas regiões desempenham funções específicas (KANDEL, 2000; JESSEL, 2000; WILLIS JR, 2004; LENT, 2005).

O Sistema Nervoso junto com o Sistema Endócrino (SE) desempenham a maioria das funções do controle do corpo. Esse controle é exercido através da contração dos músculos esqueléticos, da contração dos músculos lisos dos órgãos internos e da secreção de glândulas exócrinas e endócrinas. O SE regula principalmente as funções metabólicas corporais, enquanto o SN é responsável pela percepção sensorial, processamento de informações e comportamento (WILLIS JR, 2004). As interações entre os diversos sistemas e sua regulação são realizadas pelos moduladores do SN, os neurotransmissores e do SE, os hormônios (SILVA & SILVA de SÁ, 2006). O Sistema Límbico exerce um controle poderoso sobre o SE regulando a liberação de hormônios do hipotálamo (JESSEL, 2000).

Tabela 1: Divisão do Sistema Nervoso Central

Sistema Nervoso Central= Encéfalo + Medula								
ENCÉFALO								
CÉREBRO				CEREBELO		TRONCO ENCEFÁLICO		
TELENCÉFALO		DIENCÉFALO		CORTEX CEREBELAR	NÚCLEOS PROFUNDOS	MESENCÉFALO	PONTE	BULBO
CÓRTEX CEREBRAL	NÚCLEOS DA BASE	TÁLAMO	HIPOTÁLAMO					
funções cognitivas	desempenho motor	processamento de informações	regulação funções autonômicas, endócrinas e viscerais	modula a força e alcance do movimento	habilidades motoras	funções sensoriais e motoras reflexos visuais e auditivos	transmissão de informação Cérebro-cerebelo	funções autonômicas vitais
MEDULA								
CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR		SACRA		
processamento de informações sensoriais, controla movimentos dos membros e do tronco								

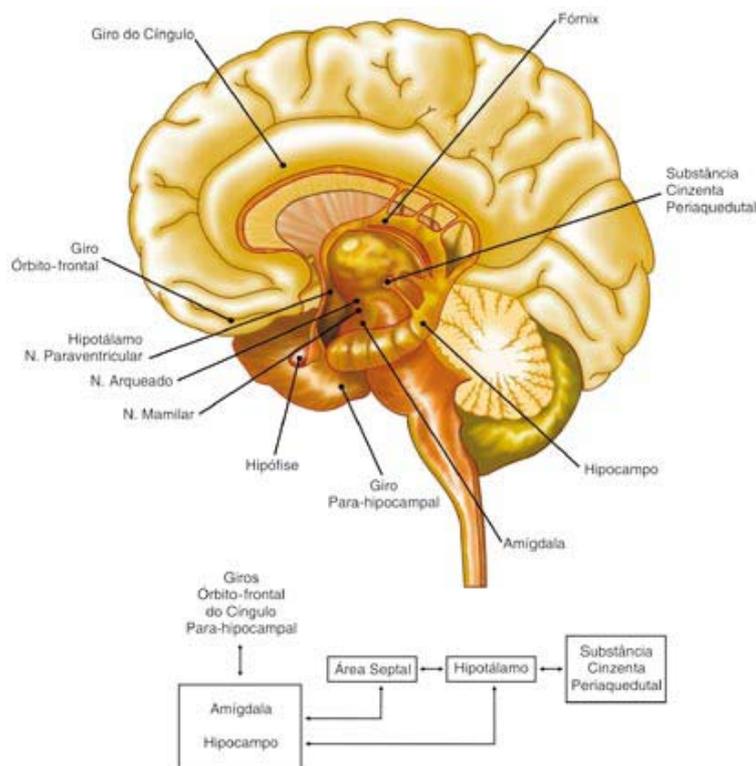
Adaptado de Lent, 2005

### 1.1.1 O sistema límbico

O controle do comportamento de aprendizado e emocional é uma das funções do sistema nervoso, desempenhado pelo sistema límbico (SL, Figura 2). Esse sistema surgiu nas aves e se encontra bem desenvolvido em todos os mamíferos. É um circuito neural, cuja complexa interação teve sua denominação sugerida por MacLean, em 1952, baseado nas hipóteses de Papez e no trabalho de Kluver e Bucy. Esse sistema regula o comportamento emocional e direciona a motivação, sendo, portanto, essencial para a regulação de nossas emoções mais complexas e de nossos estados afetivos e motivacionais mais finos (CANTERAS, 2008; RUBINSON & LANG, 2009).

O SL se constitui de uma ampla região do córtex cerebral composta pelos giros orbitofrontal, cingulado e para hipocampal, associada aos sítios subcorticais – a amígdala, o septo e o hipotálamo, envolvidos na elaboração da experiência e da expressão emocional. O SL interage essencialmente com todos os sistemas funcionais do cérebro, sendo difícil definir com exatidão seus limites. A morfologia atual do SL foi proposta por Nauta, em 1958, nela o hipotálamo ocupa uma posição central, fornecendo um elo entre as estruturas límbicas telencefálicas (os giros orbitofrontal, cingulado e para hipocampal, hipocampo, amígdala, área septal) e os sítios límbicos mesencefálicos (substância cinzenta periaquedutal). Além do controle emocional essas áreas controlam condições internas do corpo, como a temperatura corporal, a osmolaridade dos fluidos corporais, o direcionamento para a ingestão de água e alimentos e o controle da massa corporal. São funções vegetativas do cérebro e seu controle está relacionado ao comportamento (CANTERAS, 2008).

O SL tem um papel importante no aprendizado, o qual está relacionado ao hipocampo. Avaliando o significado emocional e afetivo de cada informação que é apresentada, ele ajuda a selecionar aquelas que deverão ser armazenadas na memória e desprezar aquelas “irrelevantes” no momento (SCHMIDEK & CANTOS, 2008).



**Figura 1:** Relações anatômicas do Sistema Límbico. Canteras, 2009.

### 1.1.2 Aprendizado e memória

Aprendizado e memória são mecanismos complexos através dos quais o cérebro processa e guarda as informações recebidas, possibilitando ao organismo adquirir comportamentos específicos, em resposta a desafios impostos pelo ambiente. O processo de aprendizagem inclui o modo como os seres humanos e os animais adquirem novos conhecimentos sobre o mundo, desenvolvem competências e mudam seus comportamentos. O termo memória é utilizado para designar a capacidade de codificação, armazenamento e retenção de informação (KANDEL, 2000; O'REILLY & RUDY, 2000; RUBINSON & LANG, 2009; CORTEZ & SILVA, 2008).

Do ponto de vista fisiológico, o aprendizado e a memória são interdependentes, estando ligados ao processo de desenvolvimento de prolongamentos neuronais e ao estabelecimento de circuitos lógicos de memória. Múltiplos sistemas de memória estão espalhados por diferentes áreas do cérebro, com conexões e vias que podem interconectá-las, formando circuitos ainda maiores (CORTEZ & SILVA, 2008).

A aprendizagem leva a mudanças de conduta, seja por condicionamento operante, experiência ou ambos, através de técnicas de ensino ou pela simples aquisição de hábitos. A aprendizagem humana envolve a vontade de aprender, característica essencial do psiquismo

humano, e é um processo dinâmico e criativo, ou seja, sempre em mutação e em busca de novos métodos de aprendizagem. Assim, difere do adestramento dos demais animais, que é puramente condicionante. Nos últimos tempos, tem sido demonstrada a capacidade de crescimento do cérebro, não no sentido do aumento do número de neurônios, mas sim no acréscimo de conexões neuronais, como mecanismos de memória. Estudos em ratos, expostos à ambiente rico em estímulos apresentaram córtex cerebral mais espesso do que aqueles criados isolados ou em ambiente pobre em estímulos, em virtude de novas ramificações nos neurônios pré-existentes em resposta às experiências e à aprendizagem. Percebe-se que o aumento da atividade mental é acompanhado por muitas mudanças no metabolismo cerebral, aumento do fluxo e da temperatura corporal (CORTEZ & SILVA, 2008).

A memória pode ser classificada como explícita e implícita. Entende-se por explícita, aquela relacionada a eventos autobiográficos e conhecimento de fatos, enquanto a implícita não exige recordação deliberada, depende de diversas vias perceptivas e reflexivas. Ela se acumula lentamente no curso de repetições sendo expressa por melhora no desempenho (KANDEL, 2000).

Com relação à consolidação da memória, esta pode ser dividida em memória de curto prazo e de longo prazo. A entrada da informação no cérebro é processada por um depósito de memória de curto prazo (short term memory), que tem uma capacidade muito pequena de armazenamento, de modo que se não ocorrer um ensaio, ou uma repetição, a mesma será esquecida. À medida que a memória vai sendo consolidada, passa a ser denominada de longa duração (KANDEL, 2000). Estudos experimentais relacionados à consolidação de memória revelam alterações moleculares no hipocampo e na área do neocórtex, envolvendo síntese protéica e expressão gênica. Para o melhor entendimento desse mecanismo molecular e celular foram utilizados em modelos experimentais “long term potentiation“ (LTP), que parece ser induzido através da ativação do receptor NMDA, pois o mesmo funciona como um detentor de armazenamento de memória (WANG, HU & TSIEN, 2006). Estes processos são iniciados pela ativação da sinalização de cascatas como, da proteína cinase A (PKA), da proteína cinase C (PKC), da cálcio/calmodulina cinase (CaMKII) e da cascata extracelular das cinases reguladoras de cascatas (ERK) (DASH, HEBERT & RUNYAN, 2004). A entrada de cálcio ocorre por intermédio dos receptores de NMDA que promovem uma interação entre a cálcio/calmodulina com a CaMKII, o que promove o deslocamento da mesma para a área da zona pós-sináptica (PSD) pela ligação do carbono terminal do receptor de NMDA em subunidades de NR2S (BAYER e cols, 2001). Os receptores de NMDA são conhecidos por serem compostos por NR1 e outras subunidades de NR (NR2A, NR2B, NR2C) Esta

manutenção em longo prazo ocorre mediante síntese de proteína e do aparecimento da CREB (cAMP elemento ligante de proteína) mediante a ativação da expressão gênica (KANDEL, 2000; RUBINSON & LANG, 2009 e cols, 2004).

Para o estabelecimento da memória de longo prazo, quatro estágios de consolidação são descritos: aprendizagem, consolidação da aprendizagem, armazenamento e possibilidade de recuperação, cujos mecanismos vêm sendo estudados. Desses estudos, três modelos foram elucidados: o primeiro estabeleceu que a memória é primeiramente estabelecida no hipocampo e posteriormente armazenada no neocortex; o segundo propõe que eventos repetidos proporcionam um armazenamento mais rápido na região hipotalâmica, portanto estocadas no neocortex mais rapidamente; e o terceiro modelo, chamado de Teoria Múltipla do Vestígio propõe que a região hipocampal rapidamente armazena a informação (DASH, HEBERT & RUNYAN, 2004).

### 1.1.3 Motivação

O comportamento, além dos aspectos cognitivos também reflete as necessidades e desejos de um indivíduo. A motivação está relacionada às necessidades internas mais que ao processamento das informações sensoriais. Os estados de motivação, como os processos cognitivos são estados internos inferidos que são postulados para explicar a intensidade e a direção de uma variedade de comportamento. Acredita-se que o estado motivacional de um organismo seja controlado por processos reguladores hemostáticos básicos essenciais para a sobrevivência, como alimentação, respiração e auto-proteção, assim, variando em função da privação. Os estados de motivação têm efeitos gerais: aumentam o nível de vigília e, portanto, diminuem o limiar comportamental e acentuam a capacidade de ação. As necessidades internas requerem a organização dos componentes comportamentais individuais em uma sequência específica, orientada para um objetivo. O alcance de um objetivo diminui a intensidade do estado de motivação e aumenta o limiar comportamental, o que leva ao abandono de um ou mais componentes da sequência comportamental e, a cessação da resposta (KUPFERMANN & SCHWARTZ, 2000).

Diversos estudos, realizados em roedores, têm sugerido que o teste de busca pela novidade pode ser utilizado para avaliar alguns aspectos da “busca por sensações estimulantes” em humanos (DELLU-HAGERDOM, 2006; KLIETHERMES e cols, 2007). Resultados desses testes, assim como o uso de drogas psicoestimulantes, compartilha um substrato neurobiológico similar, que é a ativação de estruturas e vias mesolímbicas (PIAZZA

e cols, 1989; WILLS e cols, 1994; BARDO e cols, 1996; BARDO & DWOSKIN, 2004; ABREU-VILLAÇA e cols, 2006; PELLOUX e cols, 2006). A exploração a um novo ambiente tem sido associada, em ratos, com o aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens, o qual é frequentemente associado com o fenômeno de recompensa (HOEBEL e cols, 1983; ROBBINS & EVERITT, 1996; WISE, 1994; IKEMOTO & WISE, 2004).

A novidade é um sinal fundamental associado com a atração da atenção, promovendo a codificação da memória e modificando o comportamento para um objetivo específico. A hipótese de codificação da novidade sugere que existe uma relação direta entre a probabilidade de codificar uma informação em longo prazo e seu grau de novidade (BUNZECK e cols, 2010).

#### 1.1.4 Ansiedade

A ansiedade é um estado psíquico complexo transitório, que se caracteriza por sentimentos de tensão e apreensão subjetiva, sugerindo circunstâncias de ameaça. É um estado não prazeroso acompanhado de excitação psíquica e somática, podendo estar presente um sentimento penoso de espera. O medo, a espera por algum tipo de acontecimento bom ou ruim e o estado de estresse são situações que geram ansiedade (CORTEZ & SILVA, 2008).

Os quadros de ansiedade estão relacionados com a produção de serotonina (5-HT) no SL, quando esta é liberada aleatoriamente, ou seja, em grandes concentrações ou sem modulação (HILL KARACABEYLI & GORZALKA, 2007). A área responsável pela aquisição e expressão da condição de medo é a amígdala, cuja região lateral é responsável pela consolidação da memória e plasticidade no condicionamento ao medo. Da amígdala, a informação se projeta para sítios efetores do tronco cerebral e hipotálamo, o qual produz a manifestação comportamental e autonômica em resposta ao medo (GARAKANI, MATHEW & CHARNEY, 2006).

Os sintomas e sinais da ansiedade podem ser somáticos (físicos), propiciando alterações sensoriais, motoras e autonômicas; e também psíquicos, com alterações emocionais, intelectuais e comportamentais (CORTEZ & SILVA, 2008).

Alterações autonômicas, musculares esqueléticas, cinestésicas e respiratórias podem ficar bem evidentes pela presença de taquicardia, vasoconstrição, sudorese, aumento do peristaltismo, taquipnéia, espasmos, dores, tremores, parestesias, hipoestésias, hiperestesia e calafrios. Quanto aos sintomas psíquicos, a ansiedade determina inquietação motora, irritabilidade, hiper ou hipofagia, hiperdipsia, logorréia, entre outras. As alterações psíquicas

emocionais que podem estar presentes são tensão, nervosismo, dificuldade de concentração, sensação de medo aumentada etc (CORTEZ & SILVA, 2008, GARAKANI MATHEW & CHARNEY, 2006).

## 1.2 OVÁRIOS: ASPECTOS GERAIS

Os ovários, glândulas reprodutoras femininas, são regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo produz e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atua sobre a hipófise estimulando-a a secretar o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Estes LH e FSH são os responsáveis pela regulação da função ovariana, que é caracterizada pela produção de gametas e pela produção hormonal (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009; WHITE, 2009).

Durante a menacme, as concentrações de LH e especialmente o FSH aumentam, na fase folicular. O FSH estimula o crescimento de folículos secundários maiores (fase folicular), com a proliferação das células da granulosa, que envolvem o ovócito, e estímulo à atividade aromatase. Essas células passam a produzir estradiol usando como substrato androstenediona e testosterona, oriundos das células da teca interna, que é estimulada por LH. A granulosa também produz um hormônio protéico, a inibina. Juntos, estradiol e inibina fazem feedback negativo, inibindo a secreção hipofisária de FSH. Com o crescimento de folículos, a produção de estradiol aumenta e promove, junto com a FSH, a expressão de receptores para LH na granulosa. O crescimento folicular promove o aumento da produção de estradiol que em pico, faz feedback positivo com o hipotálamo e a hipófise, aumentando a secreção de GnRH, LH e FSH. O pico das gonadotrofinas hipofisárias é responsável pelo amadurecimento do folículo e a conseqüente ovulação. As células foliculares tornam-se luteínicas e formam o corpo lúteo, produzindo principalmente progesterona e em menor quantidade estradiol (fase lútea). Esses esteróides então, fazem feedback negativo com o eixo hipotálamo-hipofisário (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009).

O número de folículos vai diminuindo à medida que avança a idade, provocando um declínio da fertilidade e dos níveis séricos de estrogênios, entre outros hormônios. Assim, o mecanismo de retroalimentação negativa é perdido, promovendo a elevação nos níveis séricos de FSH, antes ainda da menopausa. Próximo à menopausa, os ovários vão reduzindo de volume, reduzindo de forma progressiva na síntese dos hormônios gonadais e não respondendo adequadamente à estimulação hipofisária (JERILYNN e cols, 1998;

FERNANDES e cols, 2004; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008). Os principais hormônios ovarianos produzidos são o estradiol e a progesterona e, em menor proporção também são produzidos os andrógenos (androstenediona, testosterona e diidrotestosterona) a relaxina e a inibina. Os estrógenos também podem ser produzidos por conversão periférica de andrógenos, por exemplo, no tecido adiposo. (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009; WHITE, 2009).

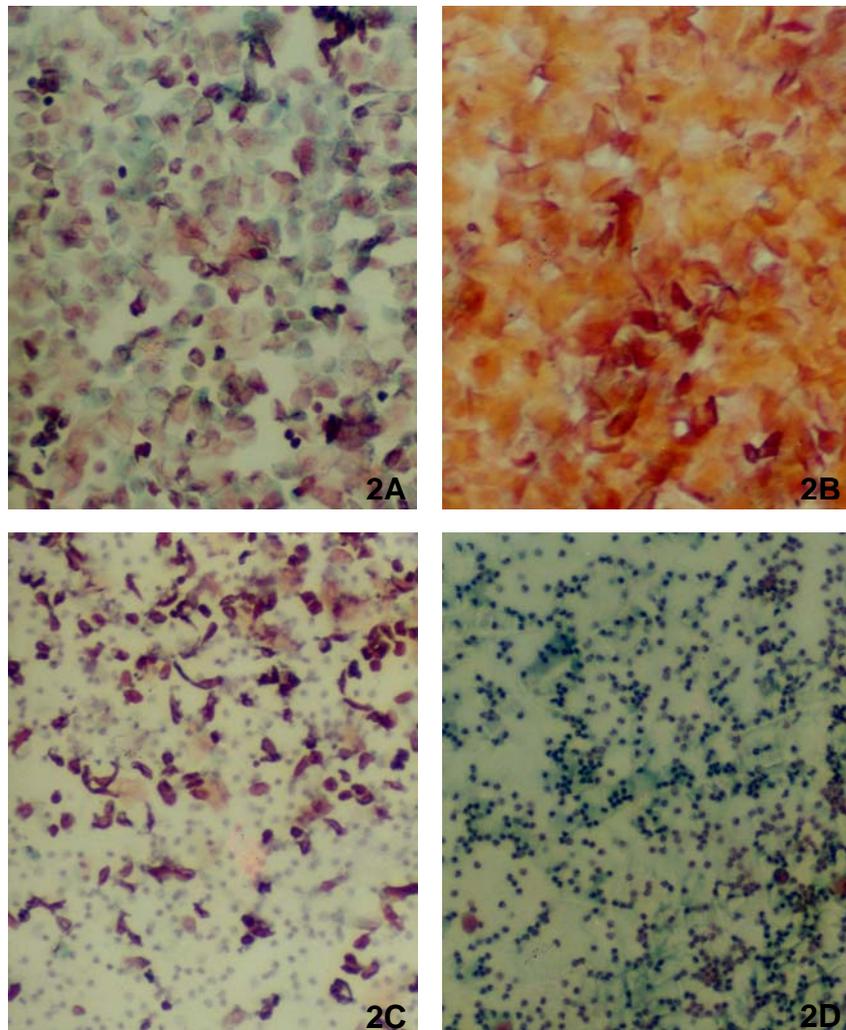
### 1.2.1 O ciclo menstrual e o ciclo estral

Paralelamente as fases do ciclo ovariano (fase folicular, fase ovulatória e fase lútea), ocorre um ciclo de revestimento/descamação da parede do endométrio uterino, o ciclo endometrial, que prepara o útero para a nidação. No início de cada ciclo menstrual, o endométrio encontra-se descamado pela última menstruação, que dura de 4 a 5 dias. Em seguida, na fase proliferativa, sobre a influência de estrogênio produzido pelos folículos ovarianos em desenvolvimento (cinco a sete dias após o início da menstruação), células endometriais remanescentes proliferam e há a reepitelização do endométrio que dura de sete a nove dias. Na região cervical, glândulas secretam muco fino e filamentosos, que favorece a entrada do espermatozóide. Há a proliferação e diferenciação das células epiteliais do canal vaginal, tornando o epitélio cornificado. Na segunda fase, após a ovulação, o corpo lúteo produz estrogênio e principalmente, progesterona, que aumenta a vascularização, acumula glicogênio nas glândulas do endométrio e diminui a proliferação celular. As células do epitélio vaginal apresentam bordas dobradas e descamação em blocos. (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009). As células esfoliadas podem identificar o estado hormonal da mulher. A predominância de células superficiais denota ação estrogênica, as células intermediárias predominam sob altas concentrações de progesterona, e as células basais ou parabasais indicam concentrações estrogênicas baixas, como na menopausa e na infância (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008).

Muitos aspectos da fisiologia ovariana de mulheres são similares aos observados em ratas, porém nestes animais, as mudanças cíclicas ocorrem num período mais curto, o ciclo estral, que compreende um período de 4-5 dias. O ciclo reprodutivo de ratas se mantém regular por cerca de 10 a 12 meses de vida (McGEE e cols, 2000).

A determinação das diferentes fases do ciclo é feita pela análise da citologia vaginal (Figura 3). A cada ciclo são observadas quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e (diestro II) que apresentam variação do padrão celular (MOREIRA, 1992; ARMADA-DIAS,

1996). No proestro, as células do epitélio vaginal são arredondadas com núcleos evidentes e os níveis de LH, FSH e estradiol apresentam-se crescentes. Nesta fase é observado um pico de LH seguido de ovulação. O estro é caracterizado por uma proporção elevada de células queratinizadas, anucleadas, níveis plasmáticos de estradiol, LH e progesterona baixos e FSH elevado. No diestro I observa-se a mesma proporção de células epiteliais, cornificadas e leucócitos e o aumento súbito de progesterona. No diestro II há predominância de leucócitos entre os demais tipos celulares, associados ou não a muco, níveis decrescentes de progesterona e LH (MOREIRA, 1992; SPORNITZ e cols, 1999; MARCONDES e cols, 2002).



**Figura 2:** Fotos de diferentes fases do ciclo estral.  
2A- Proestro; 2B-estro; 2C-metaestro; 2D-diestro. ARMADA-DIAS, 1996.

### 1.2.2 Estrogênio e sistema nervoso central

Os estrógenos ou estrogênios encontrados na espécie humana são a Estrona (E1), o Estradiol (E2) e o Estriol (E3). No estado não gestacional, a estrona e, principalmente, o estradiol são produzidos pelos ovários em quantidades de apenas 100 a 200 microgramas por dia, e o estriol é apenas um escasso subproduto do metabolismo da estrona, sendo importante durante a gestação (SOARES JUNIOR e cols, 2003; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008). Após a menopausa, a estrona é produzida em pequenas quantidades nos tecidos gordurosos, através da conversão de esteróides sexuais masculinos, como a androstenediona, oriundos da adrenal. Quanto maior o depósito de tecido adiposo, maior será a quantidade de estrona produzida. É sabido que mulheres obesas produzem mais estrogênio na menopausa do que mulheres magras na pré-menopausa (CASTRACANE e cols, 2006).

O estradiol participa de várias funções fisiológicas, incluindo todas as alterações somáticas que resultam na aparência feminina adulta, crescimento e desenvolvimento, reprodução, comportamento alimentar, aprendizado e memória e metabolismo lipídico (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; LIMA & SERTIÉ, 2009; WHITE, 2009).

No SN, além de sua ação protetora sobre os neurônios, há evidência que E2 tenha efeitos diretos em astrócitos e na microglia, conferindo neuroproteção na isquemia e em doenças neurodegenerativas (MARTIN & RONNEKLEIV, 2009).

A ação estrogênica é mediada por uma superfamília de receptores nucleares (ER), ER $\alpha$  e ER $\beta$ , que age regulando a transcrição gênica, que ocorre no curso de horas. Os subtipos de ER apresentam distintos padrões de expressão por tecido, em humanos e roedores. ER $\alpha$  é principalmente expresso em osso, fígado, útero, hipófise, testículo e tecido adiposo. Já o subtipo ER $\beta$  encontra-se, principalmente, em ovários, próstata, hipotálamo e hipocampo (NILSSON e cols, 2001; DEROO & KORACH, 2006). No encéfalo dois tipos de ER coexistem, tendo cada um uma distribuição específica em ratos, macacos e humanos (LACREUSE WILSON & HERDON, 2008). Estudos sugerem que o ER $\alpha$  está associado ao comportamento sexual (MAZZUCCO e cols, 2008), enquanto que ER $\beta$  está mais associado à regulação da plasticidade hipocampal sináptica (LIU e cols, 2008). A ausência ou deficiência de ER $\alpha$  provoca infertilidade em camundongos pela perda da regulação de LH e pela insensibilidade do útero às ações do estrogênio (HEWITT & KORACH, 2003).

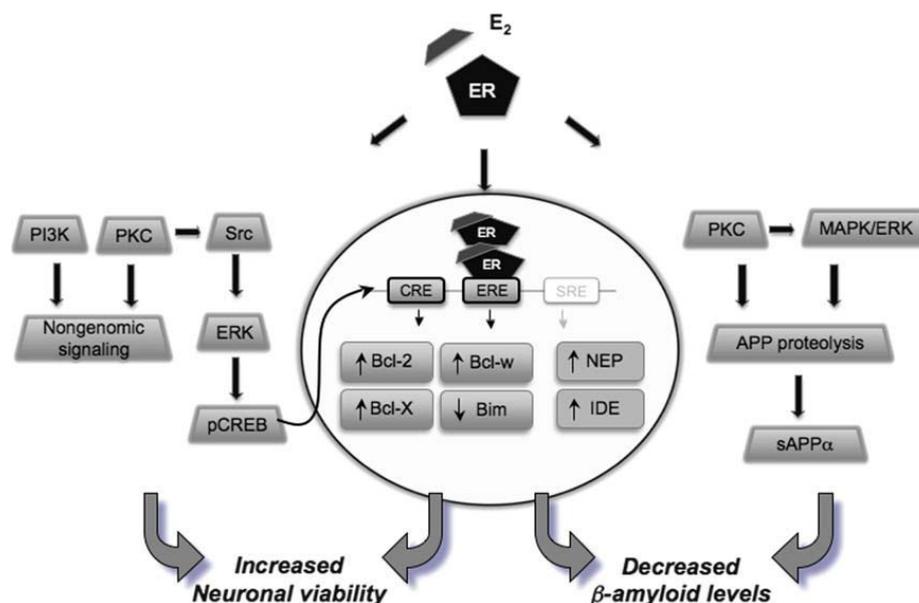
Na via de ação alternativa ou não genômica, um pequeno pool de receptores localizados na membrana plasmática sinaliza por acoplamento direto ou indireto com proteínas G, com aumento dos níveis de cálcio ou óxido nítrico (NO) e ativação de proteínas

cinases, gerando um efeito rápido, que ocorre em minutos ou segundos (COOKE & NAZZ, 2004; LEVIN e cols, 2005; DAHLMAN-WRIGHT e cols, 2006; DEROO & KORACH, 2006, VILLENA & KRALLI, 2008).

No cérebro, o estradiol apresenta ações rápidas, relacionadas à sinalização na membrana, que não são atribuídas à via clássica ou genômica. Atualmente, sabe-se que o E2 no hipotálamo, hipocampo e outras regiões do cérebro induzem o *up-regulation* de PKC, PKA, PI3K e MAP cinase levando a alterações de atividades neuronais. No entanto, a identificação de todos os mecanismos ainda é desconhecida, mas já começa a ser conhecido o *cross-talking* entre os eventos de sinalização rápida e alterações na expressão gênica (MARTIN & RONNEKLEIV, 2009).

No encéfalo, o estrogênio é conhecido como um regulador fundamental do comportamento reprodutor, possuindo também um importante papel neuroprotetores do SNC (MCEWEN e cols, 2002). Estudos em camundongos já determinaram a expressão de ER $\alpha$  e ER $\beta$  no hipocampo (PEREZ e cols, 2003). Mas, especificamente, ER $\beta$  medeia à proteção neuronal contra isquemia, em regiões corticais (DUBAL e cols, 2001), além de proteger os neurônios piramidais evitando a apoptose (MILLER e cols, 2005).

A deficiência de esteróides sexuais, em especial a falta de estrogênios, consequente da perda da função gonadal (menopausa) leva a alterações muito comuns entre as mulheres como as ondas de calor, a atrofia progressiva do sistema urogenital, o ganho de massa corporal, o aumento da incidência de doenças cardiovasculares e distúrbios do SN. Esses distúrbios podem ser minimizados, em grande parte, pela terapia de reposição hormonal. Alterações da concentração de estrógenos, durante o ciclo menstrual, também podem influenciar o estado mental e as funções cognitivas. Clinicamente, alterações no estradiol plasmático estão associadas a alterações do sono, a diversas formas de depressão, desordens afetivas, esquizofrenia e o maior risco para Alzheimer e Parkinson, resultando na redução da qualidade de vida (SAGRAVES, 1995; HALBE e cols 1999; MAKI & RESNICK, 2001; BELCHER, 2008; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2008; WHITE, 2009) O efeito neuroprotetor de estrógenos envolve duas vias de sinalização que podem justificar o aparecimento de doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer (Figura 3).



**Figura 3:** A sinalização neuroprotetora do estrogênio na Doença de Alzheimer. Os estrogênios incluindo o 17- $\beta$  estradiol (E<sub>2</sub>) reduzem a apoptose neuronal por efeitos não genômicos (i) pela ativação da P13K, proteína quinase C (PKC) e sinalização da Src/ERK e por efeitos genômicos (ii) pela via de sinalização da CREB e os elementos responsivos ao estrogênio (ERE) aos membros da família de genes Bcl-2 incluindo Bcl-X, Bcl-w e Bim. APP-percussor Ab da proteína amilóide; ERE, CRE (elementos de resposta a esteróides SER); NEP- nepriliasina; IDE-enzima de degradação de insulina (PIKE e cols, 2009).

### 1.2.3 Estrogênio e função cognitiva

Os estrogênios possuem diversos efeitos no encéfalo, incluindo sua relação com a função cognitiva/memória, relacionada ao hipocampo, mas que ainda não está bem esclarecida (BRANN e cols, 2007; SHERWIN & HENRY, 2008). Em humanos esta associação tem sido sustentada por avaliações durante a flutuação do ciclo menstrual, que mostrou a melhora da memória verbal em períodos do ciclo em que os níveis de estrogênios estavam elevados (BRANN e cols, 2007).

O declínio da função cognitiva tem se tornado um problema de saúde pública, haja vista que a prevalência de casos na população idosa aumentou de 17 a 34% (RAPP e cols, 2003). Em mulheres após a menopausa, o déficit cognitivo é consequente da perda dos efeitos moduladores dos esteróides sexuais sobre os neurotransmissores e a neuroproteção. Tais conhecimentos são baseados em estudos de excitação neuronal, formação de espinha dendrítica na região CA1 do hipocampo e de sinapses, após administração de E<sub>2</sub>, em ratas ovariectomizadas, em primatas e na flutuação de estrogênio ao longo do ciclo estral (PARDUCZ e cols, 2006; SCHARFNAN e cols, 2007).

A ação protetora do estrogênio não se restringe somente aos neurônios, havendo evidência que o mesmo tenha efeitos diretos sobre os astrócitos e a microglia, que facilita a

ação neuroprotetora na isquemia e em doenças neurodegenerativas, modulando a memória através de diversos tipos celulares no SNC (MARTIN & RONNEKLEIV, 2009).

#### 1.2.4 Estrogênio e comportamento

Os hormônios sexuais afetam o comportamento (BERMAN e cols, 1997), e o estradiol, em humanos e roedores, é um importante regulador do humor. Seus efeitos, no entanto, podem variar entre ansiolíticos e ansiogênicos, dependendo de fatores como a idade e o ciclo reprodutivo. Essa dicotomia deve levar em consideração o fato do estradiol agir através de ER $\alpha$  e ER $\beta$  (LUND e cols, 2005).

As baixas concentrações de estradiol após a menopausa estão relacionadas à depressão, distúrbios do sono, irritabilidade, ansiedade e disfunções cognitivas. Por outro lado, a terapia de reposição hormonal é consistente com a melhora do humor, sentimento de bem estar e aprendizado. Por outro lado, o efeito ansiogênico do estradiol é sugerido pelo elevado nível de depressão verificado em mulheres quando comparadas aos homens. Essa diferença sexual é evidenciada na puberdade (LUND e cols, 2005).

Estudos experimentais evidenciaram a similaridade de efeitos do E2 na ansiedade e no humor, a partir da utilização de testes comportamentais no labirinto em cruz elevada, que reflete o nível de ansiedade do animal (FRYE e cols, 2000). O declínio da ansiedade foi observado na fase de pro-estro ou quando os animais ovariectomizados (OVX), eram tratados com estradiol, confirmando assim, seu efeito ansiolítico (FRYE & WALF, 2004).

Ação mediada via ER $\beta$  está intimamente ligada à regulação de comportamentos não reprodutivos, que envolvem o desenvolvimento do encéfalo de forma a modular a plasticidade sináptica na amígdala basolateral e o processamento de comportamento emocional (KREZEL e cols, 2001).

#### 1.2.5 Estrogênio e controle da ingestão alimentar

Na mulher, a ingestão alimentar varia durante o ciclo menstrual, não sendo observada durante os ciclos anovulatórios. A menor média diária de ingestão ocorre na fase folicular, justamente quando se tem uma concentração elevada de estrogênio em comparação a fase lútea, quando são observadas concentrações médias de E2 e elevadas de progesterona. Além disso, sabe-se que a mulher ingere 10 % a menos do que consumia, afetando de forma

suficiente o balanço energético (LISNER e cols, 1988, LYONS e cols, 1989, PELKMAN e cols, 2001).

Em ratas e camundongos observa-se a diminuição de cerca de 25% da ingestão alimentar durante a fase peri-ovulatória em relação as demais fases do ciclo. Isto pode ser explicado pelo fato da concentração de estrogênio ser maior antes do pico de LH e menor no estro (DREWTT, 1974, BLAUSTEIN & WADE, 1976; ASARIAN & GEARY, 2002).

A mais instigante investigação no mecanismo inibitório da ingestão alimentar efetuada pelo estrogênio é baseada no fato do estrogênio agir no encéfalo promovendo uma alteração no processamento de feedbacks periféricos que controlam a ingestão. Há hipóteses para esse controle. Dentre elas estão: a) a dos sinais orosensoriais que promovem aumento ou redução da ingestão alimentar de acordo com o tamanho e tempo gastos durante a refeição; b) a dos sinais de saciedade desencadeados pela presença de alimentos no estômago, intestino ou sítios pós-absortivos, potencializados pela ação de colecistocinina e glucagon; c) sinais de adiposidade, gerados independentemente da ingestão e promovem restrições a quantidade das refeições, regulados insulina e leptina (SMITH, 1998, GEARY & SCHWARTZ, 2005).

### 1.3 ÁCIDOS GRAXOS

O aumento substancial do teor de gorduras na alimentação dos brasileiros, o consumo elevado de açúcar e aumento na ingestão de alimentos processados, ricos em gorduras e sal vem sendo observados nas últimas décadas (ANDRADE e cols, 2009). Estudos epidemiológicos mostram uma significativa correlação positiva entre a média de ingestão de gorduras e a incidência de obesidade e suas comorbidades (WOODS e cols, 2003). Com as mudanças de hábitos alimentares e maior disponibilidade de alimentos em comparação aos primórdios da humanidade, a população mundial está sendo cada vez mais acometida pelo sobrepeso e obesidade, que se tornou um problema de saúde pública da atualidade. No Brasil, a transição nutricional vem mostrando um declínio na prevalência da desnutrição e um aumento da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

A composição lipídica da dieta tem recebido uma atenção particular devido ao papel que exerce no metabolismo, e por sua associação com o desenvolvimento da cognição. Tem sido estudada tanto em modelos experimentais como em humanos (MIELKE e cols, 2006).

Os ácidos graxos ocorrem na natureza como substâncias livres e esterificadas. São ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos, que ficam esterificados com o glicerol, formando triglicerídeos ou triacilgliceróis. Estes são gorduras ou lipídeos caracterizados pela sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em compostos orgânicos. Amplamente distribuídos na natureza são componentes dos óleos e gorduras comestíveis (VIANNI, 1996; WAITZBERG, 2004).

Os lipídios além de ser fonte de energia, são componentes da membrana celular e estão relacionados à estrutura básica de alguns hormônios e sais biliares (SWITZER e cols, 2004). Alguns são essenciais, pois não possuem estruturas percussoras, sendo incorporados a partir da dieta (VALENZUELA & NIETO, 2003). Dentre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) destacam-se o ácido  $\alpha$  linolênico (LNA, 18:3,  $\omega$ -3) e o ácido linoléico (LA, 18:2,  $\omega$ -6). A importância do LNA tem sido comprovada por estudos experimentais que demonstram seus benefícios sobre doenças coronarianas e prevenção de doenças auto-imunes, pela redução do processo inflamatório. Sua deficiência promove alterações no desenvolvimento do cérebro e retina (WAHRBURG, 2004). Os  $\omega$ -3 são encontrados em concentrações mais expressivas peixes marinhos, especialmente aqueles da costa brasileira: atum, cavalinha, bonito e sardinha (VISENTAINER e cols, 2000) e em óleos de canola e linhaça (HOLUB, 2002). O LA exerce papel fundamental na redução da concentração plasmática de colesterol

total e de LDL-colesterol. É encontrado em óleos vegetais, principalmente, de girassol, milho e soja (HOLUB, 2002). O LA pode ser alongado formando o ácido araquidônico (AA, 20:4  $\omega$ -6), o precursor mais importante da biossíntese dos eicosanóides em seres humanos (WIJENDRAN & HAYES, 2004).

O tipo de gordura ingerido na dieta influencia o metabolismo levando às alterações da composição corporal. No entanto, a literatura científica não tem um consenso sobre a relação entre o ganho massa corpórea a composição lipídica da dieta (FRANCO 2009). Estudos em animais mostraram que dietas com grandes quantidades de ácidos graxos saturados (AGS) levam a um maior acúmulo de gordura, ganho de massa corporal e indução à obesidade quando comparadas às ricas em AGPI (HILJO, 1992; LOMBARDO, 2006).

Alterações decorrentes da ingestão de dietas hiperlipídicas podem causar hipertrigliceridemia, favorecer a síntese de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e reduzir as lipoproteínas de alta densidade (HDL), diminuir a sensibilidade à insulina e à leptina e a capacidade oxidativa mitocondrial (POLAKOW e cols, 2007; CORDERO e cols, 2007).

### 1.3.1 Ácidos graxos e sistema nervoso

A composição química, a funcionalidade, o desenvolvimento e a maturação do encéfalo podem ser influenciados pela dieta, e estão relacionados a alterações nos níveis de fatores de crescimento e neurotransmissores. Muitos destes mediadores são derivados de nutrientes como, por exemplo, o aminoácido tirosina que é precursor da dopamina e da adrenalina e o triptofano que é precursor da serotonina, da colina e da acetilcolina (FERNSTROM, 2000).

Os lipídeos constituem cerca de 50 a 60% do peso seco do encéfalo de um adulto, e 35% desses encontram-se na forma de AGPI, principalmente o ácido araquidônico (AA, 20:4,  $\omega$ -6) e o ácido decosahexanoico (DHA, 22:6,  $\omega$ -3), derivados do LA e LNA provenientes da dieta (LAURITZEN e cols, 2001, NAKANISHI e cols, 2003). Sendo o balanço entre o DHA e o AA crucial para o funcionamento do SNC (FRYE & WALF, 2004).

No encéfalo, os ácidos graxos são os principais componentes estruturais, onde é estimado que responda por 50% da membrana neuronal além da bainha de mielina (RAPOPAT, 2005). Portanto, exercem forte influência na função neuronal podendo causar alteração nas propriedades da membrana, incluindo efeitos no transporte de íons, na endocitose, na exocitose e nas proteínas ligantes de membrana, como a proteína G importante para a deflagrar a ação de neurotransmissores (OWADA, 2008).

Os AGPI são constituintes dos fosfolipídios das membranas que são formadas por uma série de classes de fosfolipases e que podem elas mesmas alterar um sinal na transdução de mensagens celulares ou por meio da regulação intracelular das cascatas de eicosanóides, o que resulta na alteração de metabolismo, crescimento e diferenciação celular (JUMP & CLARCKE, 1999). Mudanças na composição de ácidos graxos da dieta podem influenciar a plasticidade do encéfalo, sendo que este efeito pode não prejudicar a capacidade de desenvolvimento do encéfalo em resposta a estímulos ambientais, mas pode alterar a capacidade de maturação do encéfalo de se recuperar da lesão sofrida (WAINWRIGHT, 2002).

Os AG exercem influencia no comportamento tanto em roedores como em humanos. Estudos associaram a deficiência de ácido graxo essencial a mudanças de neurotransmissores específicos em encéfalos de ratos (JUMP & CLARCKE, 1999). Em camundongos de sete meses de idade, a ingestão alimentar rica em  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 afetou o equilíbrio desses ácidos graxos, presentes nos fosfolipídios na membrana do encéfalo, sugerindo a existência de mecanismo controle de entre AGPI capaz de influenciar o aprendizado e a memória (UMEZAWA e cols, 1995). Em ratos, foi verificado que a deficiência crônica de ácidos graxos  $\omega$ -3 na dieta reduz a acuidade visual, promove deficiência cognitiva e comportamental (CHURCH, 2007), além de reduzir os receptores de dopamina e aumentar a densidade dos receptores de serotonina no córtex frontal de ratas jovens e adultas. Efeitos similares foram observados em porcos alimentados com uma dieta deficiente em  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 (WAINWRIGHT, 2002).

### 1.3.2 Óleo de soja e atividade estrogênica

Os ácidos graxos poliinsaturados são encontrados em abundância em óleos vegetais, como o óleo de soja. Este é composto por aproximadamente 8% de ácido linolênico ( $\omega$ -3) e cerca de 56% de ácido linoléico ( $\omega$ -6), 15% de ácido graxo saturado e 23% de monoinsaturados (McDONALD, 2005).

O óleo de soja possui a proporção mais elevada de ácido linoleico ( $\omega$ -6) em comparação com os outros óleos vegetais como o óleo de milho, girassol e canola (McDONALD, 2005). No Brasil, o óleo de soja representa 82% do total de óleos e gorduras vegetais consumidos pela população, sendo rico em ácidos graxos poliinsaturados. Isso ocorre devido ao país ser um grande produtor e exportador de soja, e portanto o mais utilizado em todas as classes sociais (LEVY-COSTA, 2005).

Estudo experimental demonstrou a atividade estrogênica do óleo de soja em ratos albinos, a partir do estudo do epitélio da vagina e da massa do útero. Utilizando o modelo experimental de ovariectomia, avaliaram ratas castradas tratadas com estradiol ou com óleo de soja, durante cinco dias. Verificaram um aumento significativo da cornificação do epitélio vaginal e o aumento da massa do útero semelhante entre os grupos ovariectomizados tratados com estradiol e com o óleo de soja. O mesmo padrão de resposta foi verificado quanto à massa corporal. Estes resultados sugerem que o óleo de soja tenha um efeito semelhante ao do estradiol (elSattar ElBaltran, 2001).

## **1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO ANIMAL, NUTRIÇÃO E DE MENOPAUSA.**

### 1.4.1 Comportamento associado à ansiedade

Dentre os testes comportamentais para a avaliação dos níveis de ansiedade em animais experimentais, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais populares (PELLOW e cols, 1985; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; MARCO e cols, 2006). Esta popularidade (mais de 3100 artigos publicados, Web of Science, 2009) se deve ao fato de ser um teste econômico, rápido, de simples desenho, sensibilidade bidirecional a drogas (sensível a efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos) e por não requerer procedimentos de teste cansativos como, privação de comida/água ou uso de choques elétricos (PELLOW e cols, 1985; RODGERS e cols, 1997). O LCE foi validado em ratos (PELLOW e cols, 1985), camundongos (LISTER, 1987), porquinhos da índia (REX e cols, 1994), cobaias (HENDRIE e cols, 1997) e hamsters sírios (YANNIELLI e cols, 1996). Os roedores, de forma geral, evitam as áreas abertas do labirinto, pressupondo-se que sejam as mais aversivas, ou seja, ansiogênicas. Mostram preferência pelas partes fechadas e protegidas pelas paredes do aparelho (PELLOW e cols, 1985; MARCO e cols, 2006). Assim, o tempo no braço aberto (BA) e o número de entradas no BA são utilizados como medidas de ansiedade (HOGG, 1996; RODGERS & DALVI, 1997; STEAD e cols, 2006; ABREU-VILLAÇA e cols, 2008; MANHÃES e cols, 2008; FRAGAMARQUES e cols, 2009a).

#### 1.4.2 Comportamento associado à busca pela novidade

Diversos estudos têm sugerido que a busca pela novidade em roedores pode ser utilizada para avaliar alguns aspectos da “busca por sensações estimulantes” em humanos (DELLU-HAGERDON, 2006; KLIETHERMES e cols, 2007). Em animais, modelos de busca por drogas é mais frequente na presença de comportamento de busca pela novidade (PIAZZA e cols, 1989; WILLS e cols, 1994; BARDO e cols, 1996; BARDO & DWOSKIN, 2004; ABREU-VILLAÇA e cols 2006; PELLOUX e cols, 2006). Assim, a busca pela novidade, assim como o uso de drogas psicoestimulantes, compartilha um substrato neurobiológico similar, que é a ativação de estruturas e vias mesolímbicas.

Estudos experimentais mostraram que ratas ovariectomizadas (OVX) apresentam efeitos de ansiedade e depressão similares aos de mulheres menopausadas (FRYE e cols, 2000; FREY & WALF, 2002). Em nosso estudo, verificamos um nível maior de ansiedade nas ratas ovariectomizadas, do que nos demais grupos, confirmando a participação do estrogênio sobre desordens neuropsiquiátricas. Esta ação estrogênica parece ser mediada via ER $\beta$  no hipocampo, determinando importante efeito antidepressão e antiansiedade (WALF & FRYE, 2006).

#### 1.4.3 Avaliação de memória e aprendizado

Em modelos experimentais, alguns procedimentos e aparelhos foram desenvolvidos para avaliar memória e aprendizagem. Mas, é o labirinto aquático, desenvolvido em 1981, por Richard Morris, que vem se destacando nos estudos sobre a neurobiologia da memória (GALLAGHER e cols, 1993). O teste de Morris baseia-se na aversão dos roedores à imersão em água (FILGUEIRAS & MANHÃES, 2004 e 2005), já que eles procuram sair da água o mais rápido possível. Uma adaptação deste equipamento é o labirinto aquático de oito braços (LAROUB), no qual é possível avaliar a aprendizagem e memória espacial (OLTON, 1987). O animal deve aprender a localização do braço que apresenta uma plataforma de escape, baseando-se nas pistas externas ao aparelho, pois ele não pode ver, ouvir ou cheirar a plataforma. A orientação espacial deve ser aprendida e armazenada por períodos variáveis de tempo. A aprendizagem sobre locais pode envolver diferentes estratégias, como aprender as relações espaciais que existem entre os objetos do ambiente e utilizar essas relações para formar um mapa aloentríco (ou mapa cognitivo) que será utilizado para encontrar o local desejado (O'KEEF & NADEL, 1978). A exclusão das pistas proximais e ênfase nas pistas

distais força o uso de estratégias de mapeamento espacial. Uma das principais vantagens do LAROB é a velocidade de treinamento, posto que ratos são nadadores natos (WHISHAW, 1995) e, normalmente demoram menos de 15 s para aprender a tarefa (MORRIS, 1984).

#### 1.4.4 Modelo de menopausa

A remoção bilateral dos ovários de ratas (ovariectomia) é usada como modelo de estudo da deficiência de esteróides sexuais, simulando a menopausa, sendo esse estado comprovado pelas baixas concentrações séricas de estradiol e pela diminuição do peso do útero (MOREIRA e cols, 1997; GOSS e cols, 2009). Sob essa condição de hipogonadismo, estudo realizado em nosso laboratório mostrou a relação com a progressiva redução de massa óssea (ARMADA e cols, 2006).

#### 1.4.5 Modelo de nutrição

Ratos submetidos à dieta hiperlipídica, considerada altamente palatável, apresentam a partir da terceira semana de ingestão um aumento na quantidade de tecido adiposo com tendência a alterações no perfil lipídico (ESTADELLA, 2004). O sobrepeso ou a obesidade representados pelo ganho significativo de massa corporal e pela deposição abdominal de gordura, quando comparado à dieta padrão, comprova a eficiência do modelo de estudo. Apesar do ganho de massa corporal alguns estudos mostram que a ingestão diária da ração pode também permanecer inalterada (DUARTE, 2006, COSTA e cols 2008).

## 1.5. JUSTIFICATIVA

A evolução de práticas médicas no campo diagnóstico e terapêutico aumentou a expectativa de vida e vem elevando, continuamente, a ocorrência das alterações degenerativas comuns a terceira idade. Para as mulheres, esta fase está associada a perda da função gonadal (em particular, a perda do estrogênio), que é um fator crítico para o bem estar. Segundo a OMS, até 2030, aproximadamente, um bilhão de mulheres estarão na menopausa. Atualmente, apenas no Brasil mais de 13,5 milhões de mulheres passam pelo climatério.

Os esteróides sexuais são reguladores potentes dos neurônios do SNC e sua deficiência promove além das alterações endócrinas alguns sintomas emocionais (angústia, instabilidade emocional, estados depressivos dentre outros), além dos problemas cognitivos que estão se tornando cada vez mais evidentes em idosos.

Mudanças no comportamento alimentar caracterizadas pelo elevado consumo energético, baseado em dietas ricas em lipídeos, propiciam o aumento o risco às doenças degenerativas e contribuem de forma negativa ao processo de envelhecimento na mulher. Ácidos graxos poliinsaturados são essenciais para o desenvolvimento do cérebro, e o equilíbrio na relação  $\omega$ -3/  $\omega$ -6 é necessário para manter seu funcionamento adequado. Grande é o interesse no estudo de AGIP de cadeia longa, que apresentam elevada aceitação e consumo na sociedade brasileira, principalmente sob a forma de óleo de soja. Assim, a associação da deficiência estrogênica com a ingestão hiperlipídica tende a ser deletéria, inclusive em relação às funções cognitivas, contribuindo para o desencadear de mais um problema de saúde pública mundial.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

- Avaliar os efeitos da associação entre dieta hiperlipídica, contendo 19% de óleo de soja, e a deficiência gonadal sobre o comportamento e o desenvolvimento corporal de ratas adultas.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar comportamentos associados à ansiedade,
- Avaliar comportamentos associados à busca (por novos estímulos), novidade
- Avaliar o desempenho quanto à memória/aprendizado,
- Avaliar os dados etológicos relativos à ansiedade e motivação,
- Avaliar a ingestão alimentar,
- Avaliar a massa e o comprimento corporal,
- Avaliar a massa de tecido adiposo
- Determinar as concentrações séricas de colesterol, HDL-c, VLDL-c, triglicérides e estradiol.

### ➤ 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), com protocolo nº CEA/238/2008.

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas ratas adultas Wistar, oriundas de diferentes ninhadas, virgens isogênicas, com 90 dias de idade, reproduzidas e alocadas no Biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina, IBRAG/UERJ, em gaiolas medindo 34×41 cm, com temperatura ambiente controlada, umidade constante e ciclo claro /escuro de 12 horas (6:00 h às 18:00h), tendo o acesso livre à água e a ração comercial (Purina®, São Paulo), até o início do experimento.

##### 3.1.1 Observação dos ciclos estrais

A partir dos 90 dias de idade, as ratas foram submetidas à coleta de secreção vaginal para citologia, diariamente, por duas semanas. As amostras foram colhidas com finas ponteiros plásticos, cuidadosamente, introduzidas na vagina. O material foi distribuído em lâminas e analisado a fresco por meio de microscopia óptica, utilizando objetivas de 10× e 40× (Olympus, modelo BX40, Japão). O acompanhamento das seqüências de ciclos estrais permite avaliar as condições de funcionamento das gônadas e assim, indiretamente, a influência sistêmica do estrogênio endógeno (MARCONDE e cols, 2002; ARMADA e cols, 2006). Foram selecionadas para o estudo, somente ratas que apresentavam ciclos estrais regulares. Para atingir o número total de 120 animais, o protocolo foi repetido três vezes.

#### **3.2 Delineamento experimental**

Aos 105 dias de idade, as fêmeas foram submetidas à ovariectomia (OVX) através de duas pequenas incisões para-espinais na região dorsal entre a crista ilíaca e as costelas mais inferiores. O grupo SHAM recebeu apenas a incisão cirúrgica sem a retirada das gônadas, para proporcionar o estresse cirúrgico (MOREIRA, 1997). A partir desse procedimento as ratas foram divididas em quatro grupos experimentais, que ao final foram constituídos por 30 animais cada. Os grupos foram assim definidos:

- Controle (C, n=29) - ratas alimentadas com dieta normolipídica, contendo 4% de óleo de soja;
- Ovariectomizadas (OVX, n=30) – ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta normolipídica, contendo 4% de óleo de soja;
- Controle 19 (C19, n=30) – ratas alimentadas com dieta hiperlipídica, contendo 19% de óleo de soja;
- Ovariectomizadas 19 (OVX19, n=30) – ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica, contendo 19% de óleo de soja.

Sete dias após a castração, teve início a alimentação com a ração manipulada, até o final do período experimental (155 dias de idade), quando os animais foram sacrificados e os tecidos coletados para análise.

Durante todo o período experimental (dos 90 aos 155 dias), os animais foram pesados semanalmente e a ingestão alimentar foi verificada a cada 4 dias. A ingestão diária média de cada animal foi determinada a partir da resto-ingestão, dividindo a quantidade de ração pelo número de animais e pelo período em dias. As aferições de massa e comprimento corporais e da ração foram sempre realizadas no mesmo horário, em balança de precisão (MF Filizola). Os testes comportamentais tiveram início após 25 dias de ingestão da ração manufaturada.

### **3.3 Ração purificada**

A ração foi manipulada segundo o estabelecido pelo American Institute of Nutrition (AIN-93M, REEVES, 1997), apropriada para estudos com Nutrição Experimental (Tabela 2). As rações foram produzidas na fábrica de ração do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ. Os ingredientes da ração foram pesados em balança de precisão (MF-Filizola) colocados na batedeira industrial (Hobart) no ciclo leve por 10 minutos. Foram adicionados mais 10 minutos na batedeira para homogeneizar todos os ingredientes, e por fim a adição do óleo e água filtrada. Após esse processo, a massa foi transformada em peletes, e posterior secagem em estufa a 56°C por 18 horas. Após a produção, as rações foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas à temperatura aproximada de 5°C, para a conservação.

Para animais adultos, o AIN recomenda a utilização de dieta de manutenção, cuja ração contém 4% de lipídio (normo-lipídica). A fonte lipídica utilizada pode variar, mas em nosso protocolo utilizamos o óleo de soja contendo 19% de lipídio.

**Tabela 2:** Composição nutricional das rações purificadas, segundo o AIN-93M.

Conteúdo da ração(g/100g)	Dieta controle 4%	Dieta hiperlipídica 19%
Caseína <sup>1</sup>	14	14
Amido Milho <sup>2</sup>	63	47,8
Sacarose <sup>3</sup>	10	10
Óleo de Soja <sup>4</sup>	4	19
Fibra <sup>5</sup>	5	5
Mix Mineral <sup>6</sup>	3,5	3,5
Mix Vitamínico <sup>7</sup>	1	1
L-Cistina <sup>8</sup>	0,18	0,18
Bitartarato de Colina <sup>9</sup>	0,25	0,25
<b>Percentual Energético</b>		
Carboidrato	68,2g (273Kcal - 76%)	54,7g (219Kcal - 50%)
Proteína	11,2g (44,8Kcal - 12%)	11,2g (44,8Kcal - 10.3%)
Lipídio	4g (36Kcal - 10%)	19g (171Kcal - 39%)
Kcal/g	359 (3,6Kcal/g)	435 (4,3Kcal/g)
<b>Ácidos graxos (ml)</b>		
Saturados	0,53	2,51
Monoinsaturados	1,06	5
Poliinsaturados	2,13	10,1

Descrição dos ingredientes: 1 = Farnos®; 2 = Farnos®; 3 = União ®; 4 = Liza ®; 5 = Farnos®; 6 = Prag soluções®; 7 =Prag soluções®; 8 = Farnos ® e 9 = Pragsoluções ®.

### 3.4 Testes comportamentais

Os animais começaram a ser testados 25 dias após o início da alimentação com a dieta manufaturada. Iniciando pelo teste de ansiedade, seguido pelo de busca pela novidade e concluindo com o de aprendizagem/memória. Para a realização dos testes comportamentais foram utilizados protocolos (ANEXO1), objetivando a identificação de cada animal individualmente com o respectivo dia e horário de teste. No decorrer dos testes, todos os animais foram filmados por uma câmera de vídeo Panasonic conectada a um gravador VHS e a um aparelho de televisão. A análise comportamental foi realizada a partir das imagens gravadas com o auxílio de programas de computador desenvolvidos pelo Laboratório de Neurofisiologia/IBRAG/UERJ (ACC Behav, ACC OpF HB Rat e ACC Plus M), a fim de gerar dados para a análise quantitativa. Antes da exposição aos testes, todos os animais eram ambientados na sala de comportamento em torno de 10 minutos.

### 3.4.1 Labirinto em cruz elevada (LCE)

Este teste foi utilizado para avaliar os níveis de ansiedade dos animais. A testagem foi iniciada no 137º dia de idade, ou seja, 26 dias após o início da alimentação com ração manufaturada. Dado o grande número de animais, estes foram divididos em dois dias consecutivos de teste, sendo iniciado sempre no mesmo horário (9:00h), utilizando-se apenas o período da manhã. O LCE apresenta o formato do símbolo + com dois braços abertos (sem paredes laterais; 50 cm de comprimento × 10 cm de largura) e dois fechados (50 cm de comprimento × 10 cm de largura × 40 cm de altura) dispostos perpendicularmente, elevados 50 cm acima do chão (Fig. 4). O teste começava com a colocação de um animal de cada vez na área central do labirinto. O animal podia explorar o labirinto por 10 min. Entre animais, o labirinto era limpo com papel toalha umedecido com uma solução contendo 50% de etanol e seco logo em seguida. Os tempos de permanência e os números de entradas em cada uma das áreas do labirinto (braços abertos, braços fechados e região central) foram medidos. O tempo de permanência nos braços abertos e o seu percentual (Tempo BA e %Tempo BA: Tempo BA dividido pela soma do Tempo BA com o tempo de permanência nos braços fechados – Tempo BF) e o número de entradas nos braços abertos e o seu percentual (Entradas BA e %Entradas BA: Entradas BA dividido pela soma do Entradas BA com o número de entradas nos braços fechados – Entradas BF) foram utilizados com medidas de ansiedade (FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). O número de entradas no braço fechado (Entradas BF) foi utilizado como medida de atividade. Uma entrada era contada sempre que o animal cruzava com as quatro patas em direção a uma das áreas do labirinto. Adicionalmente, o percentual de tempo de permanência no centro do labirinto (%Tempo CN: tempo de permanência no centro dividido pelo tempo total do teste) foi utilizado como uma medida independente de tomada de decisão (MANHÃES e cols., 2008; RODGERS & DALVI, 1997). Também foram avaliados parâmetros etológicos (RODGERS & DALVI, 1997) como: *rearing* (movimentos verticais sobre as patas traseiras), *stretched attend posture* (SAP: o animal estica-se para fazer exploração sem dar passos), *grooming* (autolimpeza) e *head dipping* (HD: movimentos de exploração com a cabeça passando abaixo do nível do piso do labirinto).



**Figura 4:** Labirinto em cruz elevado (LCE).

### 3.4.2 Campo vazado (CV)

Este teste foi utilizado para avaliar a capacidade de busca por novidade. A testagem foi iniciada no 139º dia de idade, ou seja, 28 dias após o início da alimentação com ração manufaturada. Dado o grande número de animais, estes foram divididos em dois dias consecutivos de teste, sendo iniciado sempre no mesmo horário (9:00h), utilizando-se apenas o período da manhã. O equipamento de teste consiste de uma área (80 cm de largura × 60 cm de profundidade) cercada por paredes (40 cm de altura), cujo piso da arena apresenta 16 orifícios (4 cm) uniformemente espaçados (Fig. 5), ficando a 5cm do chão. animal pode explorar com o focinho. Os animais eram colocados, um por vez, na arena, voltados para uma das paredes. A atividade exploratória foi avaliada utilizando-se o número de orifícios explorados (FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). Dados etológicos como *rearing* (movimentos verticais sobre as patas traseiras), *stretched attend posture* (SAP: o animal estica-se para fazer exploração sem dar passos) e *grooming* (autolimpeza), os quais têm sido utilizados como medidas de atividade vertical, avaliação de risco e exploração (RODGERS e cols, 1997).



**Figura 5:** Campo vazado (CV).

### 3.4.3 Teste do labirinto aquático radial de oito braços (LAROBS)

Este teste é utilizado para avaliar a aprendizagem/memória, a partir da exploração do labirinto. Os testes foram iniciados sempre no mesmo horário (9:00h). O equipamento tem o formato de um asterisco (Fig. 6), sendo que da área central (com 41 cm de diâmetro) saem 8 braços (com 29 cm de comprimento  $\times$  13 cm de largura  $\times$  40 cm de altura). O labirinto é preenchido com água ( $26 \pm 1$  °C) até a uma profundidade de 34 cm, de tal forma que os ratos não podem tocar o fundo do labirinto ao nadarem em na superfície. Uma plataforma de escape (8 cm de comprimento  $\times$  10 cm de largura) foi posicionada no fim de um dos braços, 1 cm abaixo da superfície da água. Tinta branca não tóxica foi utilizada para opacificar a água, escondendo a plataforma. Diversas pistas visuo-espaciais estavam presentes fora do labirinto e a posição destas foi mantida ao longo de todo o experimento. O teste começava com o animal sendo liberado na parte central do labirinto, voltado para longe do braço que continha a plataforma (FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). Foram dados 2 minutos para que cada animal encontrasse a plataforma nadando pelo labirinto. Caso tal fato não ocorresse, o experimentador, ao final do período de 2 min, guiava, com cuidado, o animal em direção a plataforma, onde este podia ficar por 20 s, sendo trocado posteriormente por outro animal. Após encontrarem a plataforma (sozinhos ou auxiliados) e lá permanecerem por 20 s, os animais eram devolvidos para suas gaiolas. Cada animal foi testado 4 vezes num intervalo de 15 min entre os testes por dia ao longo de 5 dias. Nos primeiros 4 dias a plataforma ficou sempre na mesma posição. No quinto dia a plataforma foi colocada no braço

localizado diametralmente oposto ao braço em que ele estava localizado anteriormente. O parâmetro avaliado foi a latência (em segundos) para encontrar a plataforma de escape.



**Figura 6:** Labirinto aquático radial de oito braços (LAROB).

### 3.5 Análises séricas

Ao final do período experimental, os animais (155 dias de idade) foram anestesiados com Avertin (300mg/Kg) e o sangue foi coletado por punção da veia jugular. Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 1590x g /2500rpm (centrífuga Hitachi CR22, USA), por 15 minutos. O soro foi armazenado a -20° C para posterior análise.

As dosagens de triglicerídios, colesterol e HDL-colesterol foram realizadas por método colorimétrico, utilizando-se Kits comerciais (Bioclin®). As análises foram feitas em duplicatas e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro (TU-1800, UV-VIS®, Columbia, MD, USA). As concentrações de VLDL foram obtidas através da Fórmula de Friedwald, que utiliza as concentrações séricas de triglicerídeos. Todos os resultados foram expressos em mg/dL.

A concentração de estradiol foi determinada por radioensaio específico (RIE), através de Kit comercial (MP Biomedicals, Inc., CA, USA). As análises foram feitas em duplicata e a quantificação foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA).

### 3.6 Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de médias e erros padrão das médias. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade das distribuições. O limite de significância adotado foi de  $P < 0,05$ .

### 3.6.1 Composição corporal, ingestão alimentar e análises séricas

Os resultados de consumo alimentar e massa corporal foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA) bivariada, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para os demais resultados será utilizado o método de ANOVA univariada, seguida do pós-teste de comparação múltipla Newman Keuls. Todos os resultados são expressos como média±erro padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de  $P < 0.05$ . O software utilizado foi o Prism (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com, EUA).

### 3.6.2 Labirinto em cruz elevada (LCE)

Uma ANOVA multivariada (MANOVA) foi utilizada para a análise dos seguintes dados: Tempo BA, %Tempo BA, %Tempo CN, Entradas BA, %Entradas BA e Atividade Total (Entradas BA + BF). Os fatores utilizados foram o OVARIECTOMIA (ovariectomia e controle) e a DIETA (4% ou 19%). Os dados etológicos (verticalização, autolimpeza, alongamento e abaixamento da cabeça) foram também analisados com uma ANOVA multivariada (MANOVA) usando como fatores o OVARIECTOMIA e a DIETA. As análises iniciais foram seguidas de ANOVAs de menor ordem ou pelo FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) para as comparações par-a-par.

### 3.6.3 Campo vazado (CV)

Inicialmente, foi utilizada uma ANOVA univariada (uANOVA) para a análise do número de orifícios explorados. Os fatores utilizados foram o OVARIECTOMIA (ovariectomia e controle) e a DIETA (4% ou 19%). Os dados etológicos (verticalização, autolimpeza e alongamento) foram analisados com uma MANOVA usando como fatores o OVARIECTOMIA e a DIETA. As análises iniciais foram seguidas de ANOVAs de menor ordem ou pelo FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) para as comparações par-a-par.

#### 3.6.4 Teste do labirinto aquático radial de oito braços (LAROB)

Inicialmente, foi utilizada uma análise de variância com medidas repetidas (rANOVA) para a análise das latências, em segundos, para encontrar a plataforma submersa. Os fatores utilizados foram OVARIECTOMIA (ovariectomia e controle) e DIETA (4% ou 19%). Os fatores de repetição foram DIA (1 até 4) e TESTE (1 até 4). Os resultados de latência do quinto dia (*probe trial*) foram analisados com uma rANOVA com OVARIECTOMIA e DIETA como fatores e com TESTE como fator de repetição. Estas análises iniciais foram seguidas de ANOVAs de menor ordem ou pelo FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) para as comparações par-a-par. Para interações com valor de  $P < 0,1$ , foi avaliado se ANOVAs de menor ordem detectam efeitos de OVARIECTOMIA após a subdivisão dos fatores de interação (SNEDECOR & COCHRAN, 1967). Para a realização das rANOVAs, a hipótese de esfericidade foi testada pelo teste de Mauchley. A esfericidade assume igualdade de variâncias para todos os pares das medidas realizadas com repetição. Cumpre ressaltar que o teste de Mauchley é altamente sensível às violações de normalidade (KESELMAN e cols, 1980). Nos casos em que houve rejeição da hipótese de esfericidade, o parâmetro  $\epsilon$  foi corrigido pelo teste de Greenhouse-Geisser (HUYNH & FELDT, 1976). Com objetivo de simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, descreveremos apenas os resultados dos testes univariados.

## 4. RESULTADOS

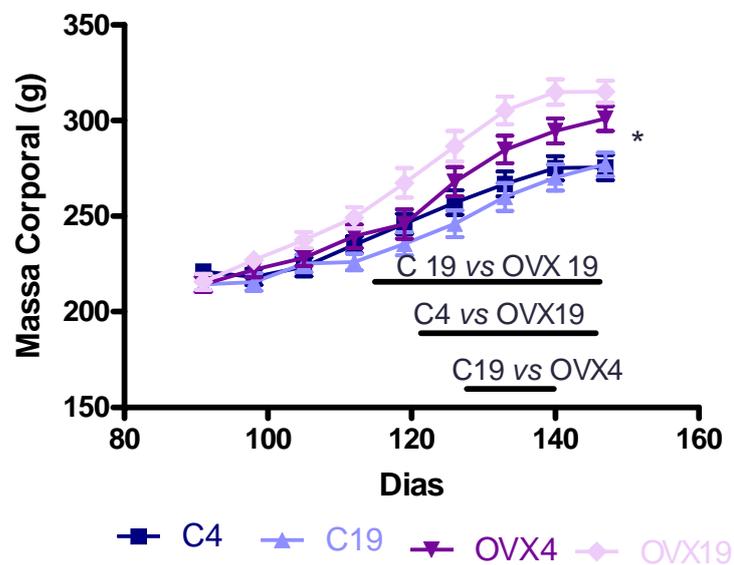
### 4.1 Avaliação da composição corporal e da ingestão alimentar

#### 4.1.1 Evolução da massa corporal

Aos 90 dias a massa corporal média das ratas era de  $213,8 \pm 0,99$  g (Gráfico 1). Durante o período experimental (90 – 155 dias) não houve diferença significativa na evolução da massa corporal entre os grupos C4 e o C19, nem entre os grupos OVX4 e OVX19.

Aos 119 dias de idade, o grupo OVX19 apresentou massa corporal 13,6% maior do que o grupo C19 e, 12% maior em relação ao grupo C4 aos 126 dias de idade.

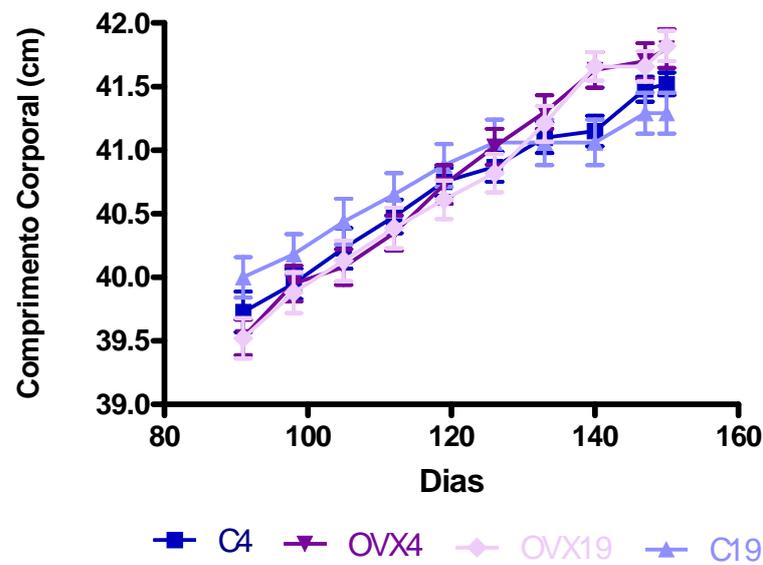
Aos 133 dias de idade o grupo OVX4 apresentou massa corporal 9% maior que o C19. Mas, foi somente com 150 dias de idade que o OVX4 apresentou o aumento significativo de 9,3% em relação ao C4.



**Gráfico 1:** Evolução da massa corporal entre os 90 e 155 dias nas ratas C4 (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX4 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. \*p<0,05 C4 vs OVX4.

#### 4.1.2 Comprimento corporal

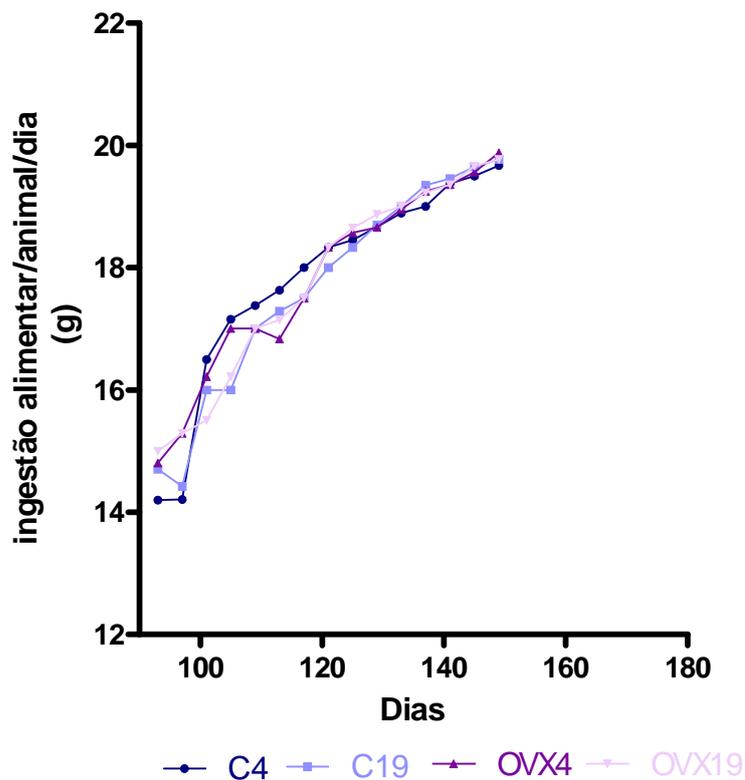
A evolução do comprimento corporal analisada dos 90 aos 155 dias, não mostrou qualquer alteração entre os grupos, Gráfico 2.



**Gráfico 2:** Evolução de comprimento corporal entre os 90 e 155 dias nas ratas C4 (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX4 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm.

### 4.1.3 Consumo alimentar

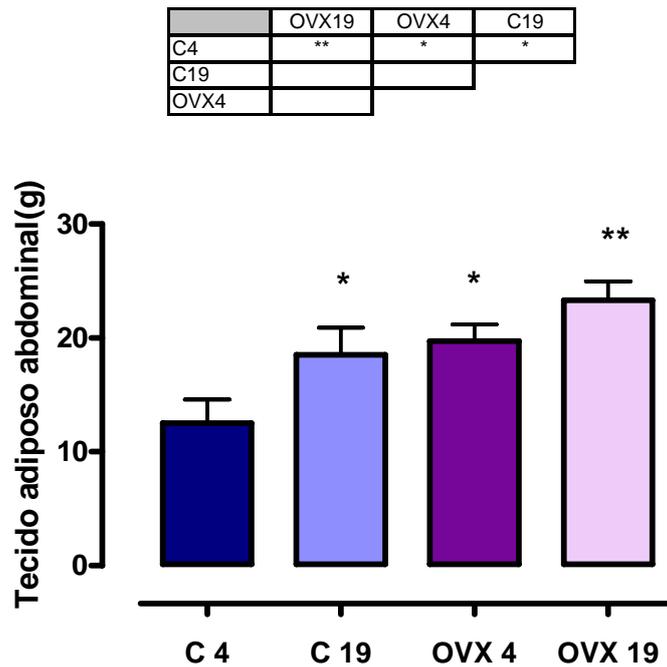
A ingestão alimentar média dos animais aos 90 dias foi de  $15,0 \pm 2,00$  g, e aumentou gradativamente com o tempo experimental para um consumo de  $17,8 \pm 0,46$  g. A evolução de o consumo alimentar dos animais a partir da ovariectomia até o final do período experimental, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais C4, OVX4, C19 e OVX19, Gráfico 3.



**Gráfico 3:** Evolução da ingestão alimentar entre os 90 e 155 dias nas ratas C 4 (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX4 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica).

#### 4.1.4 Massa de tecido adiposo

A massa de tecido adiposo abdominal foi significativamente maior nos grupos C19, OVX4 e OVX19 (C19 =  $18,51 \pm 2,40$ g; OVX4 =  $19,72 \pm 1,45$ g; OVX19 =  $23,33 \pm 1,63$ g) quando comparados ao grupo C4 ( $12,5 \pm 2,08$ g). Sendo a diferença entre OVX19 e C4 a mais significativa ( $p < 0,0001$ ). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 4.

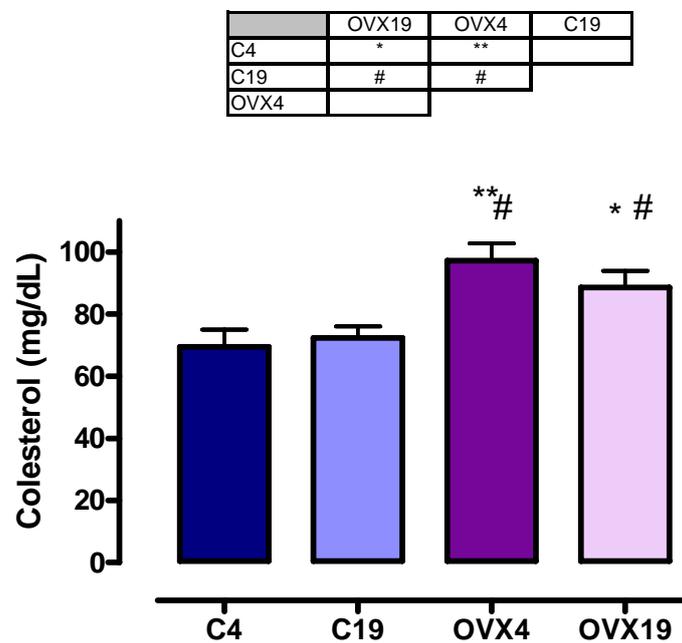


**Gráfico 4:** Evolução da massa de tecido adiposo entre os 90 e 155 dias nas ratas C (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls), \*  $P < 0,05$ , C4 vs C19 C4 vs OVX4. \*\*  $P < 0,001$ , C4 vs OVX19.

## 4.2 Avaliações séricas

### 4.2.1 Colesterol

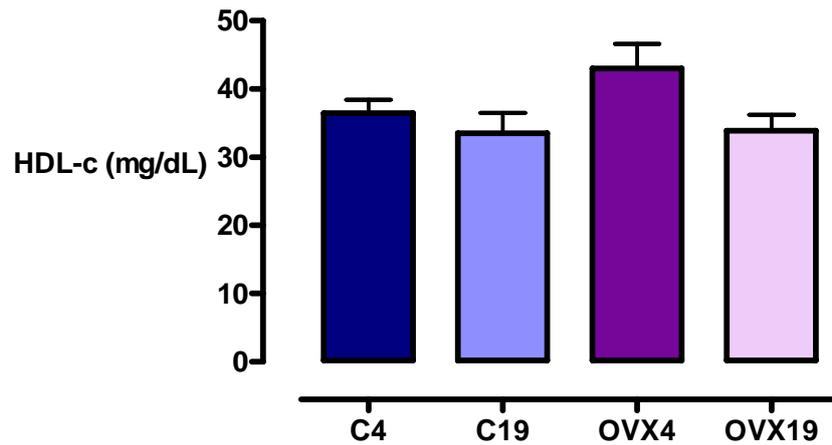
A avaliação das concentrações séricas do colesterol mostrou um aumento significativo nos grupos ovariectomizados (OVX4 = 97,26±5,4mg/dL; OVX19 = 88,60±5,35mg/dL), quando comparados aos controles (C4 = 69,42±5,63mg/dL; C19 = 72,34±3,65mg/dL). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 5.



**Gráfico 5:** Análise sérica de colesterol ao término do período experimental, 155 dias de idade, nas ratas C4 (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. # \* P<0,05, \*\* P<0,001 (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls), \*\*C4 vs OVX4; \*C4 vs OVX19; #C19 vs OVX4 e #C19 vs OVX19.

#### 4.2.2 HDL-colesterol

Não houve diferença significativa para as concentrações séricas de HDL-c entre os grupos experimentais (C=36,48±1,98mg/dL; C19=33,50±3,02mg/dL; OVX=3,04±3,578mg/dL e OVX19= 33,89±2,350mg/dL). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 6.

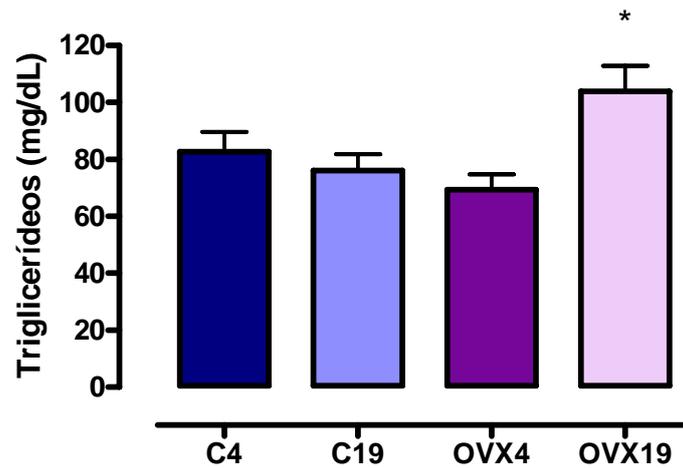


**Gráfico 6:** Análise sérica do HDL-colesterol ao término do período experimental (150 dias), nas ratas C (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica).

### 4.2.3 Triglicerídeo

Não houve diferença significativa para as concentrações séricas de triglicerídeos entre os grupos C4, C19 e OVX4 (C4=82,69±7,05mg/dL; C19=76,07±5,79mg/dL; OVX4=69,33±5,42mg/dL). O grupo OVX19 (104,0±8,87mg/dL) este apresentou aumento significativo em relação aos demais (p<0, 005). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 7.

	OVX19	OVX4	C19
C4	*		
C19	*		
OVX4	*		

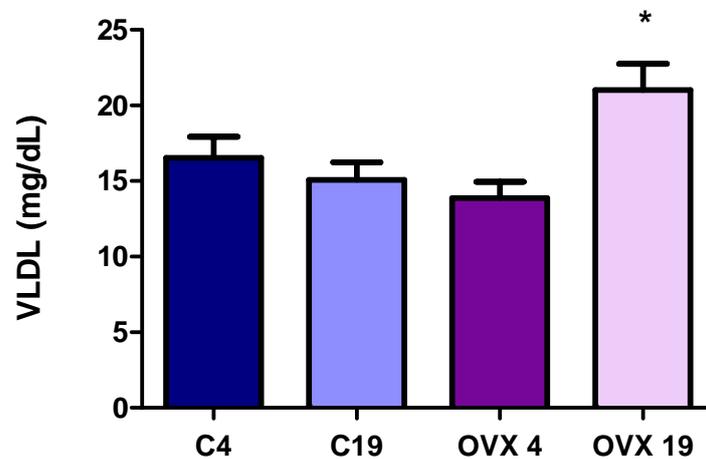


**Gráfico 7:** Análise sérica dos triglicerídeos em ratas com 155 dias, nas ratas C (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. P<0,05 (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls),\* OVX19 vs C4; C19; OVX4.

#### 4.2.4 VLDL

As concentrações séricas de VLDL mostraram aumento significativo no grupo OVX19 ( $21,4 \pm 1,8$  mg/dL) em relação aos demais (C4=  $16,5 \pm 1,4$ ; OVX4=  $15,2 \pm 1,2$ ; C19=  $14 \pm 1,1$  mg/dL). Esses resultados são mostrados no Gráfico 8.

	OVX19	OVX4	C19
C4	*		
C19	*		
OVX4	*		

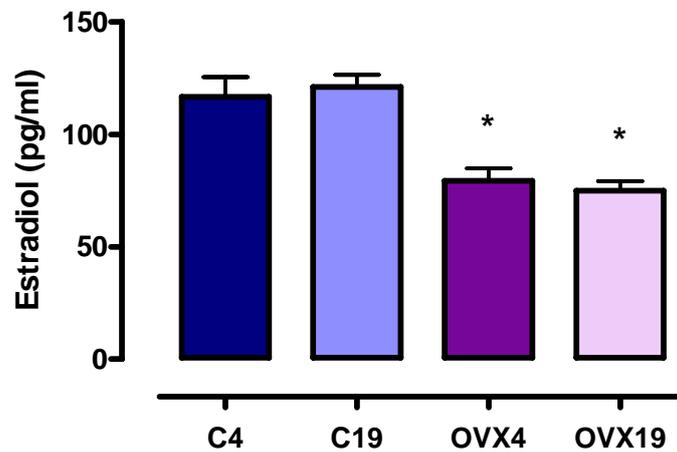


**Gráfico 8:** Avaliações de VLDL-c aos 155 dias de idade nas ratas C 4 (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX 4 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. \* P<0,05 (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni),\* OVX19 vs; C4, C19, OVX4.

#### 4.2.5 Estradiol

As concentrações séricas do Estradiol apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,005$ ) nos grupos ovariectomizados (OVX4=79,20±5,5pg/ml; OVX19= 75,0±4,1pg/ml), quando comparados aos controles (C4=116,0±8,9pg/,1; C19%= 121 ±5,4pg/ml). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 9.

	OVX19	OVX4	C19
C4	*	*	
C19	*	*	
OVX4			

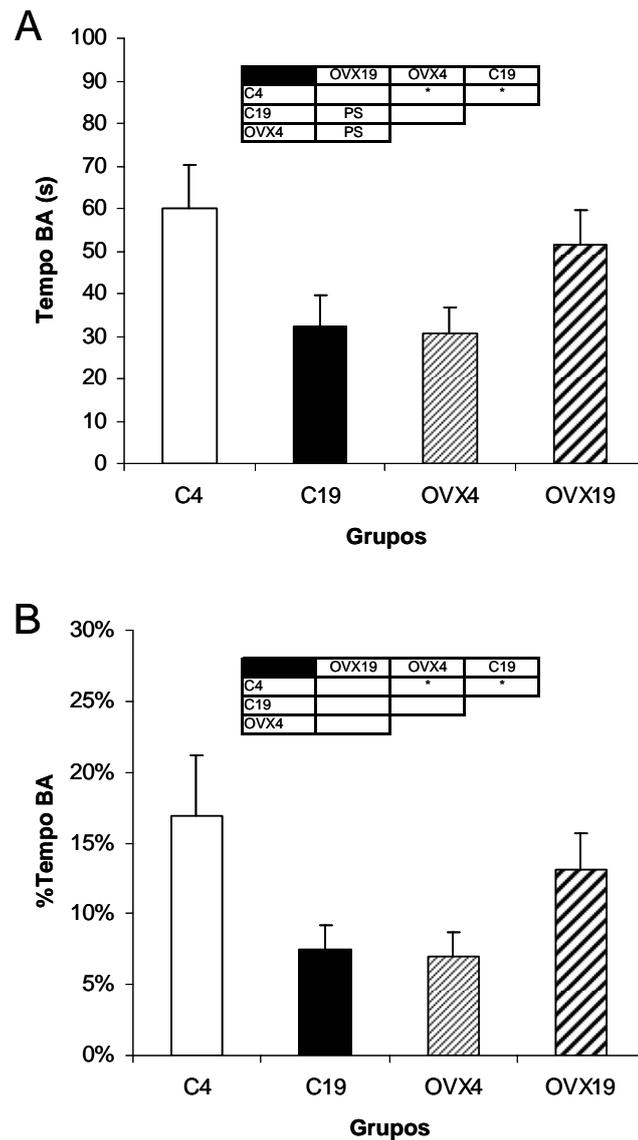


**Gráfico 9:** Análise sérica do estradiol em ratos com 150 dias, nas ratas C (n=29, controle alimentada com dieta normo-lipídica), OVX (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta normo-lipídica), C19 (n=30, controle alimentada com dieta hiperlipídica) e OVX19 (n=30, ovariectomizada alimentada com dieta hiperlipídica). Valores são apresentados em média±epm. \*  $P < 0,05$  (ANOVA univariada, seguida do pós-teste Newnam-Keuls),\* C4 vs OVX; C19 vs OVX19; C4 vs OVX19; C19 vs OVX4.

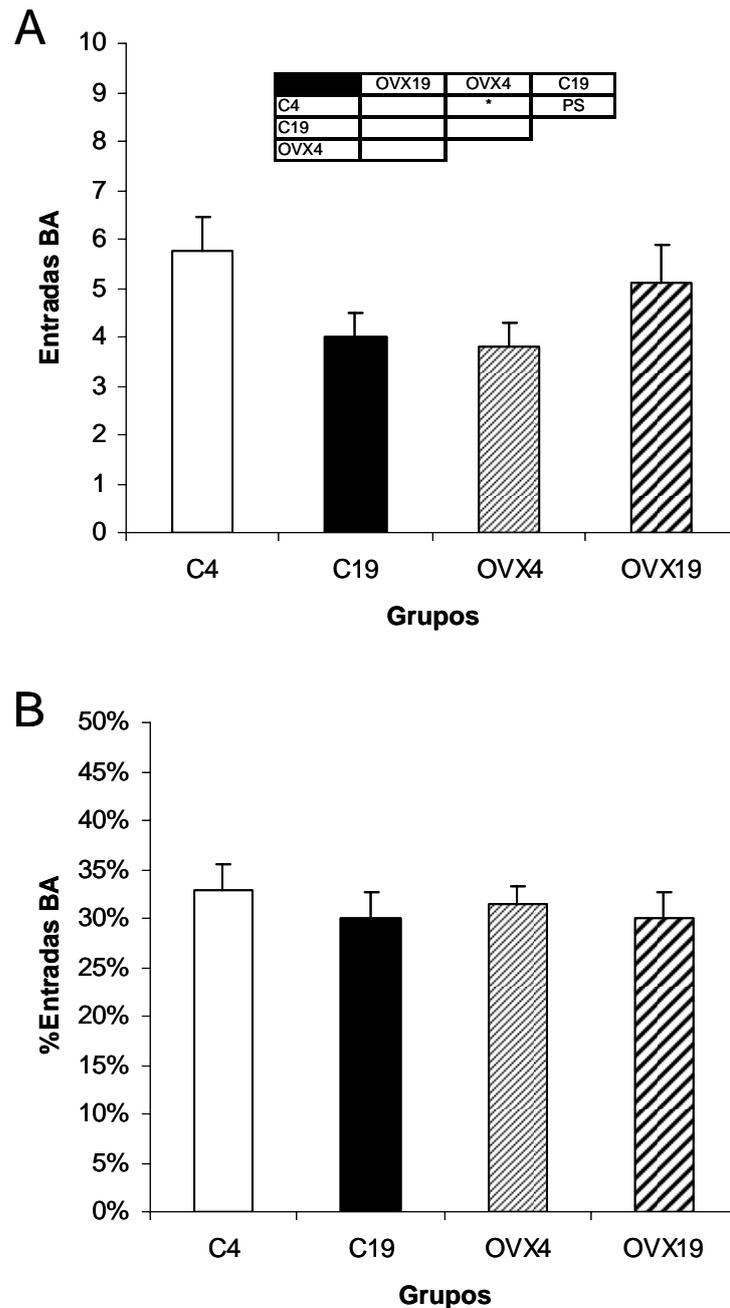
### 4.3 Avaliações comportamentais

#### 4.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

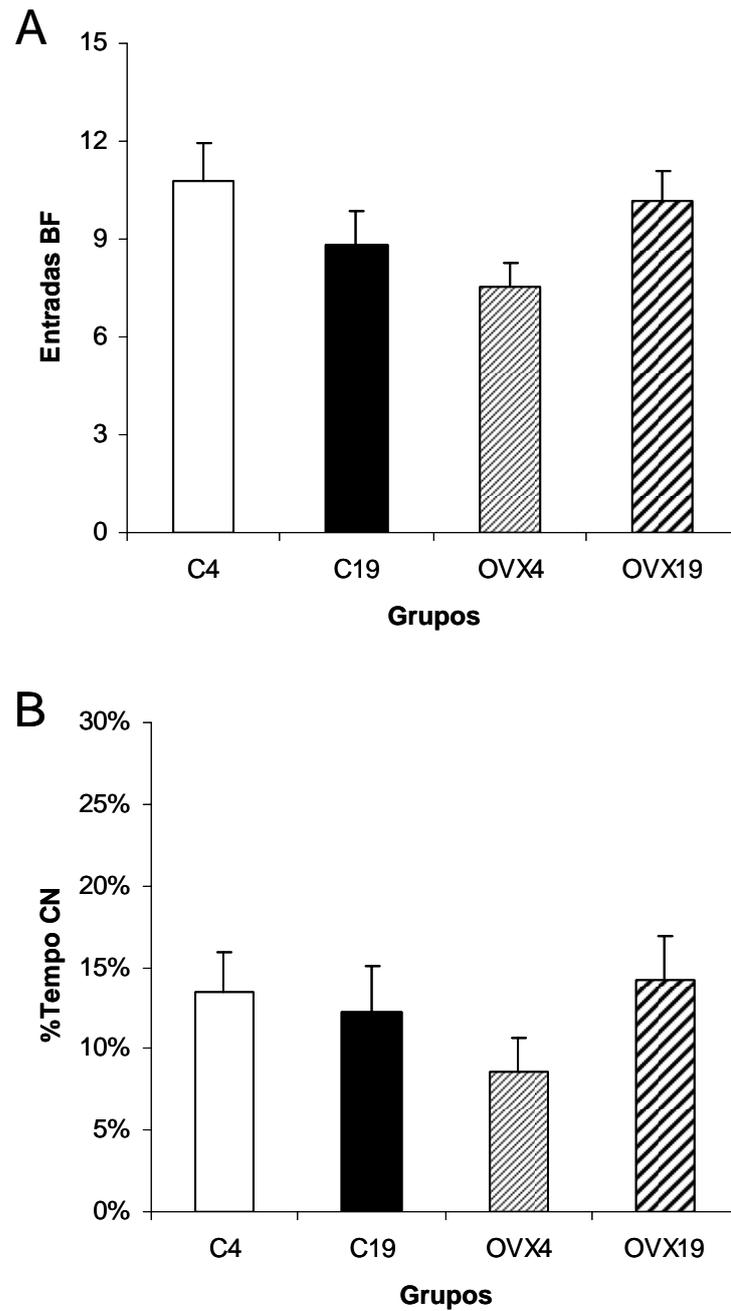
A mANOVA indicou interações OVARIETOMIA×DIETA significativas para as seguintes variáveis do LCE: Tempo BA ( $F = 8,8$ ; g.l. = 1;  $P = 0,004$ ), %Tempo BA ( $F = 7,9$ ; g.l. = 1;  $P = 0,006$ ) e Entradas BA ( $F = 5,6$ ; g.l. = 1;  $P = 0,02$ ). Para o Tempo BA (Gráfico 10.A) a interação pode ser explicada pelo fato de que enquanto para o grupo submetido à dieta de 4% houve uma redução no tempo de permanência no braço aberto como resultado da ovariectomia, no grupo submetido à dieta hiperlipídica (19%) observou-se uma tendência de aumento no tempo de permanência como resultado do OVARIETOMIA. Aproximadamente o mesmo padrão de resultados explica a interação observada para a variável %Tempo BA (Gráfico 10.B), embora as diferenças par-a-par associadas ao grupo OVX19 não sejam significativas. Para a variável Entradas BA (Gráfico 11), a interação pode ser explicada pelo fato de que no grupo controle a dieta hiperlipídica leva a uma redução dos valores observados, sendo que o mesmo efeito não é visto para o grupo submetido à ovariectomia. Para as variáveis Entradas BF e percentual de tempo no centro (% tempo CN) não foram observadas diferenças significativas (Gráfico12).



**Gráfico 10.** A) Tempo de permanência no braço aberto (Tempo BA) no LCE. 10B) Percentual de tempo de permanência no braço aberto (%Tempo BA) no LCE. Notar que, em ambos os gráficos, a redução nos valores observadas no grupo submetido à dieta de 4% como resultado da ovariectomia não está presente nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. O quadro inserido no corpo do gráfico indica o resultado das comparações par-a-par (FPLSD). C4: grupo controle com dieta de 4%; C19: grupo controle com dieta de 19%; OVX4: grupo ovariectomizado com dieta de 4%; OVX19: grupo ovariectomizado com dieta de 19%; PS =  $0,10 < P \leq 0,05$ ; \* =  $P < 0,05$ .

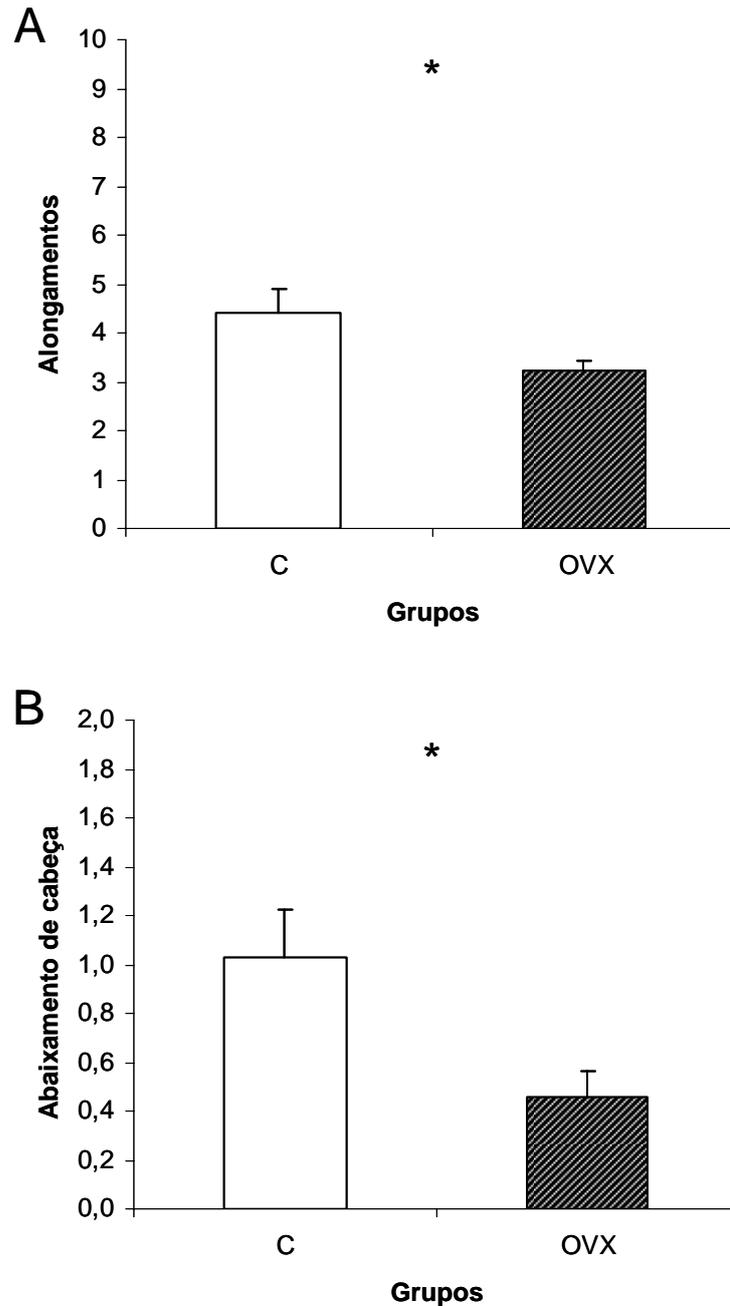


**Gráfico 11.** A) Entradas no braço aberto (Entradas BA) no LCE. 11B) Percentual de entradas no braço aberto (%Entradas BA) no LCE. Notar que, para o gráfico superior, a redução nos valores observadas no grupo submetido à dieta de 4% como resultado da ovariectomia não está presente nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. O quadro inserido no corpo do gráfico indica o resultado das comparações par-a-par (FPLSD). C4: grupo controle com dieta de 4%; C19: grupo controle com dieta de 19%; OVX4: grupo ovariectomizado com dieta de 4%; OVX19: grupo ovariectomizado com dieta de 19%; PS = 0,10 < P ≤ 0,05; \* = P < 0,05.



**Gráfico 12.** A) Entradas no braço fechado (Entradas BF) no LCE. B) Percentual de tempo no centro (%Tempo CN) do LCE. Para ambas as variáveis não foram observadas diferenças significativas entre grupos. C4: grupo controle com dieta de 4%; C19: grupo controle com dieta de 19%; OVX4: grupo ovariectomizado com dieta de 4%; OVX19: grupo ovariectomizado com dieta de 19%.

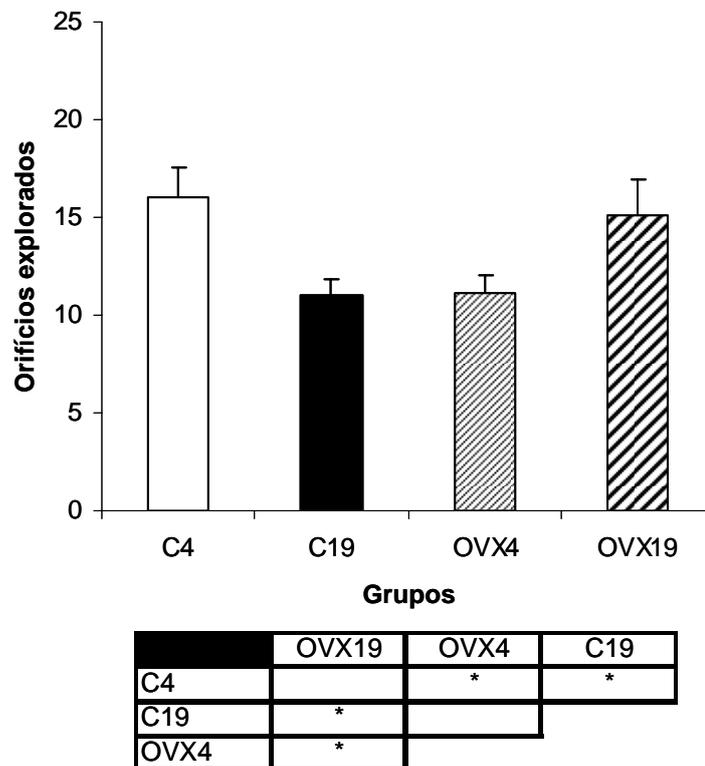
Quanto às variáveis etológicas, foram observados efeitos significativos do OVARECTOMIA para o comportamento de alongamentos (mANOVA:  $F = 4,7$ ; g.l. = 1;  $P = 0,031$ ) e de abaixamento de cabeça (mANOVA:  $F = 6,8$ ; g.l. = 1;  $P = 0,01$ ). Nos dois casos, como pode ser observado a partir do Gráfico 13, a ovariectomia reduziu a expressão dos comportamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos para os outros comportamentos.



**Gráfico 13.** A) Número de alongamentos no LCE. B) Número de abaixamentos com a cabeça no LCE. Notar que nos dois casos, a ovariectomia reduz o número de vezes que os comportamentos são expressos. C; grupo controle; OVX: grupo ovariectomizado; \* =  $P < 0,05$ .

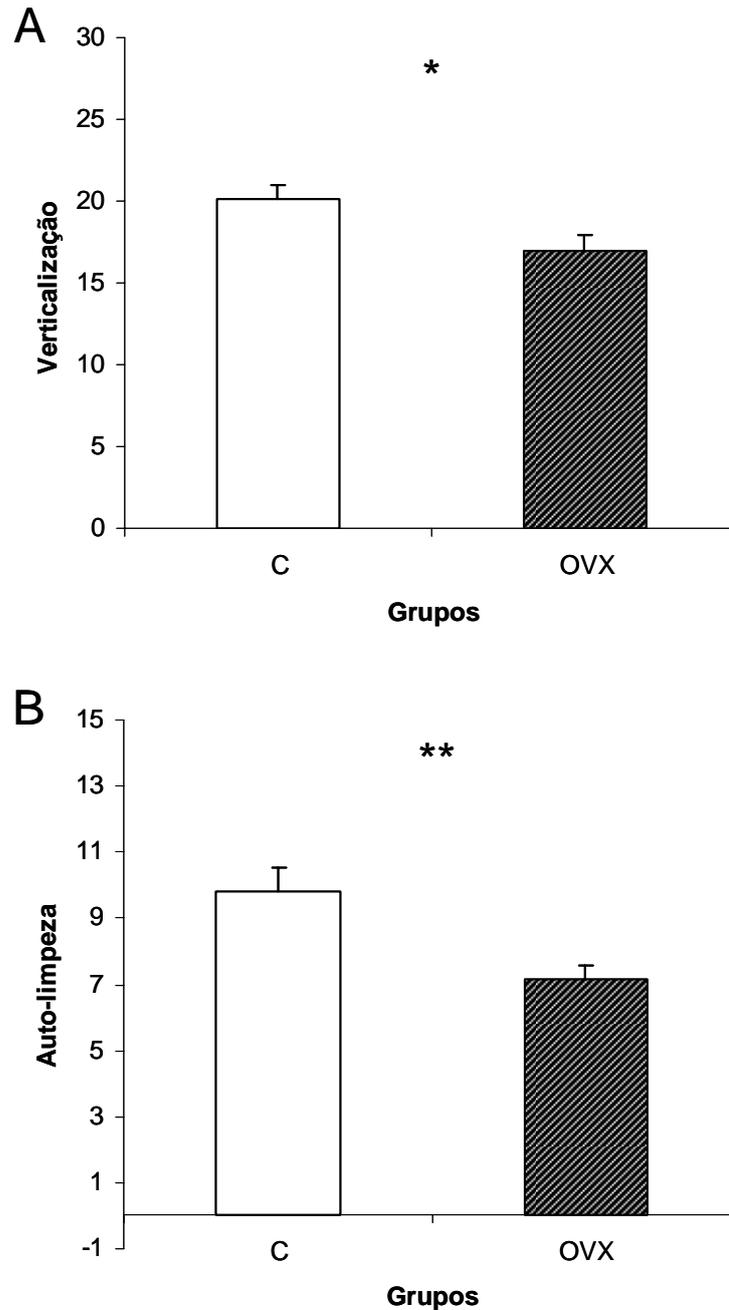
#### 4.2.2 Campo vazado (CV)

Com relação ao número de orifícios explorados a uANOVA indicou uma interação OVARIETOMIA×DIETA significativa ( $F = 10,3$ ; g.l. = 1;  $P = 0,002$ ). Tal como indicado no Gráfico 14, a interação entre OVARIETOMIA e DIETA pode ser explicada pelo fato de que para o grupo alimentado com dieta normal (4%) a ovariectomia causa redução da atividade de busca por novos estímulos (FPLSD:  $P = 0,015$ ), enquanto que para o grupo alimentado com a dieta hiperlipídica (19%), a ovariectomia leva ao aumento desta atividade (FPLSD:  $P = 0,039$ ). É relevante notar que a dieta hiperlipídica causa uma redução da atividade no grupo C (FPLSD:  $P = 0,014$ ) e, por outro lado, um aumento desta atividade no grupo OVX (FPLSD:  $P = 0,044$ ).



**Gráfico 14.** Número de orifícios explorados no CV. A dieta hiperlipídica provoca uma redução na exploração de orifícios em animais do grupo controle. Por outro lado, a dieta hiperlipídica provoca um aumento na expressão deste comportamento em animais ovariectomizados. O quadro abaixo do gráfico apresenta o resultado das comparações par-a-par (FPLSD). C4: grupo controle com dieta de 4%; C19: grupo controle com dieta de 19%; OVX4: grupo ovariectomizado com dieta de 4%; OVX19: grupo ovariectomizado com dieta de 19%; \* =  $P < 0,05$ .

Quanto às variáveis etológicas, foram observados efeitos significativos da OVARIETOMIA para o comportamento de verticalização (mANOVA:  $F = 5,2$ ; g.l. = 1;  $P = 0,024$ ) e de auto-limpeza (mANOVA:  $F = 10,4$ ; g.l. = 1;  $P = 0,002$ ). Nos dois casos, como pode ser observado a partir do Gráfico 15. A ovariectomia reduziu a expressão dos comportamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos para os outros comportamentos.



**Gráfico 15.** A) Número de verticalizações no CV. B) Número de auto-limpezas no CV. Notar que nos dois casos, a ovariectomia reduz o número de vezes que os comportamentos são expressos. C; grupo controle; OVX: grupo ovariectomizado; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ .

#### 4.2.3 Labirinto aquático radial de 8 braços (LAROBS)

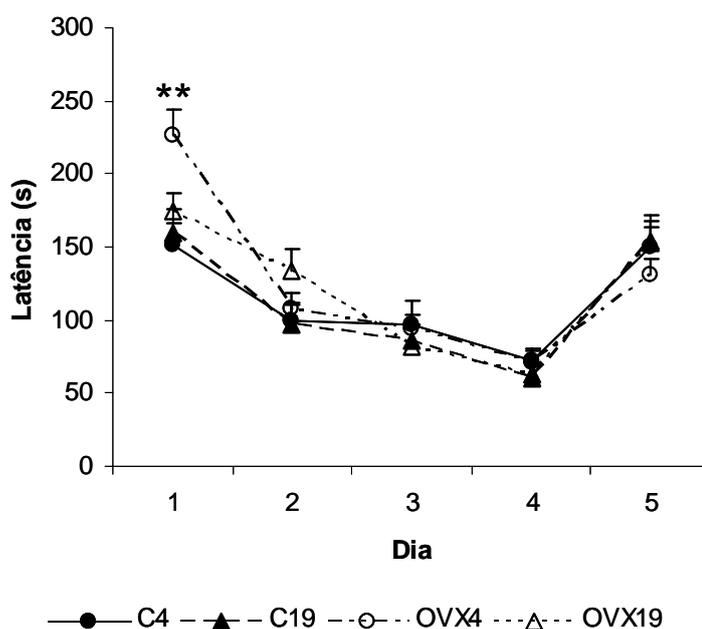
Com relação aos 4 primeiros dias de teste no LAROBS, a rANOVA indicou efeitos significativos do OVARIECTOMIA ( $F = 4,5$ ; g.l. = 1;  $P = 0,036$ ), do DIA ( $F = 68,8$ ; g.l. = 2,6;  $P < 0,001$ ) e TESTE ( $F = 36,0$ ; g.l. = 2,7;  $P < 0,001$ ) e também as seguintes interações significativas: OVARIECTOMIA×DIA ( $F = 3,7$ ; g.l. = 2,6;  $P = 0,016$ ); OVARIECTOMIA×DIETA×DIA ( $F = 2,6$ ; g.l. = 2,6;  $P = 0,059$ ), DIETA×TESTE ( $F = 3,1$ ; g.l. = 2,7;  $P < 0,033$ ) e DIETA×DIA×TESTE ( $F = 3,7$ ; g.l. = 6,3;  $P < 0,001$ ). Tal como indicado no Gráfico 16. O efeito do DIA pode ser explicado pela melhora progressiva e significativa do desempenho do primeiro ao quarto dia de teste (FPLSD:  $P < 0,01$  em todas as comparações par-a-par). Para um mesmo dia de teste, a melhora significativa no desempenho de uma TESTE para a próxima explica o efeito de TESTE.

O efeito do OVARIECTOMIA pode ser explicado pelo fato de que o desempenho global do grupo OVX (independentemente da dieta) foi pior do que o do grupo C. A interação OVARIECTOMIA×DIA pode ser explicada pelo fato de que o grupo OVX, apesar do desempenho inicialmente pior do que o grupo C no primeiro dia, apresentou uma melhora mais acentuada no desempenho do primeiro para o segundo dia. Para prosseguir a análise da interação OVARIECTOMIA×DIETA×DIA, inicialmente dividimos os grupos experimentais em função do OVARIECTOMIA. Assim, rANOVAs usando apenas DIETA como fator foram realizadas separadamente para os dois subgrupos (dieta 4% e 19%) do grupo controle e para os dois do grupo ovariectomizado. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois subgrupos controle no perfil do aprendizado ao longo dos 4 dias de teste. Porém, para o grupo OVX, foi observada uma interação DIETA×DIA significativa ( $F = 4,1$ ; g.l. = 2,6;  $P = 0,011$ ). Esta interação pode ser explicada pelo fato de que no primeiro dia de teste o grupo OVX4 apresenta um resultado significativamente pior do que o do grupo OVX19 (FPLSD:  $P = 0,021$ ), diferença esta que não está presente nos dias subsequentes de teste, indicando uma melhora mais acentuada no desempenho do grupo OVX4 do primeiro para o segundo dia. Em uma segunda sequência de análise, os grupos experimentais foram divididos em função da dieta. Assim, rANOVAs usando apenas OVARIECTOMIA como fator foram realizadas para os dois subgrupos (controle e ovariectomizado) do grupo dieta 4% e para os dois do dieta 19%. Não houve diferenças significativas entre os subgrupos C e OVX alimentados com a dieta de 19%. Por outro lado, para o grupo alimentado com uma dieta de 4% foi observada uma interação OVARIECTOMIA×DIA significativa ( $F = 5,1$ ; g.l. = 2,3;  $P = 0,005$ ) e um efeito do OVARIECTOMIA ( $F = 3,0$ ; g.l. = 1;  $P = 0,087$ ) que se aproximava da significância.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a latência média do grupo OVX4 no primeiro dia é significativamente pior (FPLSD:  $P = 0,001$ ) do que a do grupo C4, sendo que ocorre uma recuperação de desempenho nos dias subsequentes, de tal modo que diferenças significativas não são mais encontradas a partir do segundo dia de testes.

Com relação ao *probe trial*, a rANOVA indicou apenas o efeito significativo da TESTE ( $F = 36,0$ ; g.l. = 2,7;  $P < 0,001$ ). Este efeito pode ser explicado pela progressiva redução na latência para encontrar a plataforma submersa ao longo das quatro TESTES realizadas no quinto dia de teste (FPLSD:  $P < 0,01$  em todas as comparações par-a-par).

Consolidando-se a análise, pode-se sugerir que a dieta não afeta o desempenho no LAROB no grupo controle, mas que a utilização de uma dieta enriquecida (19%) evita a deficiência observada no primeiro dia para o grupo ovariectomizado com a dieta normal. Por outro lado, tendo em vista a melhora acentuada do desempenho do grupo OVX4 do primeiro para o segundo dia de testes, não são mais observadas diferenças significativas a partir deste ponto.



**Gráfico 16.** Latência para encontrar a plataforma submersa no LAROB. Pode-se notar que em todos os grupos ocorre uma redução progressiva na latência para encontrar a plataforma submersa do primeiro para o quarto dia. Para o primeiro dia de testes, o grupo OVX4 apresenta latência média maior do que a dos outros grupos. Com a melhora mais acentuada de desempenho apresentada por este grupo do primeiro para o segundo dia de testes, não são mais observadas diferenças de desempenho a partir deste ponto. C4: grupo controle com dieta de 4%; C19: grupo controle com dieta de 19%; OVX4: grupo ovariectomizado com dieta de 4%; OVX19: grupo ovariectomizado com dieta de 19%; \*\* =  $P < 0,01$ .

## 5. DISCUSSÃO

O aumento da longevidade vem elevando a ocorrência das alterações degenerativas comuns à terceira idade. Para as mulheres, somada a idade, a menopausa é um fator crítico para o bem estar, pois elas passam a viver mais com os efeitos da perda da função gonadal. Além de influenciar a reprodução, os esteróides sexuais modulam vários processos fisiológicos, como a distribuição de tecido adiposo, o metabolismo lipídico e alguns mecanismos comportamentais. Como cerca de 15% da população mundial já estão acima dos 60 anos de idade, o desenvolvimento desses distúrbios vai se tornando cada vez mais aparente (RYMER & MORRIS, 2000; RINALDI, 2004).

Durante o processo evolutivo os seres humanos vêm modificando seus hábitos nutricionais. Alterações no comportamento alimentar das populações, determinadas pela grande oferta de alimentos vem favorecendo a transição da fase de desnutrição para a fase de obesidade, tendo em vista que a quantidade vem substituindo a qualidade dos alimentos. Na sociedade ocidental atual, o elevado consumo energético, de refeições ricas em lipídios e carboidratos, expõe os indivíduos a um tipo de alimentação que os torna menos saudáveis. A alta incidência de sobrepeso e obesidade, não apenas em adultos, mas também em adolescentes e crianças se tornou um problema de saúde pública, por elevar o risco de doenças crônico-degenerativas. Incluindo-se aí os efeitos adversos sobre o SNC, causados pela alteração da composição de ácidos graxos da membrana plasmática (HOFBAUER e cols, 1999; KRAHE, 2003; RAISZ, 2005; WIREN, 2005; LACATIVA & FARIAS, 2006; FITZPATRICK, 2006; BRAY, 2007; WAKE, 2007; HUANLING e cols, 2009). Assim, em conjunto, a perda da função gonadal e a ingestão excessiva de alimentos ricos em lipídios contribuem para o desenvolvimento mais precoce de efeitos deletérios a saúde que levam a perda da qualidade de vida (RAPP e cols, 2003).

A deficiência de esteróides sexuais, determinada pela remoção bilateral dos ovários, é uma prática experimental bastante comum para simular a menopausa (MOREIRA e cols, 1997; ARMADA e cols, 2006; KORSE e cols, 2009). A eficiência do modelo foi confirmada pelas baixas concentrações séricas de estradiol que podem ser justificadas pela conversão periférica de androgênios provenientes da glândula supra-renal, principalmente no tecido adiposo. Esse mecanismo, portanto, contribui para manter concentrações séricas de estradiol detectáveis nos grupos OVX e OVX19.

Dietas hiperlipídicas podem ser preparadas com base em lipídios de origem animal ou vegetal e nas mais diversas concentrações (WARDEN & FISLER, 2008; NA e cols, 2008;

RIANT e cols, 2009). Em nosso estudo, a ração foi preparada seguindo as recomendações do AIN-93M, utilizando como fonte lipídica o óleo de soja, que é o óleo vegetal de maior consumo por todas as camadas sociais brasileiras (DEL RÉ e cols, 2006). Em estudo anterior, utilizando ratos machos jovens, verificamos que essa dieta era palatável pela manutenção da ingestão alimentar (COSTA e cols, 2009).

Embora estudos relatem aumento da ingestão alimentar e conseqüentemente da massa corporal após ovariectomia em roedores (ratas e camundongos) (WADE, 1972; WALLEN e cols, 2001; GEARY, 2004; ASSARIAN & GEARY, 2006), no presente estudo não encontramos diferenças quanto à ingestão entre controles e ovariectomizadas, na presença ou ausência da dieta hiperlipídica. Apesar disso, maior ganho de massa corporal foi observado nas OVX e, principalmente, quando a deficiência hormonal estava associada à dieta hiperlipídica. O processo fisiológico de controle da ingestão alimentar parece também estar relacionado aos efeitos dos esteróides gonadais como a testosterona, o estradiol e a progesterona sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (PFAFF e cols, 2002). Em roedores fêmeas e em mulheres em fase reprodutiva, estudos demonstram uma forte correlação entre a fase do ciclo estral ou menstrual e a ingestão. Nos animais, na fase peri-ovulatória, ou seja, estro em ratas e camundongos, ocorre menor ingestão do que nas demais fases do ciclo, o que pode ser explicado pelas mudanças na secreção de estrogênio. Em contrapartida, as mulheres ingerem mais alimentos durante a fase luteal, possivelmente explicada pela manutenção de concentrações moderadas de estrogênio e altas de progesterona (GEARY, 2006; GEARY & CORWIN, 2008; HONG e cols, HUANLING e cols, 2009). Em nosso modelo, é possível que nas ratas ovariectomizadas, as concentrações de estradiol, apesar de baixas, sejam suficientes para manter a ingestão. Enquanto, a presença do óleo vegetal pode estar causando saciedade (PRENTICE & DOPPITT, 1996; HARROLD e cols, 2000), mantendo assim, a ingestão média diária de ração similar entre os grupos. Estudo realizado em camundongos alimentados com dieta normolipídica, contendo óleo de palma ou dieta enriquecida com ácido DHA, não evidenciou diferença na ingestão entre os grupos. Corroborando com nossos resultados, visto que o óleo de soja é rico em DHA (LIM & SUZUKI, 2001).

Os estrógenos são considerados reguladores importantes do desenvolvimento e da deposição lipídica no tecido adiposo em humanos, em roedores e em outras espécies (PAQUETE e cols, 2007). Na sua ausência, tanto em mulheres após a menopausa quanto em modelos experimentais baseados na remoção bilateral dos ovários, o aumento de massa corporal, a redistribuição e o aumento de tecido adiposo em região abdominal são bastante característicos (ARABI e cols, 2003; ARMADA e cols, 2006). Verificamos que 45 dias após

a perda gonadal as ratas OVX4 apresentaram aumento da massa corporal, quando comparadas as C4, como previamente descrito por ARMADA (2009) após períodos crônicos de castração. No entanto, quando deficiência gonadal foi associada à dieta hiperlipídica, o aumento significativo de massa corporal apareceu a partir do sétimo dia. O ganho da massa corporal nos grupos OVX4, OVX19 e C19 está diretamente relacionado à massa de tecido adiposo intra-abdominal verificada por pesagem.

A mudança na deposição de gordura decorrente da falência gonadal parece estar relacionada à alteração no ER $\alpha$ . Estudos realizados com camundongos nocaute para o ER $\alpha$  mostraram que os estrógenos regulam diretamente a quantidade de tecido adiposo em fêmeas, através da regulação da expressão desses receptores (HEINE e cols, 2000). De acordo com BROWN & CLEGG (2009) e COOKE & NAAZ (2004), o ganho de massa corporal é determinado pela através de ações genômicas de estrógenos, que regulam o desenvolvimento corporal e o tecido adiposo intra-abdominal. Assim, o ganho observado no grupo C19 mantém correlação com o conteúdo energético da dieta, que foi capaz de gerar uma resposta sobre a massa adiposa semelhante ao verificado na deficiência gonadal.

As dietas hiperlipídicas e a deficiência de esteróides gonadais, em particular a deficiência de estrógenos, além de favorecerem o aumento da adiposidade, causam dislipidemia. Em nossos grupos experimentais, detectamos aumento sérico de triglicerídeos e VLDL-c quando os dois fatores foram associados. No entanto, a simples deficiência dos hormônios sexuais já causou o aumento do colesterol. Apesar dessas alterações, as concentrações séricas de HDL-c se mantiveram, fator que protege o leito vascular do acúmulo de colesterol. O perfil lipídico observado está associado à ausência de estrógeno, mas, também a dieta hiperlipídica. A manutenção das concentrações séricas de HDL-c pode ser justificada pelas dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados e pela presença de estrógeno, os quais são também capazes de reduzir as concentrações de LDL-c (lower density lipoprotein cholesterol) (FOTHERBY, 1998; BITTNER, 2001; WELTY, 2001; HUANLING e cols, 2009), que não foram avaliadas. Portanto, ficou confirmada a influência deletéria da deficiência estrogênica sobre os lipídios séricos, em particular quando está associada ao consumo excessivo de ácidos graxos poliinsaturados.

O comportamento associado à ansiedade, o interesse na busca por novidade e a aquisição memória/aprendizagem foram verificados a partir da utilização dos testes comportamentais do labirinto em cruz elevado (LCE), de campo vazado (CV) e do labirinto aquático radial de oito braços (LARO) respectivamente. A análise do comportamento associado à ansiedade no LCE, os resultados sugerem que a ovariectomia apresenta um efeito

ansio gênico que parece ser revertido pela dieta hiperlipídica, sugerindo que esta dieta é capaz de compensar os efeitos deletérios da redução dos níveis de hormônios sexuais. Curiosamente, os efeitos da dieta hiperlipídica isoladamente, não associada à ovariectomia, parecem ser ansio gênicos, embora se deva dizer que estes foram menos evidentes dos que os observados para a ovariectomia isoladamente. Os efeitos da ovariectomia no comportamento apresentado no LCE parecem específicos para os parâmetros associados à ansiedade, uma vez que tanto os parâmetros associados à atividade (Entradas BF) e às tomadas de decisão (%Tempo CN) não foram afetados pela castração. O resultado de ansiedade é corroborado por estudo anterior que, utilizando fêmeas ovariectomizadas tratadas ou não com estradiol, não verificou diferença de desempenho motor entre os grupos (WALF e cols, 2007).

Para as variáveis etológicas de alongamento do corpo e abaixamento de cabeça foram evidenciadas associações apenas com o OVARIECTOMIA, sem interferência do conteúdo da dieta. Ou seja, a ovariectomia diminui a capacidade exploratória (WALF e cols, 2006).

Na literatura já foi descrito que tanto em mulheres menopausadas quanto em ratas ovariectomizadas (LUND e cols, 2005; WALF e cols, 2006) a ansiedade e a depressão estão mais evidentes, confirmando a participação dos esteróides sexuais sobre desordens do humor (HILL e cols, 2007). Em relação à influência de ácidos graxos poliinsaturados sobre a ansiedade, até onde pudemos verificar não existem relatos na literatura utilizando dietas hiperlipídicas cujo conteúdo apresenta a relação  $\omega 3/\omega 6$ , igual a do óleo de soja. Por outro lado, FRANCÈS e cols (1995) utilizando dieta deficiente em  $\omega 3$  verificaram que ratos machos e fêmeas apresentaram comportamento associado a ansiedade menos intenso que aqueles alimentados com dieta contendo níveis normais de  $\omega 3$ . O aumento da ingestão de gorduras saturadas, gorduras trans e de ácido linoléico  $\omega -6$  e a redução de ácido linolênico ( $\omega -3$ ) na civilização ocidental, nos últimos cem anos, tem contribuído para o aumento na ocorrência de distúrbios de humor (DANGOUR e cols, 2006).

No campo vazado, o menor número de orifícios explorados demonstra que a ingestão de dieta hiperlipídica (C19) assim como a ovariectomia (OVX19) desencadeiam uma redução da atividade comportamental associada à busca por novos estímulos. Adicionalmente, observamos uma interação entre a ovariectomia e a dieta na resposta quanto a busca pela novidade. O grupo OVX19 apresentou uma atividade exploratória semelhante à do grupo C4, indicando uma reversão dos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica ou da ovariectomia quando da associação dos dois procedimentos. Interessantemente, tal como no LCE, as variáveis etológicas, particularmente de verticalização e de autolimpeza, foram afetadas pela castração, mas, não pela dieta. É possível, que o consumo excessivo de DHA, esteja

exercendo um efeito similar ao do estrogênio, regulando, portanto, a atividade exploratória de forma satisfatória. Nossos resultados estão de acordo com os relatos de WALF (2007), que utilizando dieta rica em DHA em ratas ovarietomizadas perceberam o aumento da busca pela novidade dos animais avaliada pelo teste CV. elSATTAR elBALTRAN (2001) por suas observações sobre o epitélio vaginal de ratas, também acreditam que a dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados possa suprir e agir de forma similar ao estradiol.

A avaliação comportamental da ratas pelo LAROB evidenciou o pior desempenho do grupo OVX4 para encontrar a plataforma apenas no primeiro dia. Como não houve diferenças de desempenho entre os grupos C4 e o OVX19, pode-se concluir que a dieta hiperlipídica foi capaz de reverter os efeitos deletérios da castração observados no primeiro dia de testes, embora esta dieta, isoladamente não tenha afetado o comportamento. Já foi sugerido que o estrogênio favorece um aumento na densidade dendrítica e atue na remodelação sináptica favorecendo o aumento das sinapses nervosas (SANDSTROM & WILLIAMS, 2004; PARDUCZ e cols, 2006). Assim sendo, a castração prejudicaria diretamente mecanismos de plasticidade neural que são fundamentais para a formação de memória e a dieta hiperlipídica seria capaz de suprir a deficiência hormonal no que diz respeito a esse parâmetro comportamental. Em animais, dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados elevam as concentrações de DHA e EPA, favorecendo desta forma a composição de fosfolipídios da membrana em neurônios e promovendo a melhora do aprendizado e memória sem alterar a composição lipídica do encéfalo (LIM & SUZUKI, 2001; HUANLING e cols, 2009). Por outro lado, dieta rica em ácidos graxos saturados, retarda o crescimento e diminui a capacidade de aprendizagem (WAINWRIGHT e cols, 1999). A ingestão de dieta deficiente apenas em  $\omega$ -3 não é suficiente para determinar alteração de comportamento no LAROB, mas leva a redução de 50% de DHA no encéfalo, sugerindo que este efeito pode ser específico na memória de curto prazo, como sugerido por alguns estudos (GREENWOOD & YOUNG, 2001; WAINWRIGHT, 2002, PETURSDOIT e cols, 2008). Em nossos resultados, o grupo OVX4, cuja dieta apresenta menor relação  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 apresentou retardo apenas no primeiro dia de teste LAROB. Isso, talvez possa ser justificado pela associação da redução de  $\omega$ -3 a deficiência estrogênica que estariam induzindo a uma pior resposta à memória de curto prazo. Tendo em vista que os efeitos sobre o desempenho no LAROB se restringiram ao primeiro dia, pode-se supor que mecanismos associados à ansiedade de lidar com a situação experimental adversa (imersão na água) tenham afetado os resultados. Esta suposição é particularmente pertinente quando se considera que os resultados mais evidentes de efeitos ansiogênicos estão associados à castração com dieta normolipídica (OVX4). Neste sentido, a

confirmação de que os efeitos observados estão de fato associados à memória e ao aprendizado dependem da utilização de paradigmas experimentais em que o componente de ansiedade seja menos relevante.

## 6. CONCLUSÕES

- A dieta e a ovariectomia levaram ao aumento da massa corporal e do tecido adiposo intra-abdominal, sem alteração da ingestão e do comprimento corporal.
- A dieta hiperlipídica e a deficiência estrogênica são, isoladamente, fatores ansiogênicos, diminuem a atividade motora e a busca pela novidade. Porém, quando associados revertem esses efeitos, sugerindo que AGPI em excesso compensam a deficiência estrogênica.
- A tomada de decisão, a atividade exploratória e a avaliação de risco, foram variáveis que se associaram apenas a deficiência estrogênica, não sendo influenciadas pelo tipo de dieta.
- O desempenho aprendido/memória só foi afetado pela castração, apenas na resposta imediata de memória de curto prazo.
- A deficiência de estradiol acompanhada da ingestão de dieta hiperlipídica mantém o desempenho cognitivo, o comportamento emocional e a motivação, embora prejudique a adiposidade e o metabolismo lipídico.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU-VILLAÇA Y; NUNES F; QUEIROZ-GOMES FE; MANHÃES AC, FILGUEIRAS CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short term and long term withdrawal. *Neuropsychopharmacol.* 2008; 33: 599-10.

ABREU-VILLAÇA Y; QUEIROZ-GOMES F; MONTE AP, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC. Individual differences in novelty-seeking behaviour but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2006; 167(1): 175-82.

ANDRADE RG; PEREIRA RA; SICHIERI R. Ten-year increase in the prevalence of obesity and reduction of fat intake in brazilian women 35 years and older. *J Epidemiol Community Health.* 2009; 6 (3): 252-4.

ARABI A; GARNERO P; PORCHER R; PELISSIER C; BENHAMOU CL; ROUX C. Changes in body composition during post-menopausal hormone therapy: a 2 year prospective study. *Hum Reprod.* 2003; 18(8):1747-52.

ARMADA L ; NOGUEIRA CRR; NEVES UL; SOUZA OS; DETOGNE JP; ARMADA-DIAS L; MOREIRA RM, NASCIMENTO-SABA CCA. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats. *Oral Dis.* 2006; 12: 181-6.

ARMADA-DIAS LC. Aspectos morfofuncionais do aparelho reprodutor feminino no diabetes mellitus experimental. 1996. f. Tese (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

ASARIAN L; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 2002; 42: 461–71.

ASSARIAN & GEARY L; GEARY N. Modulation of appetite by gonadal steroids hormones. *Philos Trans Royal Soc Lon; Ser B.* 2006; 361: 1251-63.

BARDO MT. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res.* 1996; 77(1-2):23-43.

- BARDO MT; DWOSKIN LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Neb Symp Motiv.* 2004; 50:127-58.
- BATISTA FM ;RISSIN A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Publ.* 2003; 19 (Supl 1): S181-91.
- BAYER KU; KONINCK P ,HELL JW;SCHULMAN H. Interaction with the NMDA receptor locks CAMKII in an active conformation. *Nature.* 2001; 411: 801-5.
- BECKER JB. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology.* 2005; 146: 1650-73.
- BELCHER SM. Rapid signaling mechanism of estrogens in the developing cerebellum. *Brain Res Rev.* 2008; 57 (2): 481-92.
- BERMAN KF; SCHIMIDT PJ; RUBINOW DR; DANACEAU MA; VAN HORN GE; OSTREM JL;WEINBERGER. Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positron- emission tomography study in women. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 8836-41.
- BLAUSTEIN JD, WADE, G. N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav.* 1976; 17: 201-8.
- BOISSIER JR ;SIMON P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. *Therapie.* 1962; 17: 1225-32.
- BRANN DW; DHANDAPANI K; MAHESH VB; KHAN MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids.* 2007; 72 (5): 381-405.
- BRAY GA. The metabolic syndrome and obesity. New Jersey, Humana Press, 2007. p. 3-30.
- BROWN LM; CLEGG DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 117: 97-104.
- BULUN SE; ADASHI EY. The physiology nad pathology of female reproductive axis. In: *Willians textbook of endocrinology.* Philadeephia: Saunders, 2003. p 587-664.
- BUNZECK N, DAYAN P; DOLAN RJ; DUZEL E. A common mechanism for adaptive scaling of reward and novelty. *Hum Brain Mapp.* 2010: 1-15.
- BUSH RR. A formal structure for multiplechoice situations. IN: TRALL RM e cols. *Decision processes.* Oxford: John Wiley and Sons, 1954. p.99-126.

CALLIER S, LE SAUX M, LHIAUBET AM, DI PAOLO T, ROSTÈNE W, PELAPRAT D. Evaluation of the protective effect of oestradiol against toxicity induced by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (Mpp+) towards dopaminergic mesencephalic neurones in primary culture. *J Neurochem.* 2002; 80: 307-16.

CANTERAS NS. Bases neurais dos comportamentos motivados e das emoções. In: CURI R; PROCÓPIO J. *Fisiologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 328-335.

CAROBREZ AP; BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(8): 1193-205.

CASTRACANE VD; KRAEMER GR; OGDEN BW; KRAEMER RR. Interrelationships of serum estradiol, estrone, and estrone sulfate, adiposity, biochemical bone markers, and leptin in post-menopausal women. *Maturitas.* 2006; 53 (2): 217-25.

CHURCH MW; STAFFERTON T; HOTRA J W; BRITTANY R. ADAMS. Reduced auditory acuity in rat pups from excess and deficient omega-3 fatty acid consumption by the mother. *Neurotoxicol Teratol.* 2007; 29: 203-10.

COOKE PS; NAZZ A. Role of estrogens in adipocytes development and function. *Exp Biol Med.* 2004; 229: 1127-35.

CORDERO P. Eficiência y metabolismo mitocondrial: um eje etiológico de la obesidad? *Rev Med Univ Navar.* 2007; 51(3): 13-8.

CORTEZ CM; SILVA D. *Fisiologia do Comportamento e do Estresse.* In: CORTEZ CM; SILVA D. *Fisiologia aplicada à psicologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. P. 230-248.

COSTA CAS; ALVES EG, GONZALEZ GP L, BARBOSA TBC, SANTANA AC, DEMARCO LIMA V, NASCIMENTO R, DE MOURA EG AND NASCIMENTO-SABA CCA. Evaluation of body development, fat mass and lipid profile in rats fed with high-PUFA and - MUFA diets, after neonatal malnutrition. *Br J Nutr.* 2008; 101: 1639-44.

DAHLMAN-WRIGHT K; CAVAILLES V, SUZANNE AF, JORDAN VC, KATZENELLEENBOGEN JA, KORACH KS MAGGI A, MURAMATSU M, PARKER MG, GUSTAFSSON JA. International Union of Pharmacology: LXIV Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 773-81.

- DANNLOWSKI U, OHRMANN P, BAUER J, KUGEL H, AROLT V. Unimpaired automatic processing of verbal information in the course of clinical depression. *Depress Anxiety*. 2006; 23: 325-30.
- DASH PK; HEBERT AE; RUNYAN JD. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Rev*. 2004; 45: 30-7.
- DAVIDSON RJ. Depression: perspectives from affective neuroscience. *Annu Rev Psychol*. 2002; 53: 545-74.
- DEL RE PV; JORGE N. Vegetal oils behavior in discontinued frying of frozen pre-fried products. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (1): 56-3.
- DELION S, CHALÃ S, RAULT J, LLOTEAU D, G BESNARD JC, DURAND G.  $\alpha$  Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes IOF dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J Neurochem*. 1996; 66: 1582-91.
- DELION S, CHALÃ S, RAULT J, LLOTEAU D, G BESNARD JC, DURAND G. Chronic dietary  $\alpha$  linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rats. *J Nutr*. 1994; 124: 2466-76.
- DELLU-HAGEDORN F. Relationship between impulsivity, hyperactivity and working memory: a differential analysis in the rat. *Behav Brain Funct*. 2006; 2:10.
- DEROO BJ; KORACH KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3): 561-70.
- DOUGHERTY FE. Responses of schizophrenics to expressions of the fundamental emotions. *J Clin Psychol*. 1974; 30: 243-46.
- DREWETT RF. The meal patterns of the oestrous cycle and their motivational significance. *Q J Exp Psychol*. 1974; 26: 489-94.
- DUARTE ACG; FONSECA DF; MANZONI MS; SOAVE CF; SENE-FIORESE M; DÂMASO AR; CHEIK NC. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev Nutr*. 2006; 19(3): 341-8.
- DUBAL DB. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98: 1952-1957.
- DUDAI Y. The neurobiology of consolidations, or how stable is the engram? *Ann Rev Psychol*. 2004; 55: 51-86.

ELSATTAR ELBALTRAN SA. Studies on the oestrogenic activity of soybean oil on albino rats. *Boll Ch im Farm.* 2001;140 (2): 119-24.

ESTADELLA D; OYAMA L M, DÂMASO A R, RIBEIRO E B, OLLER DO NASCIMENTO CM. Hyperlipidic diet on lipid metabolism for sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004; 20 (2): 218-24.

FERNANDES-SANTOS C; CARNEIRO RE, DE SOUZA MENDONCA L, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition.* 2009; 25 (7): 818-27.

FERNSTROM J. Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(sup11): 1669S-73S.

FILE SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res.* 2001; 125: 151-7.

FILGUEIRAS CC; MANHÃES AC. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behav Brain Res.* 2004; 155 (1): 13-25.

FILGUEIRAS CC; MANHÃES AC. Increased lateralization in rotational side preference in male mice rendered acallosal by prenatal gamma irradiation. *Behav Brain Res.* 2005; 162 (2): 289-98.

FITZPATRICK LA. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50 (4): 705-19.

FOTHERBY K. Metabolic interrelationships, cardiovascular disease, and sex steroids. *Contraception.* 1998; 57(3): 183-7.

FRAGA MARQUES MC; MOURA EG, OLIVEIRA-SILVA J; CLAUDIO-NETO S, PEREIRA-TOSTE F, PASSOS MCF, LISBOA PC, MANHÃES AC. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res.* 2010;. 206: 147–150.

FRAGA-MARQUES MC; MOURA EG, CLAUDIO-NETO S, TREVENZOLI IH, TOSTE FP, PASSOS MCF, LISBOA PC, MANHÃES AC.. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav.* 2009; 55(2): 272-9.

FRANCÈS H; MONIER C; BOURRE JM. Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. *Life Sci.* 1995; 57(21): 1935-47.

FRANCI CR; ANSELMO-FRANCI. In: AIRES MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008 cap.68 : 1051-76.

FRANCO L. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Rev. Nutr.* 2009; 22 (3): 359-66.

FREEMAN ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. IN: *The physiology of reproduction*. 2nd. ed. New York: Raven Press, 1994.

FREITAS AK; FREITAS JR RAO, PRADO MFM, AZEVEDO GD, FOSS MC, SILVA-DE-SÁ MF, FERRIANI RA. Terapêutica com tibolona em mulheres diabéticas na pós-menopausa: parâmetros clínicos e laboratoriais de segurança. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(3): 433-40.

FREY JU. LONG-Lasting hippocampal plasticity: cellular model for memory consolidation? *Results Probl Cell Differ.* 2001; 34: 27-40.

FRYE CA ; WALF AA. Estrogen and /or progesterone sytemically or to the amygdala can have anxiety, fear, and pain reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci.* 2004; 118: 306-13.

FRYE CA; PETRALIA SM, RHODES ME.. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88: 208-16.

FRYE CA; WALF AA. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and  $3\alpha,5\alpha$ THP. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67: 587-96.

GALLAGHER B; BURWELL R, BURCHINAL M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci.* 1993; 107 (4): 618-26.

GARAKANI AM; MATHEW SJ ; CHARNEY DS. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *The Mount Sinai J Med.* 2006; 73(7): 941-9.

- GEARY N. The estrogenic inhibition of eating. In: STICKERS E, WOODS SC. Neurobiology of food and fluid intake. 2.nd. ed. New York: Kluwer Academic Publishing, 2004. p.305-43.
- GEARY N; SCHWARTZ, G. J. Appetite. In: Comprehensive textbook of psychiatry. 8th. ed. Philadelphia: Lippincott, 2005. P.295-308.
- GELLER SE; STUDEE L. Soy and red clover for midlife and aging. Climateric. 2006; 9(4): 245-63.
- GEORGIEFF N e cols. Semantic priming in major depressive state. Psychiatry Res. 1998; 78: 29-44.
- GOMES- PINILLA F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. Science Soc. 2008; 9: 568-78.
- GOSS P. Comparing the effects of atamexane, toremifene and tamoxifen alone and in combination, on bone, serum lipids and uterus in ovariectomized rats. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009; 13: 233-40.
- GRAEFF FG; NETTO CF, ZANGROSSI H JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. Neurosci Biobehav Rev. 1998; 23 (2): 237-46.
- GREENWOOD CE; YOUNG SN. Dietary fat intake and the brain: a developing frontier in biological psychiatry. J. Psychiatry Neurosci. 2001; 26 (3): 182-4.
- GRIFFIN JE; OJEDA AR. Textbook of endocrinophysiology. 4. ed. New York: Oxford, 2000.
- HALBE HW. Osteoporose: Fatores de risco, hormônios ovarianos e prevenção. RBM Rev Bras Med. 1999; 56, n. Especial: 4-12.
- HARROLD JA; WIDDOWSON PS, CLAPHAM JC, WILLIAMS, G. Individual severity of dietary obesity in unselected wistar rats: relationship with hyperphagia. Am J Physiol Endocrinol. Metab. 2000; 279: 340-7.
- HEINE PA; TAYLOR A, IWAMOTO GA, LUBAHN DB, COOKE PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor  $\alpha$  knockout mice. PNAS. 2000; 97: 12729-34.
- HENDRIE CA; EILAM D, WEISS SM. Effects of diazepam and buspirone on the behaviour of wild voles (*Microtus socialis*) in two models of anxiety. Pharmacol Biochem Behav. 1997; 58(2): 573-6.

HEWITT SC; KORACH KS. Oestrogen receptor Knockout mice: roles for oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in reproductive tissues. *Reproduction*. 2003; 125:143-9.

HILL MN; KARACABEYLI ES ; GORZALKA BB. Estrogens recruits endocannabinoid system to modulate emotionally. *Psychoendocrinol*. 2007; 32: 350-7.

HIRATSUKA S; KOIZUMI K, OOBA T, YOKOGOSHI H. Effects of dietary acid connecting phospholipids on the learning ability and fatty acid composition of the brain. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2009; 55: 374-80.

HOEBEL BG; MONACO AP, HERNANDEZ L, AULISI EF, STANLEY BG, LENARD L. Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology*. 1983; 81(2):158-63.

HOFBAUER LC; KHOSLA S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol*. 1999; 140(4): 271-286.

HOGG S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 54: 21-30.

HOLUB BJ. Clinical nutrition: 4.Omega-3 fatty acid in cardiovascular care. *Can Med Ass J*. 2002; 106(5): 608-15.

HONG J; STUBBINS RE; SMITH RR; HARVEY ; NUNEZ NP. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr J*. 2009: 8-11.

HOOPER L, RYDER M.S, KURZER, J.W, CASSIDY A. Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2009, 15(4): 423–440.

HOTCHKISS J; KNOBIL E. The menstrual cycle and its neuroendocrine control. In: *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Knobil & Neill, 1994. P 711-745.

HUANLING YU; YANXIA Bi, WEIWEI MA, LINGLING HE, LINHONG Yuan, JINFANG FENG, RONG XIAO. Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int Dev Neurosci*. 2009; 147-154.

HUYNH H e cols. Estimation of the box correction for degrees of freedom from sample data in randomized block and split-plot designs. *J Educ Behav Stat* . 1976; 1: 69-82.

IKEMOTO S; WISE RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*. 2004; 47 Suppl 1: 190-201.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS (IBGE) Censo 2006. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/tabela1.shtm#a112>. Acesso em: 01/01/2010.

JERILYNN C; PRIOR. Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocr Rev.* 1998; 19 (4): 397-428.

JESSEL TM. O Sistema Nervoso. In: Kandel ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.61-73.

JUMP DB; CLARKE SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19: 63-90.

KALMIJN S; VAN BOXTEL MP, OCKEM, VERSCHUREN WM, KROMHOUT D, LAUNER LJ. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology.* 2004; 62 (2): 275-80.

KANDEL ER. Cérebro e Comportamento. In: Kandel ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap1 p.5-13.

KANDEL ER; KUPFERMANN I. Aprendizado e memória. In: Kandel ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.35 p.519-30.

KANDEL ER; KUPFERMANN. Estados emocionais. In: Kandel ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.32 p.475-87.

KESELMAN H e cols. Testing the validity conditions of repeated measures F tests. *Psychol Bull.* 1980; 87(3): 479-81.

KLIETHERMES CL; KAMENS HM, CRABBE. Drug reward and intake in lines of mice selectively bred for divergent exploration of a hole board apparatus. *Genes Brain Behav.* 2007; 6(7): 608-18.

KORSE C. Estradiol and testosterone levels are lower after oophorectomy than after natural menopause. *Tumor Markers.* 2009; 1: 37-42.

KRAHE C. Perimenopausa, massa óssea e o risco de fraturas. *Femina.* 2003; 31(4): 327-31.

- KREZEL W; DUPONT S, KRUST A, CHAMBON P, CHAPMAN PF. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor  $\beta$ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(21): 12278-82.
- KUPFERMANN I, KANDEL ER. Aprendizado e memória. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 519-30.
- LACATIVA PG; FARIAS MLF. Office practice of osteoporosis evaluation. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50 (4): 674-84.
- LACREUSE A; WILSON ME ; HERDON JG. No effect of different estrogen receptor ligands on cognition in adult female monkeys. *Physiol Behav*. 2008; 96: 448-56.
- LAURITZEN L; HANSEN HS, JØRGENSEN MH, MICHAELSEN KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*. 2001; 40(1-2):1-94.
- LECHNER. 100 years of consolidation-remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem*. 1999; 6: 77-87.
- LENT R. Primeiros conceitos da neurociência; uma apresentação do sistema nervoso. In: LENT R. Cem bilhões de neurônios; conceitos fundamentais da neurociência. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p.1-680.
- LEVIN ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005; 19(8): 1951-9.
- LEVY-COSTA, SICHIERI R, PONTES NS, MONTEIRO SA. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Rev Saúde Pública*. 2005; 39(4):630-540.
- LIM SY; SUZUKI H. Changes in maze behaviour of mice occur after sufficient accumulation of docosahexaenoic acid in brain. *Nutr Neurosci*. 2001; 131: 319-24.
- LIMA FB; SERTIÉ RAL. Sistema reprodutor feminino. In: Curi R, Procópio J. *Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p 806-28.
- LISSNER L; STEVENS, J., LEVITSKY, D. A., RASMUSSEN, K. M. Variation in energy intake during the menstrual cycle: implications for food-intake research. *Am. J. Clin. Nutr*. 1988; 48: 956-62.
- LISTER RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacol*. 1997; 92(2): 180-5.

- LIU F; MUNIZ LC, B RINTAN D, ARIAS R, SANCHEZ R, GRAUER S. Activation of estrogen receptor beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 2008;11: 334-43.
- LOMBARDO YB. Effects on dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans a review. *J Nutr Biochem.* 2006;17(1): 1-13.
- LUND TD; ROVIS T, CHUNG WC, HANDA RJ. Novel actions of estrogen receptor  $\beta$  on anxiety-related behaviors. *Endocrinology.* 2005; 146: 797-807.
- LYONS PM, TRUSWELL, A. S., MIRA, M., VIZZARD, J. , ABRAHAM, S. F. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Am. J. Clin. Nutr.* 1989; 49: 1164-68.
- MAKI PM, RESNICK SM. Effects of estrogen on Patterns of Brain Activity at Rest and during Cognitive Activity. A Review of Neuroimaging Studies. *Neuroimage.* 2001; 14: 789-801.
- MARCO EM, LLORENTE R, MORENO E, BISCAIA J M, GUAZA C, VIVEROS M P. Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behav Brain Res;* 2006; 172 : 46-53.
- MARCONDES FK; BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some hopeful considerations. *Braz. J. Biol.* 2002; 62 (4): 609-14.
- MARTIN KJ, RONNEKLEIV OK. Control of CNS neuronal excitability by estrogens via membrane-initiated signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 308:17-25.
- MAZZUCCO CA, WALKER HA, PAWLUSKI JL, LIEBLICH SE, GALEA LA e cols. ER alpha, but not Er beta, mediates the expression of sexual behavior in the female rat. *Behav Brain Res.* 2008; 191: 111-7.
- MCDONALD, B.E. Canola oil: Nutritional properties. Canada: Canola Council of Canada, 2005. [www.canola-council.org/pdf/nutritionalprop.pdf](http://www.canola-council.org/pdf/nutritionalprop.pdf) (Acessado dia 10 de Janeiro de 2010).
- MCEWEN B. Estrogens actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 2008; 57: 357-84.
- MCGAUGH JL;. Memory- a century of consolidation. *Science.* 2000; 287: 248-51.
- MCGEE EA; HSUEH AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 200-14.

MIELKE JG; NICOLITCH K, AVELLANEDA V, EARLAM K, AHUJA T, MEALING G, MESSIER C. e cols. Longitudinal study of the effects of a high-fat diet on glucose regulation, hippocampal function, and cerebral insulin sensitivity in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2006; 175: 374-82.

MILLER NR; JOVER T; COHEN HW; ZUKIN S; ETGEN AM. Estrogen can act via estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  to protect hippocampal neurons against global ischemia induced cell death. *Endocrinology.* 2005; 146(7): 3070-79.

MOREIRA RM e cols. Dose-dependent effects of  $\beta$ -estradiol on TRH- induced TSH in vitro. *Braz J Medi Biol Res.* 1997; 30: 547-52.

MOREIRA RM. "Secreção in vivo" e "in vitro" de tireotrofina em ratas em diferentes fases do ciclo estral e ovariectomizadas. Monografia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.

MOREIRA RM; LISBOA PC, CURTY FH, PAZOS-MOURA CC. Dose-dependent effects of 17-beta-estradiol on pituitary thyrotropin content and secretion in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 9: 1129-34.

MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984; 11(1): 47-60.

MULLER GE; PILZECKER A. Consolidation of memory. *Hippocampus.* 1900; 11: 56-60.

NA XL; EZAKI J, SUGIYAMA F, CUI HB, ISHIMI Y. Isoflavone regulates lipid metabolism via expression of related genes in OVX rats fed on a high-fat diet. *Biomed Environ Sci.* 2008; 21(5): 357-64.

NAGATA C; NAGAO Y, SHIBUYA C, KASHIKI Y, SHIMIZU H. Fat intake is associated with serum estrogen and androgen concentrations in postmenopausal Japanese women. *J Nutr.* 2005; 135: 2862-65.

NAKANISHI T; KOUTOKU T; KAWAHARA S; MURAI A; FURUSE M. Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E<sub>2</sub> in mice. *Neurosci Lett.* 2003; 34: 135-8.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Göran A, Enmark E, Pettersson K, Warner M and Gustafsson JÅ. *Physiol Rev.* 2001; 81:1535-65.

O'KEEFE JE; NADEL L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press, 1978. 570 pp.

O'REILLY R ;RUDY JW. Computational principles of learning in the neocortex and hippocampus. *Hippocampus*. 2000; 10: 389-97.

OLTON DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiol Behav*. 1987; 40 (6): 793-7.

OWADA Y. Fatty Acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *The Tohoku j Exper Med*. 2008; 214: 213-20.

PAQUETTE A; SHINODA M; LHORET RM; PRUD'HOMME D;LAVOIE JM. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: Impact of a high fat diet. *Maturitas*. 2007; 58: 182-90.

PARDUCZ A; , HAJSZAN T, MacLUSKY NJ, HOYK Z,KURUNCZI A, PRANGE-KIEL, LERANTH C. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*. 2006; 138: 977-85.

PELKMAN CL; CHOW M.; HEINBACH R. A. ; ROLLS, B. J. Short-term effects of a progestational contraceptive drug on food intake, resting energy expenditure, and body weight in young women. *Am J Clin Nutr*. 2003; 73: 19-26.

PELLOUX Y; COSTENTIN J, DUTERTE-BOUCHER D.. Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 84 (1): 43-50.

PELLOW S; CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14 (3): 149-67.

PEREZ SE; CHEN EY, MUFSON EJ. Distribution of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev*. 2003; 145: 117-39.

PETURSDOTTIR AL; FARR SA, MORLEY JE, BANKS WA ; SKULADOTTIR GV. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on brain lipid fatty acid composition, learning ability, and memory of senescence-accelerated mouse. *J Gerontol. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2008; 63A (11): 1153-60.

PFAFF DH; ARNOLD AA; ETGEN AM; FAHRBACK SE ; RUBIN RT. Hormones, brain and behavior, 2002. 36:135-140

PIAZZA PV; DEMINIÈRE JM, LE MOAL M, SIMON H.. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*. 1989; 245 (4925): 1511-3.

PIKE CJ, CARROLL JC, ROSARIO EM, BARRON,AM.. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2009; 30: 239-58.

POLAKOW V. Dietas hiperlípidicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007; 51(3): 389-400.

PRENTICE AM; DOPPITT, S.D. Importance of energy density and macronutrients in the regulation of energy intake. *Int J Obes*. 1996; 20(suppl 2): S18-S23.

RAGONESE P e cols. Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology*. 2004; 62: 2010-14.

RAISZ L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005; 115: 3318-25.

RAP PR ; ESPELAND MA, SHUMAKER SA, HENDERSON VW, BRUNNER RL, MANSON JE, GASS MLS cols. Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J Neurosci*. 2003; 23: 5708-14.

RAPORPOT SI. In vivo approaches and rationale for quantifying kinetics and imaging brain lipid metabolic pathways. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005; 77(1-4):185-96.

RAPP SR e cols. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women. The Women's Health Initiative memory Study: a randomized controlled trial. 2003; 289(20): 2663-72.

REEVES PG. Components of the AIN-93 diets as improvement in the AIN-76 diet. *J Nutr*. 1997; 127: 838S-41S.

REX A; FINK H, MARSDEN CA. Effects of BOC-CCK-4 and L 365.260 on cortical 5-HT release in guinea-pigs on exposure to the elevated plus maze. *Neuropharmacology*. 1994; 33 (3-4): 559-65.

RIANT E; WAGET A, COGO H,ARNAL JF,BURCELIN R, GOURDY. Estrogens protect against high fat diet induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinol.* 2009;150(5): 2109-17.

RINALDI A. Hormone therapy for the ageing. Despite the negative results of recent trials, hormone replacement therapy retains enticing promises for the elderly. *EMBO Rep.* 2004; 5(10): 938-41.

ROBBINS TW; EVERITT BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6(2): 228-36.

RODGERS RJ; CAO BJ; DALVI A; ; HOLMES A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30 (3): 289-304.

RODGERS RJ;; DALVI A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21(6): 801-10.

ROSS GT; CARGILLE C.M; LIPSETT M.B; RAYFORD P.L; MARSHALL J.R; STROTT C.A ; RODBARD,D. Pituitary and gonadal hormones in woman during spontaneous and induced ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res.* 1970; 26: 1-62.

RUBINSON K; LANG E J. O sistema nervoso. In: Berne, Levy. *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 553-699.

RUNYAN JD. A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning, *J Neurosci.* 2004; 24: 1288-95.

RYMER J; MORRIS EP. Extracts from "Clinical evidence": Menopausal symptoms. *Br Med J.* 2000; 16, 321(7275): 1516-19.

SAGRAVES R. Estrogen therapy for postmenopausal symptoms and prevention of osteoporosis. *J Clin Pharmacol.* 1995; 35: 2S-10S.

SCHARFMAN HE; HINTZ T M., GOMEZ J, STORMES KA, BAROUK S, PHATAK MALTHANKAR G H, MCCLOSKEY DP, LUINE V N., AND MACLUSKYN J. Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge. *Eur J Neurosci.* 2007; 26(9):2595-2612.

SCHIMIDEK RW; CANTOS GA. Evolução do sistema nervoso, especialização hemisférica e plasticidade cerebral: um caminho ainda a ser percorrido. *Pensamento Biocêntrico. Revista Eletrônica.* 2008; 10: 181-204, jul/dez.

- SCHMITT ACB; CARDOSO MRA, ALDRIGHI JM. Tendências da mortalidade em mulheres brasileiras no climatério. *Rev Bras Crescimento Desenvolv Hum.* 2008; 18(1): 11-5.
- SHERWIN BB; HENRY JF. . Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29(1): 88-113.
- SILVA, ACJS; SILVA DE SÁ, MF. Efeitos dos esteróides sexuais sobre o humor e a cognição. *Rev Psiquiatr Clín.* 2006; 33(2):175-180.
- SMITH GP. Satiating: from gut to brain. New York, NY: Oxford University Press, 1988. 33(4):145-151
- SNEDECOR GW e cols. *Statistical methods.* 6th.ed. Ames: Iowa State University Press, 1967 36(5):152-160.
- SOARES JUNIOR JM e cols. Múltiplos mecanismos do estrogênio na membrana, citosol e no núcleo. *Femina.* 2003; 31(5): 421-25.
- SPORNITZ UM, SOCION CD, DRAVID AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec.* 1999; 254: 116-26.
- STEAD JD, CLINTON S, NEAL C, SCHNEIDER J, JAMA A, MILLER S., VAZQUEZ DM, AKIL H. Selective breeding for divergence in novelty-seeking traits: Heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors. *Behav Genet.* 2006; 36: 697-712.
- SWITZER KC , SEO J, MCMURRAY D, LUPTON JR. N-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem.* 2004; 15(11): 700-6.
- TSIEN JZ. Building a brainier mouse. *Sci Am.* 2000; 282: 62-8.
- VAGLENOVA J; BIRRU S, PANDIELLA NM, BREESE CR. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. 2004;150 (1-2 ): 159-70.
- VALENZUELA AB ;NIETTO KS. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal:su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Pediatr.* 2003; 74 (2): 149-57.

VIANNI R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. *Química Nova*. 1996; 19(4): 400-7.

VILLENA JA, CHOI C S, WANG Y, SHEENE K, HWANG Y-J, YOUNG-B K, CLINE G, SHULMAN G I., SUL HEI S. ERR $\alpha$ : a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 8: 269-76.

VISENTAINER JV; CARVALHO PO, IKEGAKI, PAAK YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. 2000; 20(1): 1-10.

WADE GN. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav*. 1972; 8: 523-34.

WAHRBURG U. What are the health effects of fat? *Eur J Nutr*. 2004; 46 (s1-6): 123-128.

WAINWRIGHT PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61: 61-9.

WAINWRIGHT PE; XING HC, WARD GR, HUANG YS, BOBOK E, AUESTAD N & MONTALTO M. Water maze performance is unaffected in artificially reared. Rats fed diets supplemented with arachidonic acid and the docosahexanoic acid. *J Nutri*. 1999; 129: 1079-89.

WAKE DJ; STRAND M, RASK E, WESTERBACKA J, LIVINGSTONE DE, SODERBERG S, ANDREW R, YKI-JARVINEN H, OLSSON T, WALKER BR. Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol*. 2007; 66(3): 440-6.

WALF AA; FRYE CA. Administration of receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 86: 407-14.

WALF AA; FRYE CA. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav*. 2002; 41: 306-15.

WALLEN WJ; BELANGER MP ; WITTNICH C. Sex hormones and the selective estrogen receptor, modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutri*. 2001; 131: 2351-57.

- WANG H; HU,Y & TSIEN, JZ. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol.* 2006; 79: 123-35.
- WARDEN CH; FISLER JS. Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metab.* 2008; 7(4): 277.
- WELTY FK. Cardiovascular disease and dyslipidemia in women. *Arch Intern Med.* 2001; 161: 514-22.
- WHISHAW IQ. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav.* 1995; 58(4): 687-93.
- WHITE BA. Sistema reprodutor masculino e feminino. In: Berne, Levy. *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.765 – 804
- WIJENDRAN V; HAYES KC. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24: 597-615.
- WILLIS D. O Sistema Nervoso. In: BERNE. *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap.6, p.85-104.
- WILLIS DO. Sistema Nervoso. In: Berne, Levy. *Fisiologia.* Rio de Janeiro, Elsevier, 2004. p. 85-104.
- WILLS TA; VACCARO D, MCNAMARA G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse.* 1994; 6 (1): 1-20.
- WIREN KM. Androgens and bone growth: it's location, location, location. *Curr Op Pharmacol.* 2005; 5(6): 626-32.
- WISE RA. Cocaine reward and cocaine craving: the role of dopamine in perspective. *NIDA Res Monogr.* 1994; 145: 191-206.
- WOODS SC. A controlled high-fat diet induces on obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003; 133:1081-87.
- YANNIELLI PC; KANTEREWICZ BI, CARDINALI DP. Daily rhythms in spontaneous and diazepam-induced anxiolysis in Syrian hamsters. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54 (4): 651-6.

**ANEXO****Protocolo experimental**

# 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](#)