

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

**Influência do estradiol nos transtornos de ansiedade em
ratas Fischer submetidas à restrição alimentar**

Glenda Siqueira Viggiano Campos

Ouro Preto

2015

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

Influência do estradiol nos transtornos de ansiedade em ratas Fischer submetidas à restrição alimentar

Glenda Siqueira Viggiano Campos

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

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Ouro Preto
2015

C198i Campos, Glenda Siqueira Viggiano.
Influência do estradiol nos transtornos de ansiedade em ratas Fischer submetidas à restrição alimentar [manuscrito] / Glenda Siqueira Viggiano Campos. - 2015.
67f.: il.: color; graf.; tabs; Fotos.

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

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas. Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Nutrição. 2. Estradiol. 3. Ansiedade. 4. Comportamento. I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 612.39:616.89-008.441

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Influência do estradiol nos transtornos de ansiedade em ratas Fischer submetidas à restrição alimentar"

Aos vinte e três dias do mês de março de 2015, às 08h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Glenda Siqueira Viggiano Campos**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

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

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

Prof.ª Dr.ª Milena de Barros Viana
Examinadora (UNIFESP)

DATA DA DEFESA: 23/03/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

APOIO FINANCEIRO

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Gumercindo e Elvira, por acreditarem no diferencial da educação e me incentivarem sempre a continuar. Em especial à minha mãe, por acreditar e lutar por meus sonhos junto comigo e vibrar a cada pequena vitória. À toda a minha família e amigos por fazerem esta caminhada mais leve e divertida.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, pela oportunidade, paciência, confiança, incentivo e todos os ensinamentos.

Às minhas companheiras de laboratório, que rapidamente se tornaram grandes amigas: Aline Maria e Aline Rezende, por todo o conhecimento científico repassado e discutido, e também por toda a paciência! Alessandra e Laura, pelo carinho, amizade e leveza do dia-a-dia. E Sylvana, pela fiel e produtiva parceria desde o primeiro dia de mestrado, compartilhando dias de desespero, mas também dias de sucesso.

À todos os integrantes (e ex-integrantes) do LFC, pelo acolhimento, companheirismo e toda a contribuição intelectual e/ou prática para que este trabalho fosse concluído.

Às professoras da banca examinadora, Prof^a Dra. Milena Viana e Prof^a Dra. Lisandra Brandino, pela disponibilidade e contribuição para a conclusão deste trabalho.

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

Aos laboratórios do NUPEB, professores responsáveis e colegas de pós-graduação, em especial ao LIMP (Profa. Dra. Cláudia Carneiro), pelos equipamentos cedidos e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

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

Ao CCA pelo fornecimento de animais.

Muito obrigada à todos!!!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante”

(Antoine de Saint-Exupère)

SUMÁRIO

1.1. Restrição alimentar	18
1.2. Restrição alimentar e estradiol	20
1.3. Estradiol.....	20
1.4. Restrição alimentar, redução de estradiol e alterações comportamentais	21
1.5. Transtornos de Ansiedade (Ansiedade Generalizada e Pânico) e disfunções da memória	22
1.6. Núcleo dorsal da rafe e receptores de estradiol	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Modelo animal	27
3.2. Restrição alimentar	27
3.3. Preparo de drogas/substâncias utilizadas.....	28
3.4. Confeção das cânulas-guia e cânula injetora	29
3.5. Cirurgia	29
3.5.1. Implante de cânula-guia no núcleo dorsal da rafe	29
3.5.2. Cuidado pós-operatório	30
3.7. Testes comportamentais.....	30
3.7.1. Aparatos	31
3.7.1.1. Labirinto em T elevado (LTE)	31
3.7.1.2. Campo aberto (CA)	31
3.7.1.3. Iluminação da sala e limpeza dos aparatos.....	32
3.7.2. Protocolo experimental.....	32
3.7.2.1. Habituação	32
3.7.2.2. Pré-exposição	33
3.7.2.3. Testes de esquiva inibitória e fuga no Labirinto em T Elevado e de atividade locomotora no Campo Aberto	33
3.7.2.4. Teste de memória.....	34
3.8. Procedimentos das microinjeções.....	34
3.9. Procedimentos histológicos	34

3.10. Pesagem do útero	35
3.11. Avaliação do ciclo estral	35
3.12. Análises estatísticas.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Confirmação dos sítios de microinjeção.....	36
4.2. Peso corporal e peso uterino dos grupos Controle e RA.....	36
4.3. Determinação da fase do ciclo estral durante o protocolo experimental	38
4.4. Restrição alimentar e comportamento	39
4.4.1. Transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico	39
4.4.2. Memória	40
4.5. Efeito da microinjeção de estradiol no NDR sobre o comportamento	41
4.5.1. Estradiol e ansiedade	41
4.5.2. Estradiol e pânico	43
4.5.3. Estradiol e memória	45
4.6. Atividade locomotora.....	49
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - LTE (Insight [®]) utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga.	29
Figura 2 - : Campo aberto utilizado para teste de atividade locomotora.	30
Figura 3 - Fotomicrografia do corte histológico confirmando o local de microinjeção no NDR.	34
Figura 4 - Variação do peso corporal inicial e final das ratas controle e submetidas à 14 dias de restrição alimentar.	35
Figura 5 - Comparação entre os valores de peso uterino de ratas controle e submetidas à restrição alimentar.	36
Figura 6 - Teste de esquiva inibitória no LTE.	37
Figura 7 - Teste de pânico no LTE..	38
Figura 8: Teste de memória de esquiva inibitória e fuga no LTE.	39
Figura 9 - Teste de esquiva inibitória no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle.	40
Figura 10 - Teste de esquiva inibitória no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA.	40
Figura 11 - Teste de esquiva inibitória no LTE após a microinjeção de 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA.	41
Figura 12 - Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle.	42
Figura 13 - Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA.	42
Figura 14 - Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA.	43
Figura 15 - Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle.	44
Figura 16 - Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA.	44
Figura 17 - Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA.	45

Figura 18 - Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle. _____	45
Figura 19 - Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA. _____	46
Figura 20 - Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA. . _____	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fase do ciclo estral, determinada por esfregaço vaginal a fresco, apresentada pelas ratas utilizadas neste trabalho após cada um dos dois dias de experimento. _____ 36

Tabela 2 - Teste de atividade locomotora no CA a partir da média de retângulos percorridos por cada grupo experimental.. _____ 47

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT1_A – Receptor de serotonina do tipo 1_A
5-HT2_A – Receptor de serotonina do tipo 2_A
ANG 1-7 – Angiotensina 1-7
ANG II – Angiotensina II
AT1 – Receptor de Angiotensina II
BLA – Amígdala basolateral
C – Controle
CA – Campo aberto
ECA 1 - enzima conversora de ANG I em ANG II
ECA 2 – enzima conversora de ANG II em ANG 1-7
ER α – Receptor de estradiol do tipo α
ER β – Receptor de estradiol do tipo β
Esq – Esquiva
F – Fuga
FSH – Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
LB – Linha de base
LH – Hormônio luteinizante e
LTE – Labirinto em T elevado
MAS – Receptor de Angiotensina 1-7
NDR – Núcleo dorsal da rafe
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
RA – Restrição alimentar
SNC – Sistema nervoso central
SRA – Sistema renina angiotensina
TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada
TpH2 – Triptofano-hidroxilase 2
TP – Transtorno de Pânico

RESUMO

A restrição alimentar (RA) severa provoca carência energética e nutricional, levando o indivíduo à desnutrição, e este desequilíbrio acarreta inúmeras consequências bioquímicas, fisiológicas e emocionais, tais como ansiedade, pânico e danos à memória. A RA também altera o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, que é a via que regula a produção de hormônios ovarianos, ocasionando redução da síntese e liberação de estradiol pelos ovários. Estudos já mostraram a presença de alta densidade de receptores de estradiol do tipo β (ER β), que quando ativados resultam em efeitos ansiolíticos, no núcleo dorsal da rafe (NDR), indicando uma relação entre o estradiol, o NDR e os transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e pânico (TP). O NDR é uma importante estrutura encefálica relacionada a fisiopatologia dos TAG e TP. Assim, o nosso objetivo foi investigar a influência do estradiol no NDR sobre os TAG e TP em ratas submetidas à restrição alimentar. Para isso, ratas Fischer (210 ± 10 g) foram divididas em controle (C) e RA e alojadas individualmente. Durante 14 dias, as C receberam ração *ad libitum* e os RA receberam 40% do consumo médio dos C. No 7º dia foram anestesiadas com ketamina-xilazina para inserção de cânula-guia no NDR. Ao final do protocolo dietético, cada animal foi submetido a dois diferentes ensaios nos quais ou veículo (100 nL) ou estradiol (0,5 pmol/100 nL) foi microinjetado no NDR. Após 20 minutos, as ratas foram testadas no Labirinto em T Elevado (LTE), um aparato que permite avaliar comportamento de ansiedade (esquiva inibitória) e pânico (fuga), e em seguida foram colocadas no campo aberto (arena retangular que avalia a atividade locomotora do animal). No dia seguinte as ratas foram testadas novamente no LTE para avaliação da memória. Nossos resultados mostraram que as ratas RA possuíam o útero mais leve em relação às controle, sugerindo que a RA alimentar reduz a concentração de hormônios ovarianos, entre eles o estradiol. Nós também observamos que as RA levaram mais tempo para sair do braço fechado do LTE do que as C durante a esquiva ($F_{1,63} = 10,34$; $p = 0,0021$), o que indica um comportamento mais ansioso pelo grupo RA. Ao microinjetarmos estradiol no NDR das ratas RA, notou-se que o tempo de latência de saída do braço fechado diminuiu em relação àquelas que receberam veículo ($F_{2,65} = 3,86$; $p=0,0002$), sugerindo que o estradiol agiu como um agente ansiolítico revertendo o comportamento ansioso apresentado no experimento anterior. Não encontramos diferença entre os grupos no tempo de latência de fuga. Em relação à atividade locomotora, as ratas RA mostraram-se menos ativas que as C, independente da administração de veículo ou estradiol no NDR. Diante disso, sugerimos que a RA reduz os níveis de estradiol, diminuindo a concentração disponível deste

hormônio para atuar nos receptores presentes no NDR, o que altera o controle desta via, levando ao comportamento de ansiedade nas ratas.

ABSTRACT

Food restriction (FR) causes severe energy and nutritional deficiency, leading the individual to malnutrition, and this imbalance results in countless biochemical, physiological and emotional consequences such as anxiety, panic and damage to memory. FR also alters the hypothalamic-pituitary-ovarian axis, which is the pathway that regulates the production of the ovarian hormones, leading to reduced synthesis and release of estradiol by the ovaries. Studies have shown the presence of high density estradiol β receptors (ER β) in the dorsal raphe nucleus (DRN) indicating a relationship among estradiol, the DRN and generalized anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PD). The DRN is an important brain structure related to the pathophysiology of GAD and PD. Thus, the aim of our study was to investigate the influence of estradiol in DRN on GAD and PD in female rats subjected to food restriction. For that, female Fischer rats (210 ± 10 g) were divided into control (C) and FR and housed individually. For 14 days, the C received food *ad libitum* and FR received 40% of the average consumption of the C. On the 7th day the rats were anesthetized with ketamine-xylazine for insertion of the cannula guide in the DRN. At the end of the dietary protocol, each animal was subjected to two tests in which vehicle (100 nL) or estradiol (0.5 pmol / 100 nl) was microinjected in the DRN. After 20 minutes, the rats were tested in the Elevated T Maze (ETM), an apparatus designed to measure anxiety behavior (inhibitory avoidance) and panic (escape), and then were placed in the open field (rectangular arena that measures the locomotor activity). The following day the rats were retested in the ETM for the evaluation of memory. Our results show that FR had a lower weight of the rat uterus than the control, suggesting that FR reduces the concentration of ovarian hormones including estradiol. We have also found that the FR animals showed increased avoidance latences ($F_{1,63} = 10.34$, $p = 0.0021$), which indicates a more anxious behavior by the FR group. After the estradiol microinjection in the DRN of FR rats, we noted that the latency to leave the closed arm decreased compared to those animals receiving vehicle ($F_{2,65} = 3.86$; $p = 0.0002$), suggesting that estradiol acted as an anxiolytic agent reversing the anxious behavior presented in the previous experiment. We found no difference between groups in the escape latency time. Regarding the locomotor activity of the FR rats were less active than C, regardless of vehicle or estradiol administration in the DRN. Therefore, we suggest that FR reduces estradiol levels, reducing the available concentration of this hormone to act on receptors in the

DRN, which changes the control of this pathway, leading to anxiety behavior in rats

1. INTRODUÇÃO

1.1. Restrição alimentar

Para que o organismo funcione bem e seja capaz de realizar corretamente todas as funções delegadas a ele, é necessário fornecer-lhe combustível, que é garantido através da energia proveniente dos alimentos. Por isso, uma alimentação balanceada, regular, com a ingestão de todos os nutrientes, em quantidade adequada, é essencial para a saúde e bom funcionamento dos sistemas do corpo humano.

Muito tem sido discutido, tanto no meio científico como na mídia, acerca da restrição alimentar (RA) como nova terapia para aumentar a qualidade e expectativa de vida. Essa restrição varia entre autores, sendo encontrada redução entre 10 a 40% (García-Matas, Paul et al. 2015), 8 a 60% (Cerqueira and Kowaltowski 2010) e 30 a 50% (Masoro 2009) da quantidade de calorias ingerida por dia, com o intuito de não prejudicar o aporte de micronutrientes. Segundo a literatura, a RA, como citada, promove redução de peso, da taxa metabólica, do estresse oxidativo, de glicose e insulina, e, além disso, é cardio e neuroprotetora (de Cabo, Fürer-Galbán et al. 2003, García-Matas, Paul et al. 2015, Mychasiuk, Hehar et al. 2015, Quarles, Dai et al. 2015). Estudos realizados em animais e humanos já demonstraram que a RA é eficiente na melhora da memória e de funções cognitivas de idosos (Witte, Fobker et al. 2009).

No entanto, Cerqueira e Kowaltowski (Cerqueira and Kowaltowski 2010) em artigo de revisão, constataram que já existe deficiência de micronutrientes em RA de 40%, realizadas em estudos experimentais com ratos, e ainda enfatizam que esta é a faixa de privação mais utilizada na literatura. Porém, na maioria destes trabalhos são empregados algum tipo de suplementação, ressaltando que os benefícios ainda encontrados neste limite de ingestão são devido aos cuidados com o fornecimento adequado de micronutrientes, do contrário, já seria possível observar os danos causados por tal porcentagem de restrição. Assim, a adoção de uma RA maior que 40% da ingestão calórica sem, no entanto, se preocupar com a suplementação de micronutrientes, já se torna prejudicial à saúde, uma vez que leva à carência nutricional, e, por isso, gera um desequilíbrio no organismo provocando alterações fisiológicas contrárias às citadas anteriormente.

As causas que induzem o indivíduo a aderir uma RA mais severa são diversas, sendo os principais motivos por estética (dieta para emagrecimento) (Polivy 1996, Nyman-Carlsson, Engström et al. 2015), por patologias (doenças que impossibilitam a ingestão e/ou absorção dos nutrientes, falta de apetite por efeito colateral à medicamentos, hospitalização, doenças psíquicas como anorexia nervosa e depressão) e por dificuldade de acesso à alimentação adequada (falta de recursos financeiros, catástrofes naturais, moradia em locais ermos) (Pereira 2005, Rodrigues, Schmitz et al. 2007, Robin, Decrock et al. 2008). Os indivíduos que se incluem nestes grupos geralmente realizam a restrição de forma geral, reduzindo a ingestão e/ou absorção de alimentos sem a devida suplementação, levando, assim, à deficiência de macro e micronutrientes e, conseqüentemente, ao estado de desnutrição e suas complicações clínicas.

Resultados prévios do nosso grupo (Souza, de Menezes et al. 2015), utilizando modelo de RA com redução de 60% da ingestão calórica por 14 dias, demonstraram que ratas sob privação alimentar apresentam hipotensão e bradicardia, bem como aumento da atividade de receptores α 1-adrenérgicos, e redução da concentração de óxido nítrico, que são vasoconstritores e vasodilatadores, respectivamente, na tentativa de compensar tais alterações e manter o fornecimento de sangue para todos os tecidos. Além disso, observou-se alteração da concentração plasmática de marcadores bioquímicos, como redução de creatinina, albumina e colesterol e aumento de uréia e glicose, parâmetros que indicam quadro de desnutrição. Esses resultados corroboram outros já descritos na literatura sobre alterações fisiológicas e bioquímicas graves causadas pela RA severa com deficiência nutricional. Silva e cols. (Silva, Monnerat-Cahli et al. 2014) relatam que a deficiência de proteína, vista em situações de RA e desnutrição, altera mecanismos hemodinâmicos aumentando a resistência das arteríolas aferentes e eferentes e diminuindo a taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal. Wojciak (Wojciak 2014), atenta para a deficiência de ferro observada na RA, que além de causar anemia, acarreta também carência de ferro relacionada ao surgimento de sintomas de depressão, o que também é proposto por Matar e cols. (Mattar, Huas et al. 2012) que afirmam que a ansiedade e depressão observadas nesses indivíduos são, ao menos em parte, causadas pela desnutrição instalada. Souza e cols. (Souza, de Menezes et al. 2015) ainda notaram cessação do ciclo reprodutivo em ratas submetidas à RA, uma vez que estas permaneceram nas fases não ovulatórias do ciclo estral (metaestro e diestro) no decorrer dos dias de ingestão calórica insuficiente, sugerindo que a RA reduz a concentração de estradiol plasmático.

1.2. Restrição alimentar e estradiol

Evidências clínicas e experimentais relatam que a RA severa causa alterações no balanço hormonal, indicando um forte controle metabólico da função reprodutora (Klingerman, Williams et al. 2011). Estudos afirmam que a deficiência energética está associada à amenorréia em humanos e anestro em animais (ausência de ciclo reprodutivo) (Mendelsohn and Warren 2010, Klingerman, Williams et al. 2011, Misra and Klibanski 2014, Zhou, Zhuo et al. 2014). Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde declarou que um dos fatores para diagnosticar a anorexia nervosa é a presença de amenorréia (WHO 2007). Tais constatações indicam uma relação entre a RA e alterações dos níveis plasmáticos de estradiol.

De fato, em situações de RA e desnutrição, há alteração do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, que é a via reguladora da síntese e liberação hormonal pelos ovários (Berne, Levy et al. 2008). As alterações metabólicas ocasionadas pela carência nutricional e energética refletem na supressão da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo e, conseqüentemente, sua ação na hipófise. Assim, começa a ocorrer declínio dos níveis dos hormônios controlados por esse eixo, tais como hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), e sem a ação destes no ovário, há redução da síntese e liberação dos estrógenos (Mendelsohn and Warren 2010). Essas alterações ocorrem como forma de evitar a fecundação em períodos de deficiência alimentar, uma vez que a gravidez (e prenhes em animais) demanda de alto valor energético e nutricional (Souza 2013).

1.3. Estradiol

O estradiol (17 β -estradiol) é o principal e mais potente estrógeno secretado pelo ovário e exerce importante função durante toda a vida reprodutiva das mulheres, sendo que sua concentração é fortemente reduzida na pré-menopausa (ter Horst 2010). É um hormônio esteróide, sintetizado a partir de moléculas de colesterol, sua síntese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e sua atuação ocorre através da ligação à receptores específicos dos tipos ER α e ER β (Berne, Levy et al. 2008, Mendelsohn and Warren 2010). Este hormônio participa de processos funcionalmente independentes em diversos tecidos (Tian, Wang et al. 2013) além da função reprodutora, destacando-se sua ação sobre o sistema nervoso central (SNC).

O ciclo menstrual em mulheres e estral em fêmeas é controlado pela variação da secreção hormonal ovariana controlada pelo eixo hipotálamo-hipofisário (Berne, Levy et al. 2008, Mendelsohn and Warren 2010). As maiores concentrações de estradiol são encontradas durante a fase ovulatória (final da fase folicular até a ovulação) do ciclo, que em animais corresponde à fase chamada proestro (Vilela, Santos Júnior et al. 2007). Em seguida começa a ocorrer queda dos níveis séricos de estradiol (em mulheres é o início da fase lútea e em animais é o estro) e por fim, quando a concentração de estradiol chega a níveis muito baixos ocorre a menstruação (em animais corresponde aos ciclos metaestro e diestro). Enquanto o ciclo menstrual regular em mulheres dura um período médio de 28 dias, em animais esse período varia de acordo com a espécie, sendo que em ratas cada fase possui duração média de 24 horas (Vilela, Santos Júnior et al. 2007), ou seja, normalmente o ciclo tem duração de quatro dias e não ocorre sangramento como em humanas e outras espécies animais.

Estudos epidemiológicos mostram que as mulheres são mais propensas a desenvolver doenças psíquicas, tais como ansiedade, depressão e outras alterações cognitivas, uma vez que a prevalência em mulheres chega a ser duas a três vezes maior que em homens (Donner and Handa 2009, ter Horst 2010, Al-Rahbi, Zakaria et al. 2013, Balasubramanian, Subramanian et al. 2014). Estas diferenças começam aparecer durante a puberdade e são ainda mais evidenciadas durante a menopausa (ter Horst 2010). Além disso, pode-se notar alterações humorais e sintomas de ansiedade e depressão no decorrer do ciclo menstrual, em que essas são mais exacerbadas no período que antecede a menstruação (Balasubramanian, Subramanian et al. 2014). Tais constatações levaram os pesquisadores a atribuir as alterações comportamentais às flutuações hormonais que ocorrem nas mulheres, considerando o estradiol como o maior fator responsável pelas mudanças de humor, confirmando sua importante função no SNC.

Como já citado, a restrição alimentar também exerce influência sobre a produção e liberação de estradiol pelos ovários. Nesse sentido, pode-se pressupor que carência energética também promova alterações comportamentais via variação hormonal.

1.4. Restrição alimentar, redução de estradiol e alterações comportamentais

Indivíduos que passam por períodos de RA severa, independente da causa, apresentam alterações comportamentais e cognitivas ao mesmo tempo em que manifestam sintomas clínicos de desnutrição. Além das alterações já mencionadas referentes à interferência da RA sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, em que há redução dos níveis plasmáticos de

estradiol refletindo em desordens comportamentais, muitos autores acreditam que essas alterações de comportamento são consequência não só das flutuações hormonais, mas também da carência de macro e micronutrientes ocasionada pela privação alimentar, que também está associada à fisiopatologia da ansiedade, depressão, ataques de pânico, aprendizado e memória, entre outras disfunções comportamentais (Mattar, Huas et al. 2011, Mattar, Huas et al. 2012, Mattar, Thiébaud et al. 2012, Maddock, Berry et al. 2013, Gauthier, Hassler et al. 2014, Młyniec, Davies et al. 2014, Wojciak 2014). Estes estudos relacionam a RA à insuficiente ingestão de micronutrientes essenciais, influenciando o fornecimento de elementos e precursores de neurotransmissores envolvidos no controle comportamental e cognitivo. A suplementação e reabilitação nutricional já demonstraram atenuar os sintomas (Młyniec, Davies et al. 2014), reforçando a hipótese de que as desordens comportamentais são consequência do estado nutricional debilitado por escassez de nutrientes.

1.5. Transtornos de Ansiedade (Ansiedade Generalizada e Pânico) e disfunções da memória

Dentre as desordens comportamentais existentes, os transtornos de ansiedade e disfunções cognitivas (memória) são sempre citados, tanto em estudos que os associam à RA/desnutrição como naqueles que os relacionam com flutuações da concentração de estradiol.

Segundo Freud, a ansiedade é um afeto, que pode apresentar-se de três formas: 1) ansiedade automática (espontânea): reação a um estado de perigo, que se repete sempre que situações semelhantes ocorrem; 2) ansiedade como sinal (conveniente): para impedir que uma situação traumática ocorra; 3) ansiedade neurótica (inadequada): se apresenta como uma patologia, já que o indivíduo se comporta como se o antigo sinal de perigo ainda existisse (Viana 2010).

Portanto, a ansiedade pode ser considerada como um mecanismo de sobrevivência frente à ameaças quando ocorre de forma automática ou como sinal. Entretanto, quando manifestada de maneira neurótica já é considerada patológica e não adaptativa, trazendo prejuízos físicos, emocionais e sociais ao indivíduo, por apresentar alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas (Spiacci Junior 2012).

A ansiedade patológica é intitulada no meio clínico como transtornos de ansiedade, que compreende distúrbios que compartilham características de medo excessivo, ansiedade e alterações comportamentais relacionadas. De acordo com a Sociedade Psiquiátrica Americana,

no Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders (American Psychiatry Association 2013), são considerados transtornos de ansiedade os seguintes distúrbios: 1) Transtorno de Ansiedade Generalizada; 2) Transtorno do Pânico; 3) Ataque de Pânico com agorafobia; 4) Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social); 5) Fobia Específica; 6) Transtorno de Ansiedade de Separação; 7) Mutismo Seletivo; 8) Transtorno de Ansiedade devido a uma condição médica; 9) Transtorno de Ansiedade induzido por substância/medicamentos; 10) Outro Transtorno de Ansiedade especificado; 11) Transtorno de Ansiedade não especificado.

Neste trabalho daremos enfoque somente ao Transtorno de Ansiedade Generalizada e Transtorno do Pânico, sendo que ambos são de duas a três vezes mais prevalentes em mulheres (Paul and Lowry 2013).

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

Já o Transtorno de Pânico é descrito como resposta de medo a uma ameaça iminente ou percebida, hipervigilância, angústia, comportamento de fuga frente ao perigo, excitação autonômica, como taquicardia, náusea e/ou dificuldade para respirar. Os ataques de pânico são instantes de medo ou desconforto intenso, acompanhado por sintomas físicos e/ou cognitivos, e podem ocorrer devido estímulos temidos ou inesperados (American Psychiatry Association 2013, Paul and Lowry 2013).

Em relação à memória, Chaves (Chaves 1993) afirma que a memória, vista pelo aspecto comportamental, pode ser definida como “uma modificação mais ou menos permanente das relações do organismo com o seu meio, que ocorre como resultado da prática, da experiência e/ou observação. O aprendizado é a aquisição dessas modificações. Para se chegar à memória é preciso aprendizagem, e para que haja aprendizagem é necessário o envolvimento da capacidade de perceber. A percepção, por sua vez, não requer apenas mecanismos de coerência, mas também mecanismos de memória, memória aqui também definida como um saber prévio consciente do objeto, que provoca uma modificação duradoura no aparelho neural. Pode ser demonstrada pelo reconhecimento de eventos ou fatos prévios e pela sua recordação”.

Nesse sentido, outros autores também confirmam que a aprendizagem é um fator indispensável para a retenção da memória, no entanto, acrescentam que estados basais

individuais e as experiências vividas e sentidas no momento em que algo é aprendido também participam do processo de formação da memória. Dessa forma, estados emocionais como medo, ansiedade e aversão podem modular (melhorando ou dificultando) a formação da memória (Asth, Lobão-Soares et al. 2012, Canto-de-Souza, Garção et al. 2015). Assim como ocorre nos transtornos de ansiedade, distúrbios de memória também são mais comumente encontrados em mulheres do que em homens (Al-Rahbi, Zakaria et al. 2013).

1.6. Núcleo dorsal da rafe e receptores de estradiol

O núcleo dorsal da rafe (NDR) é uma importante estrutura encefálica relacionada à fisiopatologia dos transtornos de ansiedade generalizada e pânico. Situado na linha média do mesencéfalo, é considerado como a principal fonte de projeções serotoninérgicas para o sistema límbico (Pobbe, Zangrossi et al. 2011, Spiacci, Coimbra et al. 2012).

Deakin e Graeff (Deakin and Graeff 1991), propuseram que o NDR seria uma estrutura formada por sub-regiões com distinções morfológicas e funcionais e, por isso, controlariam comportamentos defensivos distintos. Confirmando a teoria de Deakin e Graeff, constatou-se que os neurônios serotoninérgicos das sub-regiões dorsal e caudal do NDR ativam a amígdala e o córtex pré-frontal, favorecendo a resposta à perigos potencias e distais, facilitando a esquiva inibitória, estando, assim, relacionada à ansiedade generalizada; enquanto a liberação de serotonina na substância cinzenta periaquedutal (PAG) dorsal originada das asas laterais do NDR inibem a expressão da resposta de fuga estimulada por um perigo proximal, que é um comportamento associado ao transtorno de pânico (Pobbe, Zangrossi et al. 2011, Spiacci, Coimbra et al. 2012, Paul and Lowry 2013). Além disso, hoje sabe-se que apesar da predominância de neurônios serotoninérgicos, o NDR possui neurônios não-serotoninérgicos que também atuam nas vias de controle das respostas comportamentais.

Como já mencionado anteriormente, o estradiol também participa da modulação das respostas comportamentais e cognitivas. Alguns autores (Shughrue, Lane et al. 1997, Mitra, Hoskin et al. 2003) demonstram em seus respectivos trabalhos a existência de alta densidade de receptores de estradiol no NDR, principalmente do tipo β . Sabe-se que, em relação à ansiedade, a ativação do $ER\beta$ exerce efeitos ansiolíticos, enquanto que a ativação do $ER\alpha$ exerce efeitos ansiogênicos (Lund, Rovis et al. 2005, Donner and Handa 2009, Clark, Alves et al. 2012). A predominância de $ER\beta$ no NDR sugere que o estradiol atua sobre esta estrutura participando das respostas de controle da ansiedade.

Devido a maior prevalência de disfunções comportamentais em mulheres em consequência de flutuações da concentração plasmática de estradiol, e situações de RA ainda agravarem o quadro por reduzirem os níveis de estradiol circulante torna-se importante a investigação do mecanismo e dos componentes associados ao controle destas respostas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a influência do estradiol no núcleo dorsal da rafe sobre transtornos de ansiedade em ratas submetidas à restrição alimentar.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar se a restrição alimentar altera o peso uterino, indicando alteração nos níveis de estradiol;

Avaliar a influência da restrição alimentar sobre o ciclo estral das ratas gf.

Avaliar se a restrição alimentar promove transtornos de ansiedade, do tipo ansiedade generalizada e/ ou pânico, e se provoca alterações na memória;

Avaliar o efeito da microinjeção de estradiol no NDR sobre o comportamento e memória das ratas controle e ratas submetidas à restrição alimentar;

Avaliar o efeito da restrição alimentar e da microinjeção de estradiol no NDR sobre a atividade locomotora de ratas;

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo animal

Neste trabalho utilizamos 44 ratas Fischer com peso entre 200 e 220g cedidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA. Os animais retirados do CCA foram levados para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Antes de iniciar os experimentos, os animais permaneceram dois dias no biotério de experimentação para ambientalização, em gaiolas coletivas com dimensões de 41x34x17cm (3 animais/gaiola) e passado esse período foram alojados em gaiolas individuais de 30x19x13 cm durante todo o período de tratamento dietético e protocolo experimental. Os animais foram mantidos a uma temperatura média de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de doze horas, e todos os animais receberam água *ad libitum*. A comida foi oferecida conforme o grupo experimental. O grupo Controle recebeu ração *ad libitum* e o grupo restrição alimentar (RA) recebeu 60% a menos de ração que a média consumida pelo grupo Controle. Os animais ficaram acondicionados dessa maneira por 14 dias até a realização do primeiro dia de protocolo experimental, passando por procedimento cirúrgico no 7º dia de protocolo dietético. A restrição alimentar foi mantida durante os dias de realização dos protocolos experimentais, totalizando 16 dias de controle dietético.

Todos os procedimentos foram realizados com a devida aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP nº 2013\34, de acordo com as diretrizes da Lei 11.794 (Lei Arouca) e com os regulamentos determinados pelo Guia de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório do *National Research Council, EUA*.

3.2. Restrição alimentar

O modelo de restrição alimentar escolhido é o mesmo já utilizado em nosso laboratório em trabalho prévio (Souza, de Menezes et al. 2015), baseado na oferta de ração ao grupo em restrição alimentar de 40% da ingestão média da ração consumida pelo grupo controle durante 14 dias. Assim, os animais controle consumiram diariamente 15 g de ração, enquanto cada animal do grupo RA recebeu 6g de ração por dia durante este período até o fim dos procedimentos experimentais. Ou seja, realizou-se uma restrição alimentar de 60% de calorias, micro e macro nutrientes. Todos os animais foram tratados com ração comercial Nuvilab®.

3.3. Preparo de drogas/substâncias utilizadas

PBS(veículo) - Salina tamponada com fosfato; pH 7,2: solução preparada pela diluição de 8,18g de NaCl P.A., 1,98 g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,26 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000,0 mL. Ajustou-se o pH da solução para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação 120°C e 1,0 16 Kg/cm² durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina): solução preparada pela adição de 2 mL de Xilazina 2% (p/v) a 10 mL de Ketamina 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; *i.m.*).

Anestésico Local – Cloridrato de Lidocaína 2%: Utilizada na região tricotomizada precedente a estereotaxia. .O animal recebeu uma injeção subcutânea de 0,1ml de cloridrato de lidocaína 2% diluído em 0,3ml de PBS. (Rhobifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia – São Paulo).

Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]: empregado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado da seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; *s.c.*).

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário): utilizado na prevenção de infecções, na seguinte dose: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; *s.c.*

Estradiol: Diluído em PBS até atingir a concentração utilizada neste trabalho (0,5 pmol/100nl), separado em alíquotas de 10 µL e mantido congelado a -4°C.

Paraformaldeído 0,1M a 4%: Para utilização no procedimento de perfusão transcardíaca e na preparação para histologia, foi preparada uma solução de paraformaldeído 4%. Inicialmente aqueceu-se 450 ml de água destilada num becker até 80°C. Em seguida, acrescentou-se 40g de

paraformaldeído em pó (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH Brasil), mantendo sob agitação e sempre aquecida. Depois, acrescentou-se 2 ou 3 gotas de NaOH 1M, agitando, até que ficasse transparente. Logo depois, esta mistura foi adicionada à 500 ml de PB 0,1M, em uma proveta de 1000ml. O volume restante foi completado com água destilada.

Sacarose 20%: Para crioproteção dos cérebros e posterior processamento no criostato, foi preparada uma solução de sacarose 20%. Colocou-se 20g de sacarose em uma proveta de 21 100 ml; o volume foi completado com PB 0,1M e, em seguida, manteve-se a agitação da solução, até a completa dissolução da sacarose. A solução foi armazenada em geladeira a 4°C.

3.4. Confeção das cânulas-guia e cânula injetora

As cânulas-guia (CG) foram confeccionadas utilizando-se agulha 23G, ajustadas através de eletrocorrosão até o comprimento de 15 mm. Já as cânulas injetoras foram confeccionadas a partir da agulha gengival 30G e ajustadas a 16 mm, também através de eletrocorrosão. Assim, no momento da microinjeção, a extremidade da injetora permanecia 1,0 mm abaixo da extremidade da CG, correspondendo à região do núcleo dorsal da rafe (NDR), de acordo com as coordenadas utilizadas (ver item 3.5.1).

3.5. Cirurgia

3.5.1. Implante de cânula-guia no núcleo dorsal da rafe

Com o auxílio de um aparelho estereotáxico (StoeltingCo., Illinois, EUA), implantamos a CG de 15 mm em direção ao NDR. Para isso, anestesiámos os animais com solução anestésica de Ketamina e Xilazina (i.m.) e, em seguida, tricotomizamos a região entre os pavilhões auditivos e os olhos, acomodamos e fixamos os animais no estereotáxico com a barra dental a 3,3mm abaixo da linha interaural. A região tricotomizada foi submetida à assepsia com povidona-iodo (PVPI) degermante e, após foi realizada injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado à epinefrina, para provocar uma vasoconstrição local. A região superior do crânio foi exposta a partir de uma incisão mediana dois orifícios foram realizados para a fixação de parafusos de aço inoxidável no crânio dos animais para ancoragem da CG. A torre do estereotáxico foi angulada em 28° e a cânula-guia foram posicionadas usando o bregma

como referência de acordo com as coordenadas estereotáxicas segundo Paxinos e Watson, 2007, para o NDR: 8,0 mm posterior, 2,8 mm lateral e 4,8 mm ventral. Foram utilizados esses mesmos parâmetros em todos os grupos estudados. Em sequência, foi realizado o orifício para o implante da CG. Introduzimos a CG e fechamos a abertura cirúrgica com resina odontológica (acrílico dental polimerizável). Com o intuito de evitar a obstrução da CG, introduzimos um oclisor de aço inoxidável de mesmo comprimento da CG (15mm). Feito isso, os animais foram submetidos a cuidados pós-operatórios (ver item 3.5.2) e passaram por um período de recuperação de 7 dias.

3.5.2. Cuidado pós-operatório

Ao final de cada procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção *s.c.* de cetoprofeno (Ketoflex®) e uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário - Fort Dodge, São Paulo, Brasil) para prevenção de inflamações e infecções. As ratas foram alocadas em suas gaiolas individuais e mantidas sobre manta térmica, até a passagem completa do efeito do anestésico, a fim de evitar hipotermia. Posteriormente, os animais foram mantidos no biotério de experimentação sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados, com dieta de acordo com o protocolo previamente estabelecido e água *ad libitum*.

3.7. Testes comportamentais

Os testes comportamentais utilizados são baseados no medo inato que os ratos apresentam de altura e espaços abertos, provavelmente por não conseguirem realizar tigmotaxia com suas vibrissas (Zangrossi and Graeff 2014). O labirinto em T elevado é um aparato que permite a avaliação de dois tipos de ansiedade: transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico (aqui tratados apenas como ansiedade e pânico), através da observação do comportamento de esquiva inibitória, que é relacionada à ansiedade por caracterizar-se como um comportamento de exploração cautelosa frente à ameaça potencial (incerto), e fuga, que é considerada como a reação defensiva do animal frente ao perigo proximal (real) (Spiacci Junior 2012, Silva, Pereira et al. 2014). Já o campo aberto foi utilizado neste trabalho com o intuito de verificar a atividade locomotora dos animais após o protocolo de restrição alimentar e microinjeção de drogas. Todos os testes foram realizados segundo procedimento padrão

descrito na literatura (Zangrossi, Viana et al. 2001, Roncon, Biesdorf et al. 2012, Silva, Pereira et al. 2014) e filmados para posterior análise e confirmação dos resultados.

3.7.1. Aparatos

3.7.1.1. Labirinto em T elevado (LTE)

O LTE utilizado é constituído por três braços de dimensões iguais (50 cm x 12 cm) de madeira e pintado de branco. Um dos braços é fechado por paredes de 40cm de altura e os outros dois são abertos e perpendiculares a este. Para evitar quedas, os braços abertos são cercados por bordas de acrílico transparente de 1 cm. O aparato possui uma base de 50 cm de altura, para que o mesmo fique elevado em relação ao solo.



Figura 1: LTE (Insight[®]) utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga.

3.7.1.2. Campo aberto (CA)

O CA consiste em uma arena retangular de plástico, medindo 38 cm x 31 cm e paredes de 23 cm de altura. A base do CA foi subdividida em 16 retângulos (9,5 cm x 7,75 cm), permitindo que a análise do teste seja realizada através da contagem de número de retângulos percorridos por cada animal.



Figura 2: Campo aberto utilizado para teste de atividade locomotora.

3.7.1.3. Iluminação da sala e limpeza dos aparatos

Os testes comportamentais foram realizados sob luz alta e os aparatos foram higienizados com álcool 20% ao final dos testes com cada animal.

3.7.2. Protocolo experimental

3.7.2.1. Habituação

Os animais passaram pelo procedimento de habituação ao experimentador por 5 minutos durante dois dias consecutivos (Zangrossi, Viana et al. 2011, Roncon, Biersdorf et al. 2012, Silva, Pereira et al. 2014) antes do início dos procedimentos experimentais (12^o e 13^o dias de protocolo dietético). Como os testes comportamentais são extremamente sensíveis e exigem rigoroso controle do ambiente, torna-se necessário habituar o animal ao experimentador para que o contato entre eles durante os testes não interfiram no comportamento do animal, o que alteraria os resultados.

3.7.2.2. Pré-exposição

No dia seguinte aos dois dias de habituação (14^o dia de protocolo dietético), cada rata foi pré-exposta a um dos braços abertos do LTE por 30 minutos. Uma barreira foi colocada no final do braço aberto, antes da plataforma central, isolando este braço e impedindo que a rata tivesse acesso ao restante do labirinto. Segundo a literatura (Silva, Pereira et al. 2014, Zangrossi and Graeff 2014), este procedimento é realizado para reduzir a latência de saída do braço aberto e aumentar a sensibilidade às drogas durante o teste de fuga.

3.7.2.3. Testes de esquiva inibitória e fuga no Labirinto em T Elevado e de atividade locomotora no Campo Aberto

No dia seguinte à pré-exposição (15^o dia de protocolo dietético), foram realizados os testes comportamentais no LTE e campo aberto. As drogas utilizadas neste trabalho (veículo ou estradiol) foram administradas 20 minutos antes do início dos testes, de acordo com o grupo experimental.

O primeiro teste realizado foi o de esquiva inibitória. Este teste avalia a ansiedade do animal de acordo com o tempo que ele leva para realizar a esquiva inibitória, sendo que, quanto mais longo for este tempo, mais ansioso o animal é considerado. Tal teste consistiu em colocar o animal na extremidade distal do braço fechado de frente para a plataforma central. Cronometrou-se o tempo gasto por cada rata para sair do braço com as quatro patas em 3 tentativas consecutivas (linha de base, esquiva 1 e esquiva 2), com um intervalo de 30 segundos entre cada.

Para a verificação do comportamento de fuga, observado através da latência de saída do braço aberto (quanto menor for esta latência, maior é a resposta de pânico), o animal foi colocado na extremidade distal de um dos braços abertos de frente para a plataforma central e cronometrou-se o tempo em que ele levou para sair deste braço com as quatro patas em 3 tentativas consecutivas (fuga 1, fuga 2 e fuga 3), com intervalo de 30 segundos. O tempo limite para o animal realizar cada tentativa de ambos os testes foi de 300 segundos.

A seguir, o animal foi colocado no centro do campo aberto para observação da sua atividade locomotora durante 300 segundos. A atividade locomotora foi mensurada através da contabilização do número total de retângulos percorridos ou atravessados por cada rata. Ao final desse tempo, o animal foi colocado de volta no biotério de experimentação.

3.7.2.4. Teste de memória

Vinte e quatro horas após os testes no LTE e CA foi realizado o teste de memória com os mesmo animais que executaram os testes no dia anterior. Primeiramente cumpriu-se o teste de esquiiva inibitória (1 tentativa) e após intervalo de 30 segundos, foi realizado o teste de fuga (1 tentativa). O procedimento de ambos os testes foi o mesmo utilizado no dia anterior.

3.8. Procedimentos das microinjeções

Para a microinjeção de veículo ou estradiol foram utilizadas cânulas injetoras de 16 mm conectadas a um tubo de polietileno (Norton, 0.010) e a uma seringa Hamilton de 5 µL preenchida com água deionizada. O polietileno foi preenchido com a solução a ser microinjetada, e entre a água deionizada e a substância contida no polietileno formou-se uma pequena bolha. A cânula injetora foi introduzida na cânula-guia e as soluções de teste foram injetadas com os respectivos volumes (100 nl de veículo ou 0,5 pm/100 nl de estradiol). Durante a administração das substâncias, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Após a retirada da cânula injetora a mesma foi testada, simulando a microinjeção e a observação de saída de líquido pela injetora, para verificar possíveis obstruções.

3.9. Procedimentos histológicos

Ao término dos Protocolos Experimentais, injetamos 100 nL do corante Comassie blue (1µL, 2%), no sítio de microinjeção no NDR, para subsequente confirmação histológica. Anestesiámos os animais com o dobro da quantidade de solução de Ketamina + Xilazina (descrito no item 3.3), submetendo-os a uma toracotomia para a exposição do coração. Através de punção cardíaca, realizamos a perfusão com solução salina (0,9%), seguida de solução de paraformaldeído tamponado (4%). Posteriormente, retiramos e fixamos o cérebro em solução de formaldeído tamponado 4% por 48 horas. Após este período, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% (diluído em água deionizada) permanecendo por 24 horas. Cortes coronais, na região do NDR, com a espessura de 50 µm foram obtidos com o auxílio de um Criostato (Leica CM 1850, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas de histologia

previamente gelatinizadas, corados com vermelho neutro (1%) e posteriormente examinados por microscopia óptica.

3.10. Pesagem do útero

Após a perfusão transcardíaca descrita no item anterior (3.9), o útero também foi retirado e pesado para determinação do peso úmido, e em seguida colocado na estufa à 50°C por 72 horas para obtenção do peso seco do órgão.

3.11. Avaliação do ciclo estral

Por ser um trabalho desenvolvido com fêmeas e com o objetivo de avaliar a influência de hormônios femininos, mais especificadamente o estradiol, no comportamento desses animais, torna-se necessário observar a fase do ciclo em que cada rata se encontra no momento do experimento. O ciclo foi determinado conforme descrito por Marcondes e colaboradores (Marcondes, Bianchi et al. 2002). Os animais foram segurados pelo dorso e com a utilização de uma pipeta, inseriu-se a ponteira no orifício vaginal e coletou-se a secreção vaginal com 10µL de PBS. A secreção retirada foi colocada em uma lâmina higienizada e em seguida visualizada no microscópio na lente objetiva de 40x. Para cada tipo de célula encontrada no esfregaço vaginal há um ciclo correspondente. Quando se observa células epiteliais classifica-se no proestro, células corniformes a fase é o estro, havendo leucócitos a fase do ciclo é diestro, e quando há um pouco de cada célula a fase é o metaestro.

3.12. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos tiveram uma análise não pareada. Na comparação de duas médias utilizamos o teste *t* de Student, que foram anteriormente avaliados se eram dados paramétricos ou não pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Já na comparação de mais de duas médias com uma variável utilizamos o teste de variância ANOVA oneway com pós-teste de Tukey. Para comparação de mais de duas médias e duas variáveis, usamos ANOVA two way com pós-teste de Bonferroni, e quando necessário, utilizamos teste *t* de Student não pareado. Consideramos o nível de significância menor que 0,05 e todos os valores para testes paramétricos foram expressos com média ± EPM.

4.RESULTADOS

4.1. Confirmação dos sítios de microinjeção

A figura 3 mostra um corte histológico do cérebro de uma das ratas utilizadas no presente trabalho confirmando o local de microinjeção no NDR dorsal/caudal (cerca de 75% dos animais considerados) e NDR lateral (aproximadamente 25% dos animais considerados no estudo).

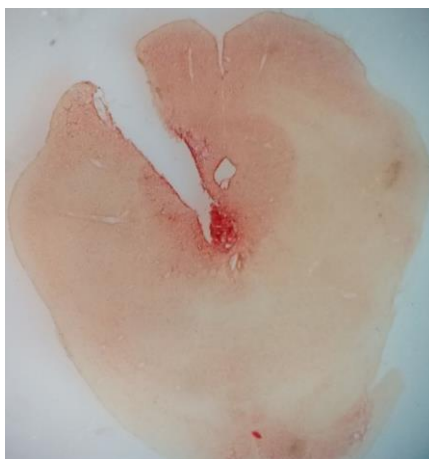


Figura 3: Fotomicrografia do corte histológico confirmando o local de microinjeção no NDR.

4.2. Peso corporal e peso uterino dos grupos Controle e RA

O protocolo dietético utilizado consiste na redução de 60% da ingestão média do grupo controle. Devido a esta redução, os animais do grupo RA perderam cerca de 20% do peso corporal no final de 14 dias de restrição (C: 205,7 g \pm 1,51, n=19 vs. RA: 168g \pm 2,93, n=25, $p < 0,001$, ANOVA one way, pós-teste de Tukey) (Figura 4). O protocolo dietético foi iniciado com as ratas de ambos os grupos apresentando peso semelhante (C: 207,9 g \pm 1,6, n=19 vs. RA: 208,3 g \pm 1,52, n=25, $p < 0,001$, ANOVA one way, pós-teste de Tukey), e apenas as do grupo RA manifestaram perda significativa de peso.

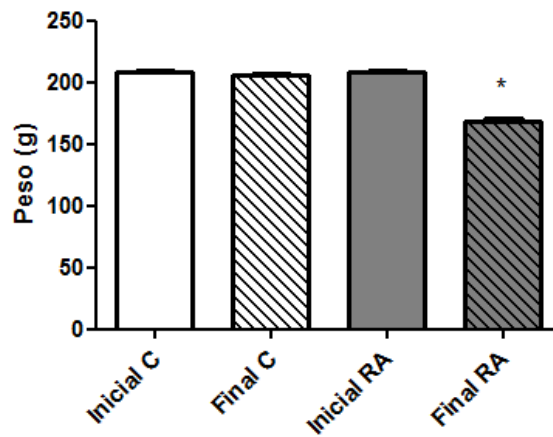


Figura 4: Variação do peso corporal inicial e final das ratas controle (n=19) e submetidas à 14 dias de restrição alimentar (n=25). * Diferença estatística entre Final RA e os demais grupos; ANOVA one way, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Outro parâmetro que utilizamos para observar as alterações causadas por uma alimentação inadequada e insuficiente foi a comparação do peso uterino seco (Figura 5-A) e úmido (Figura 5-B) de ambos os grupos. Este método é usado como indicador da concentração de hormônios ovarianos. Sendo assim, verificamos que as ratas em RA apresentaram peso do órgão inferior ao das Controle tanto na análise do peso uterino seco absoluto (C: $0,1228 \text{ g} \pm 0,006$, $n = 17$ vs. RA: $0,078 \text{ g} \pm 0,004$, $n = 14$, $p < 0,0001$, teste *t* Student não pareado) como do úmido relativo (C: $0,3375 \text{ g} \pm 0,021$, $n = 14$ vs. RA: $0,2253 \text{ g} \pm 0,02$, $n = 8$, $p = 0,0023$, teste *t* Student não pareado), sugerindo que a RA reduziu a concentração dos hormônios ovarianos.

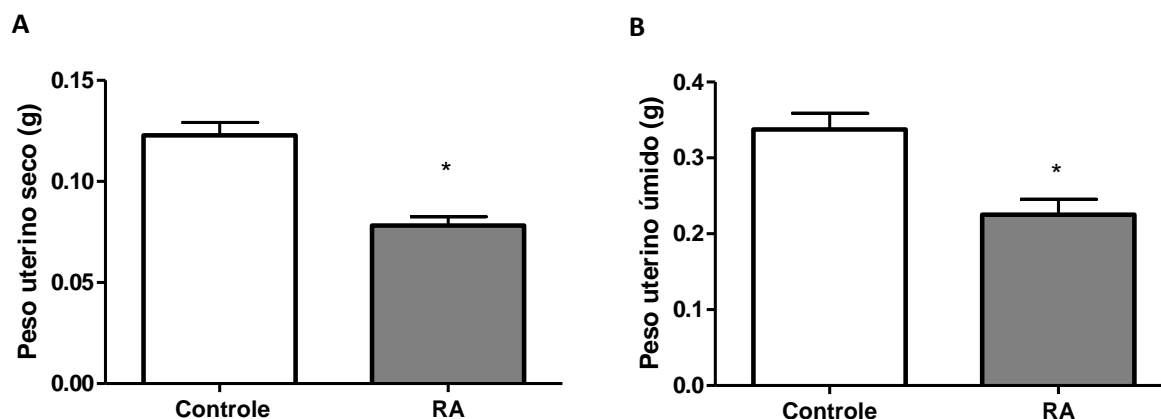


Figura 5: Comparação entre os valores de peso uterino de ratas controle e submetidas à restrição alimentar. (A) Peso uterino seco absoluto (n= C: 17, RA: 14). (B) Peso uterino úmido relativo (n= C: 14, RA: 8). * Diferença estatística entre Controle e RA por teste *t* Student não pareado, ($p < 0,05$).

4.3. Determinação da fase do ciclo estral durante o protocolo experimental

Logo após cada dia de experimento, avaliou-se a fase do ciclo estral que cada rata se encontrava. Pode-se perceber que foram encontrados animais do grupo Controle em diferentes fases do ciclo, tanto no 1º dia de experimento como no 2º dia. No entanto, as ratas em RA permaneceram apenas nas fases não ovulatórias do ciclo (metaestro e diestro) nos dois dias experimentais, indicando uma cessação do ciclo reprodutivo (Tabela 1).

	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	n Total
Controle					
Dia1	3	3	7	6	19
Dia2	1	4	5	9	19
Restrição					
Dia1	0	0	13	12	25
Dia2	0	0	11	14	25

Tabela 1: Fase do ciclo estral, determinada por esfregaço vaginal a fresco, apresentada pelas ratas utilizadas neste trabalho após cada um dos dois dias de experimento. n = C: 19; RA: 25.

4.4. Restrição alimentar e comportamento

4.4.1. Transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico

O primeiro experimento foi feito com intuito de observar o comportamento apresentado pelas ratas Controle e RA no LTE.

A figura 6 mostra a resposta ao teste de esquiva inibitória, onde não foi observada diferença entre os tempos de latência de saída do braço fechado pelas ratas Controle, enquanto as ratas em RA apresentaram aumento deste tempo ao longo das tentativas. Já em relação à comparação da dieta, verificamos diferença estatística entre os grupos ($F_{1,63} = 10,34$; $p = 0,0021$, ANOVA two way, pós-teste de Bonferroni), resultado que sugere que as ratas em RA expressaram comportamento mais ansioso do que as Controle, como visto na comparação das esquivas 1 (Esq 1), em que as RA apresentaram maior tempo de latência de saída do braço fechado que as Controle.

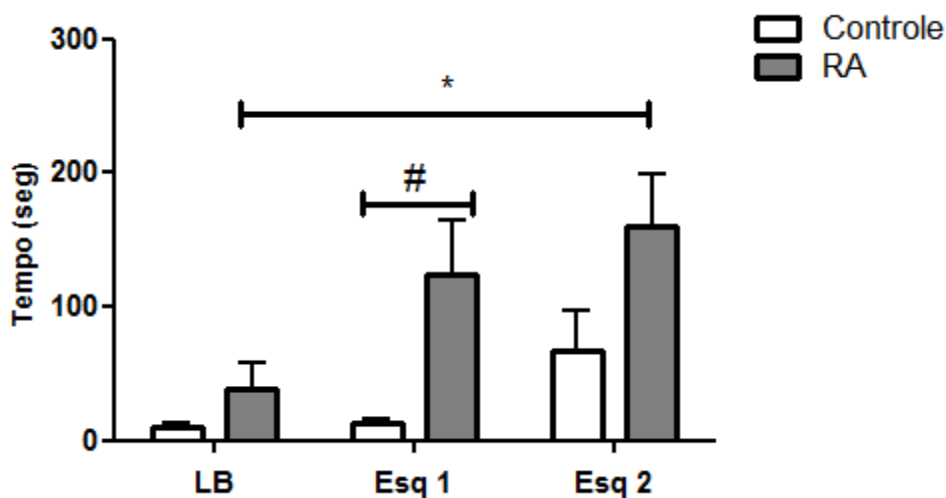


Figura 6: Teste de esquiva inibitória no LTE. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas controle ($n = 10$) e submetidas à restrição alimentar ($n = 13$). * Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo, por ANOVA one way, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). # Diferença estatística entre os grupos na mesma tentativa, ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Já a figura 7 mostra o comportamento das ratas no teste de fuga também realizado no LTE. Não houve diferença entre o tempo de latência de saída do braço aberto ao longo das tentativas dentro do mesmo grupo, assim como também não foi encontrada na comparação entre os grupos, indicando que a restrição alimentar não compromete a resposta de fuga, ou seja, estes animais não apresentam transtorno do tipo pânico.

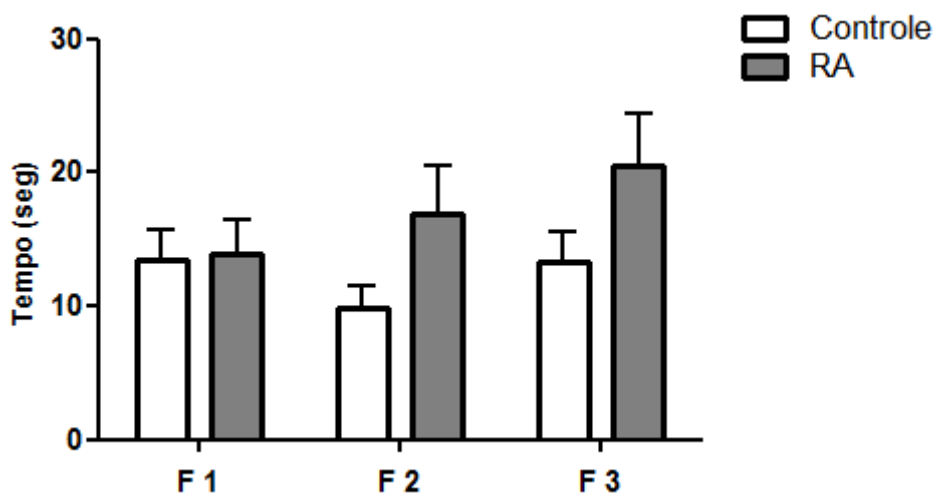


Figura 7: Teste de pânico no LTE. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas controle (n= 10) e submetidas à restrição alimentar (n= 13). ANOVA one way, com pós-teste de Tukey, e ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.4.2. Memória

No dia seguinte aos testes comportamentais demonstrados acima, foi realizado o teste de memória de esquiva inibitória (Figura 8-A) e fuga (Figura 8-B). Os tempos de latência de saída dos braços fechado e aberto, respectivamente, foram semelhantes para ambos os grupos, indicando que a restrição alimentar não afetou a memórias das ratas.

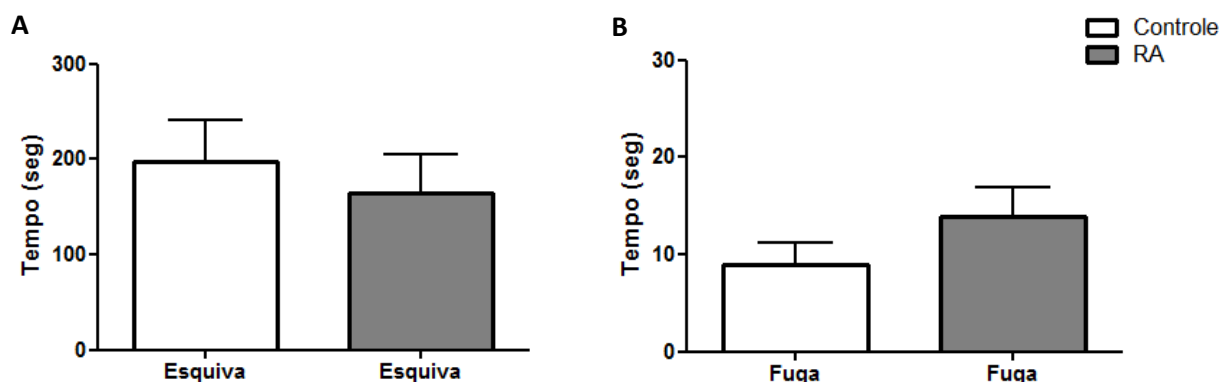


Figura 8: Teste de memória de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída dos braços fechado (A) e aberto (B) de ratas controle (n= 10) e submetidas à restrição alimentar (n= 13). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

4.5. Efeito da microinjeção de estradiol no NDR sobre o comportamento

4.5.1. Estradiol e ansiedade

Em seguida, em grupos separados, administramos 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR das ratas para verificar se este hormônio, que parece estar reduzido naquelas em RA, atua centralmente atenuando a ansiedade observada nestes animais.

Em relação aos tempos de latência de saída do braço fechado na comparação intra grupo, não foi observada diferença entre as respostas de esquiva ao longo das tentativas pelas ratas Controle, enquanto as RA apresentaram aumento da latência na esquiva 2 (Esq 2) (Figuras 10 e 11).

Já na comparação entre grupos, não observamos diferença entre as latências de esquiva pelo grupo Controle após o tratamento com veículo (Controle/Veículo) ou estradiol (Controle/Estradiol) (Figura 9). No entanto, verificamos que o estradiol diminuiu a latência de saída do braço fechado pelas ratas RA (RA/Estradiol) quando comparadas às RA que receberam veículo (RA/Veículo) (Figura 10) ($F_{2,65} = 3,86$; $p = 0,0002$, ANOVA two way, pós-teste de Bonferroni). Tal resultado indica que a microinjeção de estradiol no NDR abrandou o comportamento de ansiedade, atuando como fator ansiolítico nessas ratas que demonstraram redução dos hormônios ovarianos. Quando comparamos os grupos Controle e RA após a administração de estradiol (Controle/Estradiol e RA/Estradiol), notamos que as respostas de esquiva foram semelhantes (Figura 11).

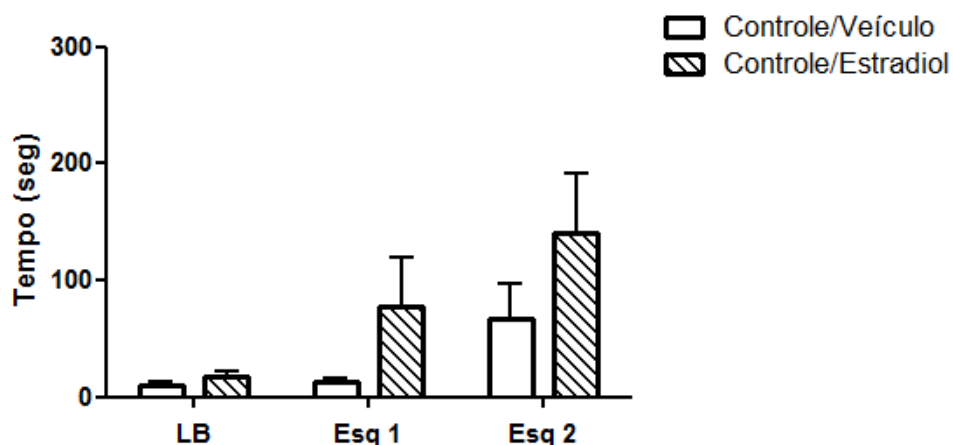


Figura 9: Teste de esquiva inibitória no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas Controle/Veículo (n= 10) e Controle/Estradiol (n= 9). ANOVA one way, com pós-teste de Tukey, e ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

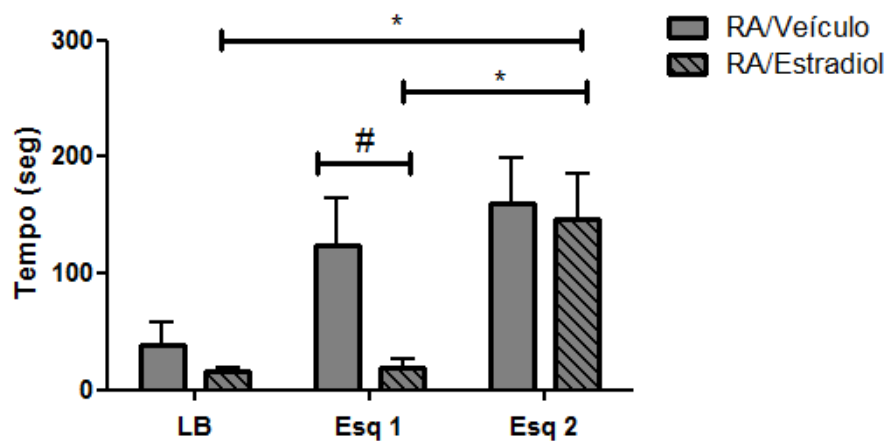


Figura 10: Teste de esquiva inibitória no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas RA/Veículo (n= 13) e RA/Estradiol (n= 12). * Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo, por ANOVA one way, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). # Diferença estatística entre RA/Veículo e RA/Estradiol por ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

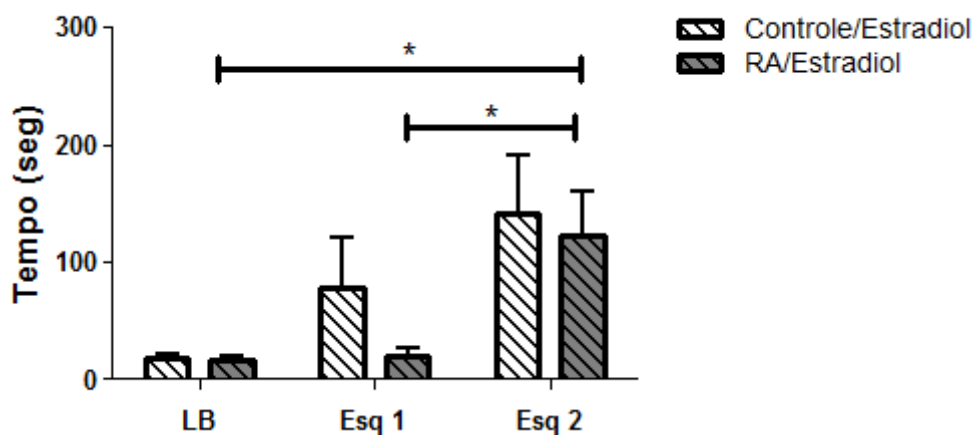


Figura 11: Teste de esquiiva inibitória no LTE após a microinjeção de 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2) de ratas controle (n= 9) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). * Diferença estatística entre as tentativas do mesmo grupo, por ANOVA one way, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.5.2. Estradiol e pânico

Em relação ao teste de fuga realizado no LTE, também não foram observadas alterações no comportamento de fuga das ratas Controle após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol (Controle/veículo e Controle/Estradiol) (Figura 12), bem como quando comparou-se os grupos RA que receberam as respectivas soluções (RA/veículo e RA/Estradiol) (Figura 13), o que também foi visto ao comparar os grupos Controle/Estradiol e RA/Estradiol (Figura 14).

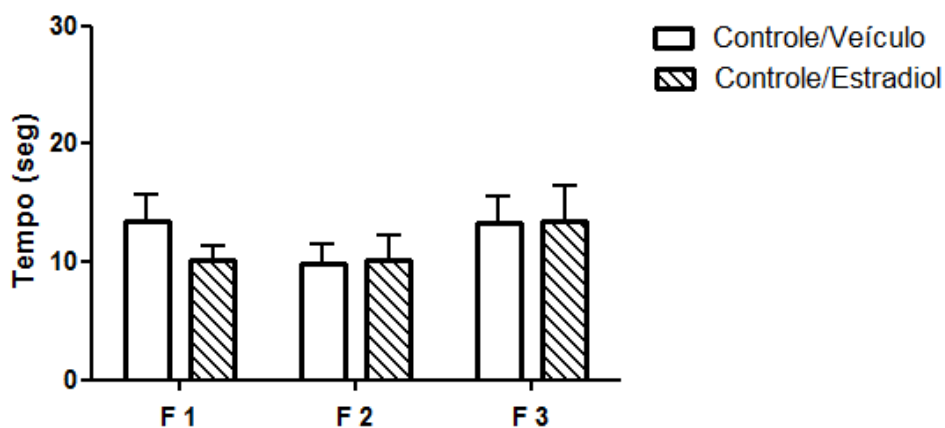


Figura 12: Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas Controle/Veículo (n= 10) e Controle/Estradiol (n= 9). ANOVA one way, com pós-teste de Tukey, e ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

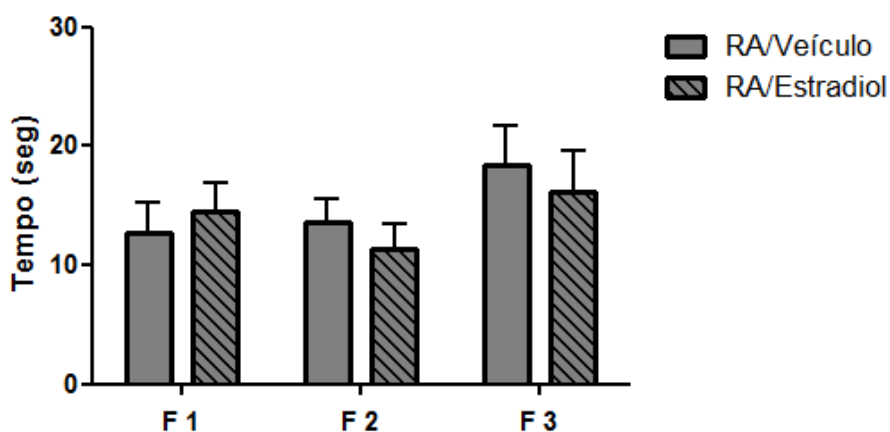


Figura 13: Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas RA/Veículo (n= 13) e RA/Estradiol (n= 12). ANOVA oneway, com pós-teste de Tukey, e eANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

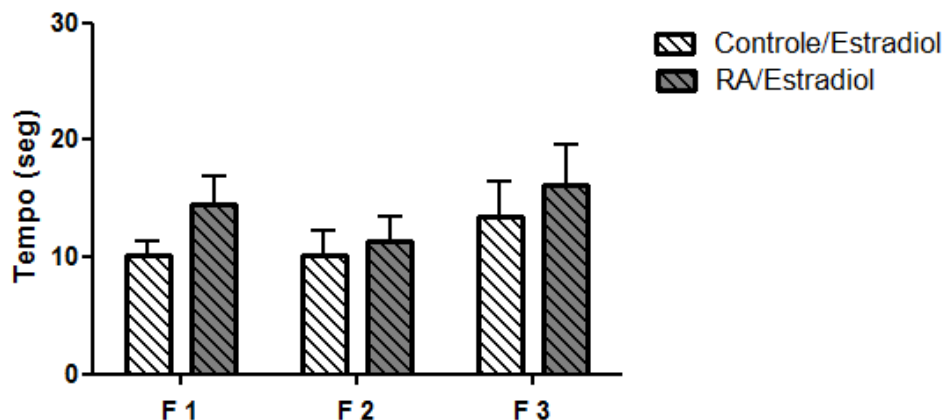


Figura 14: Teste de fuga no LTE após a microinjeção de 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3) de ratas controle (n= 9) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). ANOVA one way, com pós-teste de Tukey, e ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.5.3. Estradiol e memória

Assim como a restrição alimentar não causou prejuízos à memória de esquiva inibitória e fuga, a microinjeção de 0,5 pmol/100 nL de estradiol 24 horas antes do teste de memória também não provocou alterações na memória em ambos os testes, como pode ser visto nas figuras a seguir.

Nas Figuras 15, 16 e 17 mostramos o tempo de latência de esquiva inibitória realizada pelas ratas comparando-se os diferentes tratamentos. A Figura 15 compara o comportamento das ratas Controle 24 horas após a administração de veículo ou estradiol (Controle/Veículo e Controle/Estradiol), a Figura 16 mostra a respostas de esquiva das ratas RA 24 horas após a microinjeção das respectivas soluções (RA/Veículo e RA/Estradiol), enquanto Figura 17 compara as respostas ao estradiol entre os grupos Controle e RA (Controle/Estradiol e RA/Estradiol) 24 horas após a microinjeção da droga.

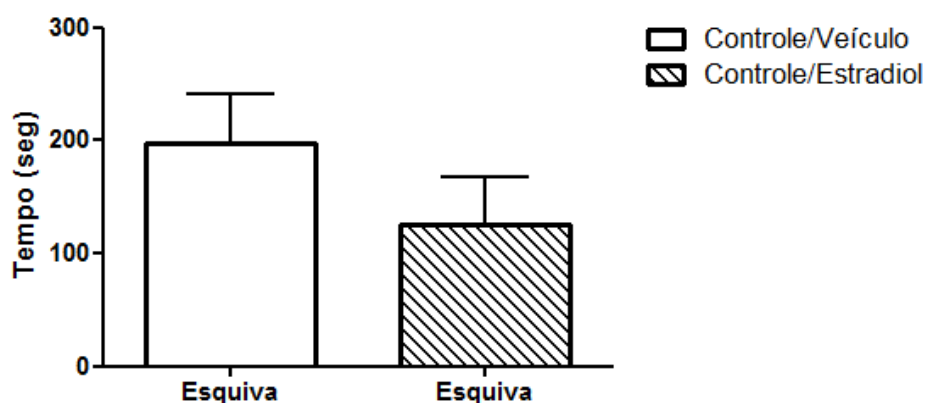


Figura 15: Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado de ratas controle (n= 10) e submetidas à restrição alimentar (n= 9). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

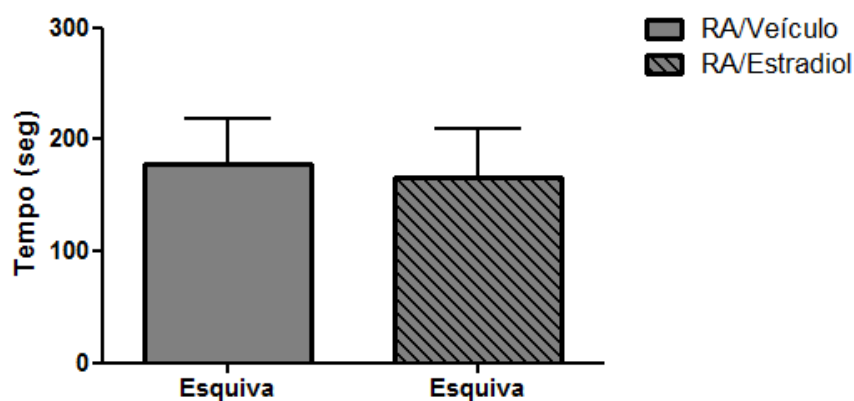


Figura 16: Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado de ratas controle (n= 13) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

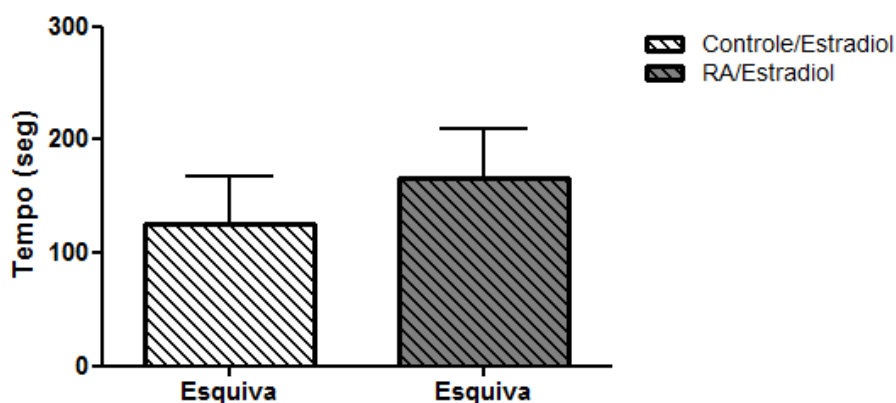


Figura 17: Teste de memória de esquiva inibitória no LTE 24 horas após a microinjeção 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado de ratas controle (n= 9) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

Já as Figuras 18, 19 e 20 mostram o tempo de latência de fuga realizada pelas ratas em relação aos diferentes grupos 24 horas após a administração dos tratamentos. A Figura 18 compara os grupos Controle/Veículo e Controle/Estradiol, enquanto a Figura 19 compara o comportamento das ratas RA/Veículo e RA/Estradiol Controle e a Figura 20 compara os grupos Controle e RA 24 horas após a microinjeção de estradiol (Controle/Estradiol e RA/Estradiol).

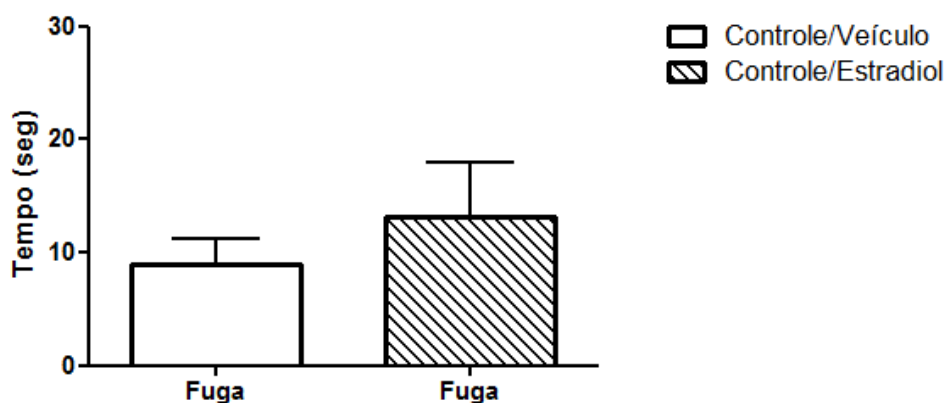


Figura 18: Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços fechados de ratas controle (n= 10) e submetidas à restrição alimentar (n= 9). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

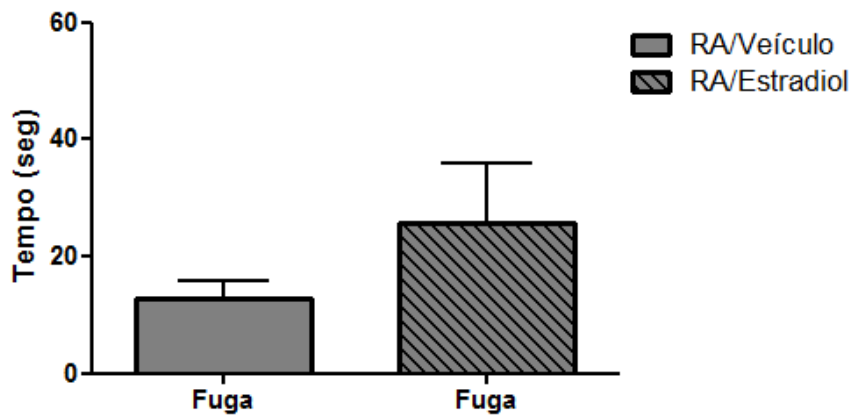


Figura 19: Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção de 100 nL de veículo ou 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços fechados de ratas controle (n= 13) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

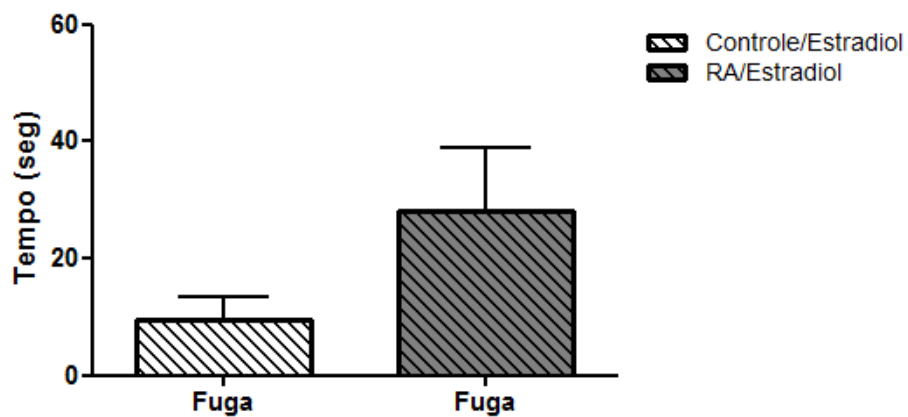


Figura 20: Teste de memória de fuga no LTE 24 horas após a microinjeção 0,5 pmol/100 nL de estradiol no NDR de ratas Controle e RA. Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos de ratas controle (n= 9) e submetidas à restrição alimentar (n= 12). Teste *t* Student não pareado ($p < 0,05$).

4.6. Atividade locomotora

Após a execução dos testes de esquiva inibitória e fuga no LTE, as ratas foram colocadas no CA para observação da atividade locomotora de cada grupo experimental. A tabela 2 apresenta a média de retângulos percorridos por cada grupo após a administração de veículo ou estradiol no NDR. Nota-se que as ratas Controle são mais ativas que as RA (Controle/Veículo: $97,6 \pm 8,4$, $n = 10$ vs. Controle/Estradiol: $97,22 \pm 6,79$, $n = 9$ vs. RA/Veículo: $74,77 \pm 3,31$, $n = 13$ vs. RA/Estradiol: $69,33 \pm 5,21$, $n = 12$, $p = 0,0014$, ANOVA one way, com pós-teste de Tukey), no entanto, não houve diferença no número de retângulos percorridos pelas ratas que receberam estradiol ou veículo dentro do mesmo grupo.

Grupo	Média de retângulos percorridos
Controle/Veículo	$93 \pm 26^{b,d}$
RA/Veículo	$71 \pm 12^{a,c}$
Controle/Estradiol	$105 \pm 20^{b,d}$
RA/Estradiol	$75 \pm 18^{a,c}$

Tabela 2: Teste de atividade locomotora no CA a partir da média de retângulos percorridos por cada grupo experimental. ^a Diferença entre o grupo Controle/Veículo ($n = 10$) e os demais grupos. ^b Diferença entre o grupo RA/Veículo ($n = 13$) e os demais grupos. ^c Diferença entre o grupo Controle/Estradiol ($n = 9$) e os demais grupos. ^d Diferença entre o grupo RA/Estradiol ($n = 12$) e os demais grupos. ANOVA one way, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos se restrição alimentar seria capaz de causar disfunções comportamentais e cognitivas, mais especificamente, transtornos de ansiedade e pânico e comprometimento da memória, e ainda se promoveria redução dos níveis de estradiol. Além disso, verificamos a influência do estradiol sobre o NDR na modulação destas disfunções. Nesse sentido, mostramos que o modelo de restrição alimentar foi eficiente em aumentar a resposta de esquiva inibitória no LTE, porém não alterou o comportamento de fuga e não prejudicou a memória. Além disso, a RA foi capaz de reduzir o peso uterino e interromper o ciclo reprodutivo, sugerindo redução da síntese e liberação de estrógenos. A administração de estradiol no NDR foi eficaz em reduzir o tempo de esquiva inibitória realizado pelas ratas em RA, apontando a participação deste hormônio no controle das respostas comportamentais.

O modelo de restrição alimentar utilizado neste trabalho é reconhecido na literatura como modelo para estudo na anorexia. A maior crítica, no entanto, feita a esta finalidade é que o fornecimento de ração é limitado pelo experimentador e não voluntariamente, como acontece nesta psicopatologia. Entretanto, as alterações fisiológicas, bioquímicas e endócrinas são semelhantes às que ocorrem em indivíduos anoréxicos, validando o modelo para este fim (Siegfried, Berry et al. 2003, Souza, de Menezes et al. 2015). Contudo, no presente trabalho utilizamos o modelo para avaliar e discutir as alterações comportamentais e hormonais causadas pela carência energética e de macro e micronutrientes, independente do motivo da adoção de uma restrição alimentar severa. Sendo assim, o modelo consistiu na redução de 60% da ingestão média normal durante 14 dias. Para isso, foi realizada a quantificação da ingestão alimentar de ratas Fischer em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (Souza, de Menezes et al. 2015), padronizando, em seguida, a oferta de 15 g de ração aos animais controle e 6 g aos submetidos à RA.

O trabalho foi desenvolvido com fêmeas pelo fato de investigarmos a influência do estradiol (hormônio sexual feminino) sobre as alterações comportamentais. Ademais, alguns autores admitem que a falha de muitas medicações, como ansiolíticos e antidepressivos, são devido, entre outros fatores, a maioria dos testes experimentais serem realizados em machos e, no entanto, a prevalência destes distúrbios é maior em mulheres, tornando-se imprescindível a realização de testes em fêmeas (Zangrossi and Graeff 2014).

A restrição de 60% da ingestão média das ratas reduziu o peso corporal das mesmas em aproximadamente 20% no final de 14 dias. Resultados semelhantes foram encontrados em

estudos que utilizaram o mesmo protocolo (Carr, Park et al. 1998, Souza, de Menezes et al. 2015). Esta alta porcentagem de perda de peso em um curto período de tempo é considerada um indicativo de processo de desnutrição, já que demonstra depleção do estado nutricional (Carter and Lynch 1994, Robin, Decrock et al. 2008, Souza, de Menezes et al. 2015).

Inúmeros estudos associam a RA a disfunções comportamentais (Mattar, Thiébaud et al. 2012, Gauthier, Hassler et al. 2014, Młyniec, Davies et al. 2014), bem como a redução dos níveis plasmáticos de estradiol à estas mesmas desordens comportamentais (Mendelsohn and Warren 2010, Cover, Maeng et al. 2014, Ikeda, Makino et al. 2015). Sendo assim, observamos o comportamento de esquiva inibitória, fuga e memória das ratas no LTE.

Em relação ao comportamento do tipo ansiedade, avaliado através da resposta de esquiva inibitória, verificamos que as ratas submetidas à RA apresentaram tempo de esquiva inibitória mais elevado que as Controle. Tal resultado sugere que estas ratas em privação alimentar manifestam comportamento mais ansioso que aquelas com acesso livre a alimentação, concordando com o que vem sendo proposto na literatura. Ainda não há consenso nos estudos clínicos e experimentais sobre a etiologia da ansiedade observada em casos de restrição alimentar. Discute-se se a mudança comportamental é consequência total, parcial ou, em alguns casos, a causa da redução da ingestão alimentar (Mattar, Huas et al. 2011, Mattar, Thiébaud et al. 2012, Gauthier, Hassler et al. 2014). No presente trabalho, demonstramos que a ansiedade apresentada pelas ratas é resultante da privação energética e nutricional, já que as ratas de ambos os grupos estavam sob as mesmas condições no período precedente ao início do protocolo dietético, bem como durante e nos posteriores dias experimentais. Młyniec e colaboradores (Młyniec, Davies et al. 2014) afirmaram que a RA provoca deficiência de vitaminas e minerais que são essenciais para o bom funcionamento do organismo, estando envolvidos na regulação da função celular, no crescimento e manutenção dos tecidos e neuromodulação. A carência desses elementos causa disfunções nos sistemas, e entre elas, as desordens comportamentais e cognitivas. Várias são as hipóteses para elucidar o mecanismo relacionado entre a carência nutricional e a ansiedade, entretanto, as mais fortes são referentes à: 1) consequente redução de estradiol (Misra, Katzman et al. 2013, Balasubramanian, Subramanian et al. 2014) e 2) a menor ingestão de triptofano, precursor da serotonina, que é um importante neurotransmissor envolvido no controle comportamental (Mattar, Huas et al. 2012, Mattar, Thiébaud et al. 2012, Gauthier, Hassler et al. 2014, Młyniec, Davies et al. 2014).

Nesse sentido, o peso uterino é um parâmetro largamente utilizado na literatura para avaliar a atividade ovariana em relação à síntese e liberação de estrógenos (Clark, Alves et al.

2012). Estudos demonstram que procedimentos que cessam a atividade endócrina do ovário, como ovariectomia (Jiang, Li et al. 2014, Monthakantirat, Sukano et al. 2014), reduzem consideravelmente o peso uterino, enquanto a administração de estradiol em ratas na pré-puberdade (Clark, Alves et al. 2012, Yao, Ehresman et al. 2014) e em outros modelos para otimizar a função estrogênica (Järvensivu, Saloniemi-Heinonen et al. 2015) elevam o peso do órgão. Nossos resultados confirmaram que a carência nutricional e energética causada pela RA de 60% reduz a atividade endócrina ovariana, já que houve redução do peso uterino nos dois métodos que avaliamos (peso uterino úmido relativo e peso uterino seco absoluto), indicando redução da produção de estrógenos. O estradiol (E2) é o principal hormônio secretado pelo ovário durante a vida reprodutiva das mulheres, em períodos não-gestacionais. Durante a gestação os subtipos predominantes de estrógeno são o estriol (3) e o estretol (4), enquanto na menopausa é a estrona (E1) (ter Horst 2010, Cover, Maeng et al. 2014). Considerando esta informação, pode-se inferir que a redução do peso uterino das ratas submetidas à RA ocorreu em consequência, principalmente, à diminuição da síntese e liberação de estradiol pelos ovários, visto que as fêmeas utilizadas neste trabalho encontram-se na fase jovem-adulta, ou seja, reprodutiva, porém não gravídica. A mesma constatação poderia ser feita em relação ao estriol e estretol e estrona em modelos nas fases gravídicas e na menopausa, respectivamente, que são os estrógenos mais prevalentes em cada uma destas fases.

Após o acompanhamento do ciclo estral nos dois dias consecutivos de experimento, pudemos notar que as ratas Controle apresentaram ciclo regular, com distribuição homogênea nas quatro fases do ciclo. Entretanto, todas as ratas em RA encontraram-se nas fases não-ovulatórias do ciclo (metaestro e diestro), sendo consideradas, portanto, em anestro. Esses resultados corroboram outros encontrados na literatura que associam a ingestão energética insuficiente a efeitos sobre a função reprodutiva, com supressão da ovulação e do ciclo estral (Klingerman, Williams et al. 2011, Kumar and Kaur 2013, Zhou, Zhuo et al. 2014, Souza, de Menezes et al. 2015). De fato, tem-se atribuído à restrição energética e de nutrientes a redução da liberação de LH e de GnRH, além de retardamento do desenvolvimento dos ovários (Kumar and Kaur 2013). Este resultado complementa o anterior, confirmando a redução da concentração plasmática de estradiol em ratas sob RA e sustentando o que já foi afirmado por outros pesquisadores, que o aporte insuficiente de energia reduz a síntese e liberação de estradiol, refletindo em anestro em ratas e amenorréia em humanas (Misra and Klibanski 2014).

A partir desses resultados, decidimos avaliar a participação do estradiol na NDR sobre os comportamentos que tem sido relacionados a de ansiedade e pânico nas ratas em restrição

alimentar. Para isso realizamos a microinjeção de estradiol no NDR e analisamos esses comportamentos nos animais controles e em restrição alimentar. Nós verificamos que o comportamento do tipo ansiedade observado nas ratas RA que receberam veículo não foi visto nas ratas RA em que foi administrado estradiol na NDR, indicando que este estrógeno atenuou a ansiedade nessas ratas, uma vez que o comportamento destas foi semelhante ao expressado pelas ratas controle. O estradiol, além de ser um hormônio sexual, é também um neuromodulador. Estudos mais recentes apontam que o estradiol é sintetizado por neurônios e atuam localmente nestas estruturas participando de vias de controle principalmente do tipo comportamental (Cover, Maeng et al. 2014, Ikeda, Makino et al. 2015). Como já citado anteriormente, o estradiol atua ligando-se a dois tipos de receptores, sendo que o $ER\alpha$ tem ação mais direcionada a funções reprodutivas, enquanto o $ER\beta$ está mais relacionado a não-reprodutivas, tais como comportamento e cognição, no entanto, os dois tipos de receptores são encontrados nos neurônios do SNC (Clark, Alves et al. 2012, Cover, Maeng et al. 2014). Shughrue e colaboradores (Shughrue, Lane et al. 1997), assim como Mitra e colaboradores (Mitra, Hoskin et al. 2003), demonstraram em seus trabalhos a existência de $ER\beta$ no NDR, principalmente nas sub-regiões dorsal, caudal e medial. Segundo Paul e Lowry (Paul and Lowry 2013), em revisão sobre a morfologia e funcionalidade dos sub-núcleos do NDR, as regiões dorsal e caudal são as mais relacionadas à modulação da ansiedade, com projeções para a amígdala basolateral (BLA). De fato, no presente trabalho cerca de 75% da microinjeção de estradiol foi realizada nestes núcleos, enquanto os outros 25% nas asas laterais, todavia o comportamento destas foi muito semelhante ao das outras 75%, por isso estas também foram consideradas no estudo.

Com isso, acreditamos que a redução de estradiol consequente da RA seja a responsável pelo comportamento do tipo ansiedade, e que este hormônio atua como neuromodulador sobre os receptores $ER\beta$ expressos no NDR, lembrando que este tipo de receptor é definido como ansiolítico na literatura. Assim, em concentrações adequadas de estradiol há controle da ansiedade via atuação sobre os $ER\beta$ no NDR, principalmente nas sub-regiões dorsal e caudal. Tais constatações justificam a mudança de humor e comportamento na fase pré-menstrual e na menopausa, que são períodos em que há redução abrupta dos níveis de estradiol (Sanchez, Reddy et al. 2010, Młyniec, Davies et al. 2014).

No entanto, o mecanismo exato pelo qual o estradiol participa da modulação da ansiedade via NDR em situações de privação alimentar ainda não foi elucidado. Como já visto, a RA influencia a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, reduzindo a síntese e

liberação de estradiol (Mendelsohn and Warren 2010). De acordo com Hiroi e colaboradores (Hiroi, McDevitt et al. 2011), os receptores de estradiol do tipo β são expressos no NDR apenas em neurônios serotoninérgicos. De fato, o estradiol atua sobre o sistema serotoninérgico, através da modulação da síntese e liberação de serotonina, do aumento da atividade da SERT (transportador de serotonina) e expressão de receptores serotoninérgicos, e ainda regula a frequência de disparo dos neurônios serotoninérgicos (Sanchez, Reddy et al. 2010, Dalmasso, Amigone et al. 2011). Corroborando com esses relatos, estudos demonstram que o estradiol aumenta a expressão da enzima limitante da conversão de triptofano em serotonina, a triptofano-hidroxilase 2 (TpH2), no NDR (Donner and Handa 2009, Hiroi, McDevitt et al. 2011). Ainda segundo este último estudo, foi encontrado um efeito ansiolítico após o aumento da TpH2 na sub-região caudal do NDR. Sabe-se que a liberação de serotonina pelos neurônios do NDR na BLA aumentam o comportamento do tipo ansiedade. O efeito ansiolítico do estradiol através desta via parece estar ligado ao fato deste estrógeno aumentar a expressão dos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}, que atua em seus auto-receptores no NDR com características inibitórias, o que causa redução da excitabilidade destes neurônios e, consequentemente, reduz a atividade da via (Andrade, Nakamuta et al. 2005).

Uma outra via que o nosso grupo tem proposto é em relação ao sistema renina angiotensina (SRA). Sabe-se que o estradiol interfere no SRA, via receptor ER β (Sandberg and Ji 2013), uma vez que sua presença está relacionada à baixas concentrações de angiotensina (ANG) II, receptores AT1 (receptores de ANG II) e ECA1 (enzima conversora de ANG I em ANG II), e aumento de ANG 1-7 e ECA2 (enzima conversora de ANG II em ANG 1-7) no SNC, sugerindo a importância deste hormônio na modulação do SRA (Xue, Zhang et al. 2014). Além disso, (Souza, de Menezes et al. 2015), mostraram que a RA aumenta a ação da ECA1, assim como a atividade do receptor AT1. Estudos prévios relatam que o aumento do comportamento do tipo ansiedade está relacionado ao aumento da atividade da via da ANG II, enquanto a maior atividade da via da ANG 1-7 está associada à efeitos ansiolíticos (Kangussu, Almeida-Santos et al. 2013). Ademais, já foi comprovada a existência de receptores AT1 no NDR (Lenkei, Palkovits et al. 1997) e MAS (receptor de ANG 1-7) na BLA (Becker, Etelvino et al. 2007), o que confirma a participação do SRA na modulação das respostas comportamentais, principalmente do tipo ansiedade. Assim, nós acreditamos que a RA reduz a síntese e liberação de estrógenos, mais especificamente de estradiol em fêmeas e mulheres em idade reprodutiva, que influencia a atividade do SRA, aumentando ação da via da ANG II, e o aumento desses componentes induz o comportamento de ansiedade. Esta via direta está sendo

proposta a partir de evidências encontradas por nosso grupo juntamente com outras já descritas na literatura, entretanto, ainda não foram realizados testes para confirmação deste mecanismo direto, havendo a possibilidade de ele ocorrer indiretamente, com ainda outros componentes participando de tal modulação.

Todavia, machos produzem estrógenos, assim como fêmeas também sintetizam testosterona. Em machos, os testículos sintetizam testosterona e essa é convertida em, predominantemente, estradiol pela enzima aromatase, e no mesmo sentido é a ocorrência em fêmeas, em que aromatase converte estrógenos em testosterona (Berne, Levy et al. 2008, Ikeda, Makino et al. 2015). Estes hormônios participam não só da função reprodutora, como também são essenciais em outras funções fisiológicas, entre elas o controle das respostas comportamentais e cognitivas. Em relação ao SNC, a aromatase é encontrada em ambos os sexos em diversas estruturas encefálicas relacionadas à emoção e comportamento, tais como hipotálamo, amígdala, hipocampo, córtex e núcleos mesencefálicos, entre eles o NDR, evidenciando a importância do estradiol como neuromodelador em machos (Cover, Maeng et al. 2014). Os homens apresentam uma quantidade inferior de estradiol em relação às mulheres, uma vez que nestas o estradiol é sintetizado pelo ovário, enquanto em homens é obtido através da conversão da testosterona. No entanto, como já discutido, a maior prevalência de distúrbios comportamentais ocorre em mulheres. Esta maior disposição do sexo feminino a tais disfunções parece estar relacionada às oscilações na concentração de estradiol durante o ciclo menstrual e também durante o ciclo da vida, enquanto em homens, mesmo em menor concentração, a quantidade deste hormônio é estável, não sofrendo variações bruscas como em mulheres.

De acordo com os nossos resultados, a RA induziu ansiedade em ratas em privação alimentar, porém não apresentou efeito do tipo panicogênico. Poucos estudos na literatura fazem referência a esta relação, indicando que a deficiência de nutrientes, tais como ferro, vitamina B6 e outras, que são cofatores da TpH2, bem como carência de triptofano (Sharma and Simlot 1984, Dakshinamurti, Paulose et al. 1988, Mikawa, Mizobuchi et al. 2013) seriam o principal fator para surgimento dos sintomas de transtorno de pânico em indivíduos em RA. Graeff (Graeff 2003), em artigo de revisão, confirmou a relação entre a serotonina, a PAG e o transtorno de pânico. Segundo este pesquisador, ao contrário da via moduladora da ansiedade que parte do NDR para a amígdala, em que a serotonina tem efeito ansiogênico, a serotonina liberada pelos neurônios serotoninérgicos das asas laterais do NDR inibem a PAG, atuando como fator panicolítico, ou seja, inibindo a resposta de pânico. Todos os nutrientes citados acima (triptofano, ferro e vitaminas) participam da síntese de serotonina, por isso a deficiência

deles no organismo leva ao aumento das respostas de pânico, que, por esse motivo, eram esperadas em nosso estudo. No entanto, Spiacci e colaboradores (Spiacci, Coimbra et al. 2012) comprovaram a participação de neurônios não-serotoninérgicos na via NDR-PAG no controle das resposta de pânico, atuando também na inibição da PAG. Assim, nossos resultados nos levam a acreditar que neurônios não-serotoninérgicos presentes nesta sub-região do NDR estão mantendo a PAG inibida mesmo com a diminuição da atividade dos neurônios serotoninérgicos.

A microinjeção de estradiol no NDR também não causou alterações no comportamento de fuga das ratas submetidas à RA. Resultados semelhantes foram obtidos por Daendee e colaboradores (Daendee, Thongsong et al. 2013) , em que ratas ovariectomizadas foram avaliadas no LTE e não apresentaram comportamento do tipo pânico. Já Pandaranandaka e colaboradores (Pandaranandaka, Poonyachoti et al. 2009) observaram que o aumento de estradiol endógeno aumentou o tempo de latência de fuga no teste no LTE, apresentando, portanto, efeito panicolítico neste estudo. Como visto acerca da modulação da serotonina pelo estradiol, este hormônio eleva a síntese e liberação de serotonina através do aumento da expressão da enzima Tph2 e, em relação a projeção serotoninérgica NDR-PAG, atua principalmente via receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (Graeff 2003). No entanto, uma vez que nossos animais não apresentaram comportamento de pânico induzido pela RA, esperávamos que a administração de estradiol realmente não causasse alterações no teste de fuga, pois acreditamos que a PAG já está sendo inibida por neurônios não-serotoninérgicos projetado pelo NDR lateral, e o aumento da atividade dos neurônios serotoninérgicos provocado pela modulação via estradiol só reforçaria esta inibição contribuindo no controle da resposta de pânico.

Situação semelhante foi notada em relação a avaliação da memória de esQUIVA inibitória e fuga em nosso trabalho. O aporte insuficiente de energia e nutrientes não foi capaz de induzir alterações na memória das ratas nos testes nos quais as submetemos. Muitos estudos associam a carência nutricional à disfunções na cognição e acometimento da memória (Byrne, Voogt et al. 2012, von Arnim, Dismar et al. 2012, Młynieć, Davies et al. 2014, Castro-Chavira, Aguilar-Vázquez et al. 2015), porém estes resultados não foram observados em nosso modelo experimental. Dois fatores podem ter influenciado este resultado: 1) o protocolo experimental utilizado para verificar a memória, e 2) o tempo de protocolo dietético. O protocolo escolhido para avaliar a memória das ratas consistiu em apresentar o aparato no primeiro dia (no momento dos testes de esQUIVA inibitória e fuga) e no dia seguinte avaliar a formação de memória de cada grupo. Na literatura existem inúmeras variações deste protocolo, como por exemplo expor o animal por mais vezes no aparato antes do teste de memória efetivamente, além de outros tipos

de testes para essa mesma avaliação. Assim, pode ser que o teste que utilizamos não tenha sido capaz de avaliar a memória de forma adequada. O tempo de RA também pode não ter sido suficiente para o surgimento de disfunções na memória, dessa forma, sugerindo que seria necessário um período mais longo de insuficiência alimentar para afetar a cognição. Dessa forma, não observamos alterações na memória das ratas vinte e quatro horas após a microinjeção de estradiol + teste no LTE. Assim como foi discutido sobre o transtorno de pânico, pode ser que não tenhamos obtido melhora da memória das ratas após a administração de estradiol por não ter havido alteração da formação dela na RA. No entanto, se tivéssemos encontrado disfunções na memória, acreditamos que o estradiol reverteria tal alteração, já que, segundo a literatura, ele melhora a formação da memória (Hasegawa, Hojo et al. 2015, Jovanovic, Kocoska-Maras et al. 2015, McDermott, Liu et al. 2015). Além disso, o estado emocional influencia na formação da memória, sendo assim, se o estradiol melhora o estado emocional (por exemplo atenua a ansiedade e o pânico), essa melhora também será refletida na memória do animal sobre aquela situação.

A atividade locomotora é normalmente verificada logo após teste comportamentais para observar se o resultado obtido no teste não foi camuflado pela ação da droga envolvida ou outras condições diferenciadas entre os grupos experimentais (Zangrossi and Graeff 2014), ou seja, ele é utilizado para confirmar e validar a resposta comportamental vista no aparato. Nossos resultados mostraram diferença na atividade locomotora entre os grupos, em que as ratas Controle percorreram um maior número de retângulos que as RA. Inicialmente este dado indica que a resposta obtida no teste de esquiiva inibitória seria resultado da hipoatividade das ratas RA e não do comportamento ansioso, ou seja, estas ratas apresentaram tempo de latência de esquiiva inibitória maior devido a hipoatividade associada. No entanto, quando comparamos os tratamentos dentro do grupo RA (RA/Veículo e RA/Estradiol), verificamos que não houve diferença na atividade locomotora entre eles, porém as ratas que receberam estradiol apresentaram tempo de latência de esquiiva inibitória menor que as que receberam veículo, o que foi interpretado como atenuação da ansiedade. Assim, podemos afirmar que a resposta de esquiiva inibitória apresentada pelas ratas em RA no LTE não foi devido à hipoatividade e sim ao comportamento do tipo ansiedade, uma vez que provamos através da comparação dentro do grupo RA (entre os tratamentos) que as ratas que saíram mais rapidamente do braço fechado do LTE apresentaram o mesmo padrão de atividade locomotora que aquelas que demoraram mais tempo para sair, demonstrando que a permanência por tempo maior dentro do braço não está relacionada a menor atividade locomotora e sim ao aspecto comportamental.

A hipoatividade não é uma resposta normalmente encontrada em trabalhos sobre RA. A maioria dos autores encontram hiperatividade nesses modelos (Jean, Laurent et al. 2011, Duclos, Ouerdani et al. 2013) e sugerem que esta resposta paradoxal (pouca energia para as funções metabólicas e aumento involuntário da atividade motora, resultando em maior gasto energético) ocorra por ativação de circuitos de recompensa no cérebro, que entende ser necessário aumentar a atividade para buscar alimentos. Entretanto, alguns estudos demonstraram hipoatividade por seus modelos experimentais, associando a redução da atividade locomotora, principalmente, à deficiência de vitaminas e minerais (Cocchetto, Miller et al. 1985, Wojciak 2014). Tal situação pode justificar a resposta apresentada pelas ratas em RA deste presente trabalho, visto que a RA de 60% reduz consideravelmente o aporte de micronutrientes, resultando em carência de vitaminas e minerais (Cerqueira and Kowaltowski 2010, Młyniec, Davies et al. 2014).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a RA de 60% durante 14 dias reduz a concentração de hormônios ovarianos (predominantemente estradiol, devido à fase da vida reprodutiva das fêmeas utilizadas - jovens adultas), o que foi reforçado pela confirmação da cessação do ciclo reprodutivo destas ratas. Além disso, as mesmas manifestaram hipoatividade e comportamento do tipo ansiedade, mas não do tipo pânico, assim como também não apresentaram disfunções na memória, enquanto a microinjeção de estradiol no NDR foi capaz de reverter a ansiedade nestas ratas. Tais resultados sugerem que a RA diminui a atividade ovariana, refletindo na redução da síntese e liberação de estradiol o que, conseqüentemente, reduz a disponibilidade deste hormônio no SNC e diminui sua atuação sobre receptores presentes no NDR, onde este atua como componente ansiolítico. A menor ativação dos receptores de estradiol no NDR altera o mecanismo de controle desta via, o que resulta em aumento do comportamento do tipo ansiedade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Rahbi, B., R. Zakaria, Z. Othman, A. Hassan, S. Muthuraju and W. M. Wan Mohammad (2013). "Mood and memory function in ovariectomised rats exposed to social instability stress." Biomed Res Int 2013: 493643.

American Psychiatry Association, D. (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition.

Andrade, T. G., J. S. Nakamuta, V. Avanzi and F. G. Graeff (2005). "Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT1A receptors." Behav Brain Res 163(1): 18-25.

Asth, L., B. Lobão-Soares, E. André, V. e. P. Soares and E. C. Gavioli (2012). "The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice." Brain Res Bull 87(6): 526-533.

Balasubramanian, P., M. Subramanian, J. L. Nunez, S. M. Mohankumar and P. S. Mohankumar (2014). "Chronic estradiol treatment decreases brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression and monoamine levels in the amygdala--implications for behavioral disorders." Behav Brain Res 261: 127-133.

Becker, L. K., G. M. Etelvino, T. Walther, R. A. Santos and M. J. Campagnole-Santos (2007). "Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain." Am J Physiol Heart Circ Physiol 293(3): H1416-1424.

Berne, R. M., M. N. Levy, B. M. Koeppen and B. A. V. Stanton (2008). Berne & Levy : Fisiologia, Elsevier.

Byrne, J. H., M. Voogt, K. M. Turner, D. W. Eyles, J. J. McGrath and T. H. Burne (2012). "The impact of adult vitamin D deficiency on behaviour and brain function in male Sprague-Dawley rats." PloS one 8(8).

Canto-de-Souza, L., D. C. Garção, F. Romaguera and R. Mattioli (2015). "Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice." Neurosci Lett 587: 11-16.

- Carr, K. D., T. H. Park, Y. Zhang and E. A. Stone (1998). "Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and ad libitum fed rats." Brain Res 779(1-2): 26-32.
- Carter, W. J. and M. E. Lynch (1994). "Effect of clenbuterol on recovery of muscle mass and carcass protein content following dietary protein depletion in young and old rats." J Gerontol 49(4): B162-168.
- Castro-Chavira, S. A., A. R. Aguilar-Vázquez, Y. Martínez-Chávez, L. Palma, E. Padilla-Gómez and S. Diaz-Cintra (2015). "Effects of chronic malnourishment and aging on the ultrastructure of pyramidal cells of the dorsal hippocampus." Nutritional neuroscience.
- Cerqueira, F. M. and A. J. Kowaltowski (2010). "Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition." Ageing Res Rev 9(4): 424-430.
- Chaves, M. L. F. (1993) "Memória humana: aspectos clínicos e modulação por estados afetivos." Psicologia USP.
- Clark, J. A., S. Alves, C. Gundlah, B. Rocha, E. T. Birzin, S. J. Cai, R. Flick, E. Hayes, K. Ho, S. Warriar, L. Pai, J. Yudkovitz, R. Fleischer, L. Colwell, S. Li, H. Wilkinson, J. Schaeffer, R. Wilkening, E. Mattingly, M. Hammond and S. P. Rohrer (2012). "Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test." Neuropharmacology 63(6): 1051-1063.
- Cocchetto, D. M., D. B. Miller, L. L. Miller and T. D. Bjornsson (1985). "Behavioral perturbations in the vitamin K-deficient rat." Physiology & behavior 34(5): 727-734.
- Cover, K. K., L. Y. Maeng, K. Lebrón-Milad and M. R. Milad (2014). "Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology." Transl Psychiatry 4: e422.
- Daendee, S., B. Thongsong and S. Kalandakanond-Thongsong (2013). "Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats." Behavioural brain research 246: 86-93.

- Dakshinamurti, K., C. S. Paulose, M. Viswanathan and Y. L. Siow (1988). "Neuroendocrinology of pyridoxine deficiency." Neurosci Biobehav Rev 12(3-4): 189-193.
- Dalmaso, C., J. L. Amigone and L. Vivas (2011). "Serotonergic system involvement in the inhibitory action of estrogen on induced sodium appetite in female rats." Physiol Behav 104(3): 398-407.
- de Cabo, R., S. Fürer-Galbán, R. M. Anson, C. Gilman, M. Gorospe and M. A. Lane (2003). "An in vitro model of caloric restriction." Exp Gerontol 38(6): 631-639.
- Deakin, J. F. and F. G. Graeff (1991). "5-HT and mechanisms of defence." J Psychopharmacol 5(4): 305-315.
- Donner, N. and R. J. Handa (2009). "Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei." Neuroscience 163(2): 705-718.
- Duclos, M., A. Ouerdani, P. Mormède and J. P. Kongsman (2013). "Food restriction-induced hyperactivity: addiction or adaptation to famine?" Psychoneuroendocrinology 38(6): 884-897.
- García-Matas, S., R. K. Paul, P. Molina-Martínez, H. Palacios, V. M. Gutierrez, R. Corpas, M. Pallas, R. Cristòfol, R. de Cabo and C. Sanfeliu (2015). "In vitro caloric restriction induces protective genes and functional rejuvenation in senescent SAMP8 astrocytes." Aging Cell.
- Gauthier, C., C. Hassler, L. Mattar, J. M. Launay, J. Callebert, H. Steiger, J. C. Melchior, B. Falissard, S. Berthoz, V. Mourier-Soleillant, F. Lang, M. Delorme, X. Pommereau, P. Gerardin, S. Bioulac, M. Bouvard, N. Godart and E. Group (2014). "Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: links with plasma tryptophan and serotonin metabolism." Psychoneuroendocrinology 39: 170-178.
- Graeff, F. G. (2003). "[Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder]." Rev Bras Psiquiatr 25 Suppl 2: 42-45.
- Hasegawa, Y., Y. Hojo, H. Kojima, M. Ikeda, K. Hotta, R. Sato, Y. Ooishi, M. Yoshiya, B.-C. C. Chung, T. Yamazaki and S. Kawato (2015). "Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks." Brain research.

Hiroi, R., R. A. McDevitt, P. A. Morcos, M. S. Clark and J. F. Neumaier (2011). "Overexpression or knockdown of rat tryptophan hydroxylase-2 has opposing effects on anxiety behavior in an estrogen-dependent manner." Neuroscience 176: 120-131.

Ikeda, T., Y. Makino and M. K. Yamada (2015). "17 α -estradiol is generated locally in the male rat brain and can regulate GAD65 expression and anxiety." Neuropharmacology 90: 9-14.

Järvensivu, P., T. Saloniemi-Heinonen, M. Awosanya, P. Koskimies, N. Saarinen and M. Poutanen (2015). "HSD17B1 expression enhances estrogen signaling stimulated by the low active estrone, evidenced by an estrogen responsive element-driven reporter gene in vivo." Chem Biol Interact.

Jean, A., L. Laurent, J. Bockaert, Y. Charnay, N. Dusticier, A. Nieoullon, M. Barrot, R. Neve and V. Compan (2011). "The nucleus accumbens 5-HTR₄-CART pathway ties anorexia to hyperactivity." Translational psychiatry 2.

Jiang, J., J. Li and X. Jia (2014). "The Antiosteoporotic Activity of Central-Icaritin (CIT) on Bone Metabolism of Ovariectomized Rats." Molecules.

Jovanovic, H., L. Kocoska-Maras, A. F. Rådestad, C. Halldin, J. Borg, A. L. Hirschberg and A.-L. L. Nordström (2015). "Effects of estrogen and testosterone treatment on serotonin transporter binding in the brain of surgically postmenopausal women--a PET study." NeuroImage 106: 47-54.

Kangussu, L. M., A. F. Almeida-Santos, M. Bader, N. Alenina, M. A. Fontes, R. A. Santos, D. C. Aguiar and M. J. Campagnole-Santos (2013). "Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen." Behav Brain Res 257: 25-30.

Klingerman, C. M., W. P. Williams, J. Simberlund, N. Brahme, A. Prasad, J. E. Schneider and L. J. Kriegsfeld (2011). "Food Restriction-Induced Changes in Gonadotropin-Inhibiting Hormone Cells are Associated with Changes in Sexual Motivation and Food Hoarding, but not Sexual Performance and Food Intake." Front Endocrinol (Lausanne) 2: 101.

Kumar, S. and G. Kaur (2013). "Intermittent fasting dietary restriction regimen negatively influences reproduction in young rats: a study of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis." PLoS One 8(1): e52416.

- Lenkei, Z., M. Palkovits, P. Corvol and C. Llorens-Cortès (1997). "Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review." Front Neuroendocrinol 18(4): 383-439.
- Lund, T. D., T. Rovis, W. C. Chung and R. J. Handa (2005). "Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors." Endocrinology 146(2): 797-807.
- Maddock, J., D. J. Berry, M. C. Geoffroy, C. Power and E. Hyppönen (2013). "Vitamin D and common mental disorders in mid-life: cross-sectional and prospective findings." Clin Nutr 32(5): 758-764.
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi and A. P. Tanno (2002). "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." Braz J Biol 62(4A): 609-614.
- Masoro, E. J. (2009). "Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms." Biochim Biophys Acta 1790(10): 1040-1048.
- Mattar, L., C. Huas, J. Duclos, A. Apfel and N. Godart (2011). "Relationship between malnutrition and depression or anxiety in Anorexia Nervosa: a critical review of the literature." J Affect Disord 132(3): 311-318.
- Mattar, L., C. Huas, N. Godart and E. group (2012). "Relationship between affective symptoms and malnutrition severity in severe Anorexia Nervosa." PLoS One 7(11): e49380.
- Mattar, L., M. R. Thiébaud, C. Huas, C. Cebula and N. Godart (2012). "Depression, anxiety and obsessive-compulsive symptoms in relation to nutritional status and outcome in severe anorexia nervosa." Psychiatry Res 200(2-3): 513-517.
- McDermott, C. M., D. Liu, C. Ade and L. A. Schrader (2015). "Estradiol replacement enhances fear memory formation, impairs extinction and reduces COMT expression levels in the hippocampus of ovariectomized female mice." Neurobiology of learning and memory 118: 167-177.
- Mendelsohn, F. A. and M. P. Warren (2010). "Anorexia, bulimia, and the female athlete triad: evaluation and management." Endocrinol Metab Clin North Am 39(1): 155-167, x.

- Mikawa, Y., S. Mizobuchi, M. Egi and K. Morita (2013). "Low serum concentrations of vitamin B6 and iron are related to panic attack and hyperventilation attack." Acta Med Okayama 67(2): 99-104.
- Misra, M., D. K. Katzman, N. M. Estella, K. T. Eddy, T. Weigel, M. A. Goldstein, K. K. Miller and A. Klibanski (2013). "Impact of physiologic estrogen replacement on anxiety symptoms, body shape perception, and eating attitudes in adolescent girls with anorexia nervosa: data from a randomized controlled trial." J Clin Psychiatry 74(8): e765-771.
- Misra, M. and A. Klibanski (2014). "Endocrine consequences of anorexia nervosa." Lancet Diabetes Endocrinol 2(7): 581-592.
- Mitra, S. W., E. Hoskin, J. Yudkovitz, L. Pear, H. A. Wilkinson, S. Hayashi, D. W. Pfaff, S. Ogawa, S. P. Rohrer, J. M. Schaeffer, B. S. McEwen and S. E. Alves (2003). "Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha." Endocrinology 144(5): 2055-2067.
- Młyniec, K., C. L. Davies, I. G. de Agüero Sánchez, K. Pytka, B. Budziszewska and G. Nowak (2014). "Essential elements in depression and anxiety. Part I." Pharmacol Rep 66(4): 534-544.
- Monthakantirat, O., W. Sukano, K. Umehara, H. Noguchi, Y. Chulikhit and K. Matsumoto (2014). "Effect of miroestrol on ovariectomy-induced cognitive impairment and lipid peroxidation in mouse brain." Phytomedicine 21(11): 1249-1255.
- Mychasiuk, R., H. Hehar, I. Ma and M. J. Esser (2015). "Dietary intake alters behavioral recovery and gene expression profiles in the brain of juvenile rats that have experienced a concussion." Front Behav Neurosci 9: 17.
- Nyman-Carlsson, E., I. Engström, C. Norring and L. Nevoen (2015). "Eating Disorder Inventory-3, validation in Swedish patients with eating disorders, psychiatric outpatients and a normal control sample." Nord J Psychiatry 69(2): 142-151.
- Pandaranandaka, J., S. Poonyachoti and S. Kalandakanond-Thongsong (2009). "Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system." Behav Brain Res 198(1): 142-148.

Paul, E. D. and C. A. Lowry (2013). "Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders." J Psychopharmacol 27(12): 1090-1106.

Pereira, M. A. G. (2005). Influência da desnutrição energético-protéica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.

Pobbe, R. L., H. Zangrossi, D. C. Blanchard and R. J. Blanchard (2011). "Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors." Eur Neuropsychopharmacol 21(4): 306-315.

Polivy, J. (1996). "Psychological consequences of food restriction." J Am Diet Assoc 96(6): 589-592; quiz 593-584.

Quarles, E. K., D. F. Dai, A. Tocchi, N. Basisty, L. Gitari and P. S. Rabinovitch (2015). "Quality control systems in cardiac aging." Ageing Res Rev.

Robin, J. P., F. Decrock, G. Herzberg, E. Mioskowski, Y. Le Maho, A. Bach and R. Groscolas (2008). "Restoration of body energy reserves during refeeding in rats is dependent on both the intensity of energy restriction and the metabolic status at the onset of refeeding [corrected]." J Nutr 138(5): 861-866.

Rodrigues, M. L. C., B. A. S. Schmitz, G. T. Cardoso and E. O. Sousa (2007). Módulo 10: A alimentação e nutrição no Brasil. U. d. Brasília, Ministério da Educação: 93.

Roncon, C. M., C. Biesdorf, R. G. Santana, H. Zangrossi, F. G. Graeff and E. A. Audi (2012). "The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey." J Psychopharmacol 26(4): 525-531.

Sanchez, R. L., A. P. Reddy and C. L. Bethea (2010). "Ovarian steroid regulation of the midbrain corticotropin releasing factor and urocortin systems in macaques." Neuroscience 171(3): 893-909.

Sandberg, K. and H. Ji (2013). "Is β the α Dog in Estrogen Receptor-Mediated Protection From Hypertension?" Hypertation.

Sharma, D. C. and M. M. Simlot (1984). "Utilization of dietary tryptophan in iron-deficient rats." J Nutr 114(8): 1518-1520.

Shughrue, P. J., M. V. Lane and I. Merchenthaler (1997). "Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system." J Comp Neurol 388(4): 507-525.

Siegfried, Z., E. M. Berry, S. Hao and Y. Avraham (2003). "Animal models in the investigation of anorexia." Physiol Behav 79(1): 39-45.

Silva, M. S., B. A. Pereira, I. C. Céspedes, J. O. Nascimento, J. C. Bittencourt and M. B. Viana (2014). "Dorsomedial hypothalamus CRF type 1 receptors selectively modulate inhibitory avoidance responses in the elevated T-maze." Behav Brain Res 271: 249-257.

Silva, P. A., G. Monnerat-Cahli, A. Pereira-Acácio, R. Luzardo, L. S. Sampaio, M. A. Luna-Leite, L. S. Lara, M. Einicker-Lamas, R. Panizzutti, C. Madeira, L. D. Vieira-Filho, C. Castro-Chaves, V. S. Ribeiro, A. D. Paixão, E. Medei and A. Vieyra (2014). "Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition." PLoS One 9(7): e100410.

Souza, A. M. A. (2013). Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial sistêmica, Universidade Federal de Ouro Preto.

Souza, A. M. A., R. C. A. de Menezes, A. R. R. Abreu, G. R. Araujo, D. C. Costa and D. A. Chianca Jr (2015) "Increased α 1-adrenoreceptor activity is required to sustain blood pressure in female rats under food restriction." Life Sciences.

Spiacci, A., N. C. Coimbra and H. Zangrossi (2012). "Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors." Neuroscience 227: 350-360.

Spiacci Junior, A. (2012). Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao medo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

ter Horst, G. J. (2010). "Estrogen in the limbic system." Vitam Horm 82: 319-338.

Tian, Z., Y. Wang, N. Zhang, Y. Y. Guo, B. Feng, S. B. Liu and M. G. Zhao (2013). "Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress." Psychoneuroendocrinology 38(10): 2218-2233.

Viana, M. B. (2010) "Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo." Natureza Humana 12, 33.

Vilela, M. G., J. L. Santos Júnior and J. G. C. Silva (2007) "Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal." Femina 35, 4.

von Arnim, C. A., S. Dismar, C. S. Ott-Renzer, N. Noeth, A. C. Ludolph and H. K. Biesalski (2012). "Micronutrients supplementation and nutritional status in cognitively impaired elderly persons: a two-month open label pilot study." Nutrition journal 12(1): 148.

WHO, W. H. O. (2007). Classification of Mental and Behavioural Disorders. CID - 10.

Witte, A. V., M. Fobker, R. Gellner, S. Knecht and A. Flöel (2009). "Caloric restriction improves memory in elderly humans." Proc Natl Acad Sci U S A 106(4): 1255-1260.

Wojciak, R. W. (2014). "Alterations of selected iron management parameters and activity in food-restricted female Wistar rats (animal anorexia models)." Eat Weight Disord 19(1): 61-68.

Xue, B., Z. Zhang, T. G. Beltz, F. Guo, M. Hay and A. K. Johnson (2014). "Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol 307(2): H191-198.

Yao, P. L., D. J. Ehresman, J. M. Rae, S. C. Chang, S. R. Frame, J. L. Butenhoff, G. L. Kennedy and J. M. Peters (2014). "Comparative in vivo and in vitro analysis of possible estrogenic effects of perfluorooctanoic acid." Toxicology 326: 62-73.

Zangrossi, H. and F. G. Graeff (2014). "Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze." Neurosci Biobehav Rev 46 Pt 3: 397-406.

Zangrossi, H., M. B. Viana, J. Zanoveli, C. Bueno, R. L. Nogueira and F. G. Graeff (2001). "Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze." Neurosci Biobehav Rev 25(7-8): 637-645.

Zhou, D., Y. Zhuo, L. Che, Y. Lin, Z. Fang and D. Wu (2014) "Nutrient restriction induces failure of reproductive function and molecular changes in hypothalamus–pituitary–gonadal axis in postpubertal gilts." Mol Biol Rep, 10.