UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

NAYARA PESTANA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA TERAPIA ESTROGÊNICA SOBRE A NEUROQUÍMICA DE FÊMEAS EM
MODELO ANIMAL DE PERIMENOPAUSA (RATA) INDUZIDA PELO 4-DIEPÓXIDO DE
VINILCICLOHEXENO**

RIBEIRÃO PRETO

2018

NAYARA PESTANA DE OLIVEIRA

**Efeitos da terapia estrogênica sobre a neuroquímica de fêmeas em
modelo animal de perimenopausa (rata) induzida pelo 4-diepóxido de vinilciclohexano**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janete Aparecida Anselmo-
Franci

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pestana-Oliveira, Nayara

Efeitos da terapia estrogênica sobre a neuroquímica de fêmeas em modelo animal de perimenopausa (rata) induzida pelo 4-diepóxido de vinilciclohexano. Ribeirão Preto, 2018.

p.: 91; 23 fig

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Anselmo-Franci, Janete A.

1. Perimenopausa; 2. VCD; 3. Estradiol; 4. Progesterona; 5. Receptor de progesterona; 6. Receptor de estradiol; 7. Serotonina; 8. Noradrenalina; 9. NDR.

Dedicalória

Àquela que nunca mediu esforços para que eu pudesse estudar e crescer profissionalmente: minha mãe. Como eu queria entregar este título em suas mãos e dizer, ele é seu! Em uma das poucas vezes que me cobrou boas notas, ela disse da sua maneira brava e irreverente: “eu vou te fazer doutora, mesmo que tu não queiras! ” É, Mãe, a senhora conseguiu. Eu lamento que não tenha visto acontecer, mas gostaria que soubesse que a culpa é sua! Muito obrigada! A senhora não imagina a dificuldade que tem sido viver sem sua presença, seus conselhos, sua segurança e suas palavras certas nas horas de incerteza. Te amarei para sempre! Até breve.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nayara Pestana de Oliveira

Efeitos da terapia estrogênica sobre a neuroquímica de fêmeas em
modelo animal de perimenopausa (rata) induzida pelo 4-diepóxido de vinilciclohexano

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.^a Dr^a Janete A. Anselmo-Franci

Instituição: FORP-USP

Assinatura: _____

Prof.^o Dr.^o Helio Zangrossi Junior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Dr^a Milene Cristina de Carvalho

Instituição: FFCLRP-USP

Assinatura: _____

Prof.^a Dr^a Maristela de Oliveira Poletini

Instituição: UFMG

Assinatura: _____

Prof.^a Dr^a Cristina Marta Del-Ben

Instituição: FMRP

Assinatura: _____

*“É possível encontrar a felicidade mesmo nas horas mais
sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”*

*Alvo Dumbledore
Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban*

Agradecimentos

Aos meus pais, *Águida e Evangelista* que me escolheram como filha e por me amarem e darem suporte em todos os momentos. Mãe, não era assim que eu imaginava que escreveria meus agradecimentos à senhora. Por toda a sua dedicação, seu esforço ilimitado, seu apoio, mesmo quando discordava das minhas decisões, obrigada!

À minha “irmã” *Surley*, minha companheira leal, incansável. Nossa ligação que já era forte, nos fez almas gêmeas. Obrigada por estar sempre disposta a me amparar, por ser meu suporte! Eu não conseguiria sem você! Te amo!

À minha prima-irmã, *Núbia*. Obrigada por ser a irmã que a *Surley* e eu precisávamos! Te amamos muito! Obrigada por seu apoio e por sempre torcer por mim!

Ao meu sobrinho *Lucas*, mesmo sendo irritante, sei que torce por mim! E aos meus pequenos, *Matheus e Yasmin* que sempre encheram minhas férias de alegria.

À tia *Ana*, que sempre se alegrava ao saber dos meus progressos e conquistas. Também agradeço à tia *Rosa* por suas orações. Ao tio *Enoque*, por ser quase um pai! Às tias *Nildete, Raimunda, Teca*, sempre na torcida. Aos meus primos (*Chico, Fellipe e Daniel*) e primas (*Adriana, Fernanda, Socorro e Daniele*) que têm me apoiado com palavras de estímulo e carinho. E a todos da minha família!

À minha melhor amiga, *Thássia Borralho*. Muito obrigada por ser mais que amiga, ser a irmã que o coração escolheu! Amiga leal, companheira e presente. Como costumo brincar “aquela que eu chamaria para arrastar um corpo pela sala.” Também sou grata à sua família, que sempre me recebeu com o coração cheio de amor, fazendo com que me sentisse filha e irmã! *Thaíssa Borralho*, futura GO (das boas, por sinal!), muito obrigada por seu carinho, amizade, vibrações positivas!

Ao meu namorado, *João Paulo*. Obrigada por aturar minhas crises e surtos, obrigada por seu amor, por me ajudar a organizar os dados de PCR quando estava prestes a arremessar o computador pela janela. Amo você! Agradeço também aos meus sogros, *Edgar e Ilaine*, minha cunhada, *Juliane*, pela preocupação e carinho. Vocês também são minha família!

Aos amigos de São Luís - MA que, mesmo à distância, sempre tinham uma palavra de apoio e incentivo: *Suelen, Mayara, Cícero, William, Valéria, Hérica, Myllene, Genicleia, Ariadne, Aurimar, Fábio, Livia, Luciana e Carol*.

Aos amigos que Ribeirão Preto me deu, independente dos caminhos que sigamos, vocês sempre farão morada em meu coração: *Gean, Larissa (Lá), Ludmila, Lucas, Taline*,

Aline Gozzi, Vanessa, Nathane, Fabi, Alexandra, Fernanda Vechiato, Juliana, Dani, Glau, Richard, Rafael, Joyce, Nadir, Mauro, Luís Henrique, Nilton, Maurício, Keila, Carol, João Francisco, Bruna Balbino, Aline, Ana Paula, Thiago, Paty, Júnia, Alexandra, Paula, Natali e todos que compartilharam comigo momentos bons e outros de muita tristeza, principalmente no último ano! Vocês foram minha família! Muito obrigada!

Aos meus amigos e compadres *Eliza* e *Tiago*, agradeço pela preocupação que sempre tiveram comigo, pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução Feminina, *Belle, Bruna, Marina, Lita, Nathali e Ruither*. Vocês foram essenciais durante todo este processo! Obrigada pelo apoio, pelos momentos de descontração e por tornarem melhores os meus dias no trabalho e fora dele!

Aos professores que me acompanharam durante a pós-graduação e que foram verdadeiros exemplos nesta caminhada: Prof^o *José Antunes-Rodrigues*, Prof^o *Norberto Cairasco*, Prof^a *Terezila*, Prof^o *Celso Franci*, Prof^o *Rafael Saia*, Prof^a *Christie Leite*, Prof^a *Connie*, Prof^a *Maria Célia* e Prof^a *Lucila*.

Aos membros da banca que gentilmente cederam seu tempo e sua atenção para avaliar e enriquecer este trabalho.

À minha orientadora, Prof^a *Janete A Anselmo-Franci*. Jana, obrigada por não ter desistido de mim, por acreditar em mim e por todas as vezes que chamou minha atenção e pelos puxões de orelha! Obrigada por ter aberto não só as portas do seu laboratório, mas da sua vida e do seu coração! Obrigada por ter me apoiado no momento mais difícil que já passei e por ter me dado um abraço materno todas as vezes que, no laboratório, meu coração chamou por ela! Obrigada por todos os ensinamentos nestes 8 anos de convivência. E me desculpe o trabalho!

Aos animais pelo sacrifício. Sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Às agências de fomento por financiarem esta pesquisa, CAPES, Fapesp, em especial CNPq pelos 4 anos de bolsa concedidos.

RESUMO

PESTANA-OLIVEIRA, N. Efeitos da terapia estrogênica sobre a neuroquímica de fêmeas em modelo animal de perimenopausa (rata) induzida pelo 4-diepóxido de vinilciclohexano, 2018. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A perimenopausa representa a transição da vida reprodutiva para não reprodutiva. É geralmente caracterizada por alterações neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais, um possível resultado da depleção folicular ovariana e consequente redução do número de folículos ovarianos. É o período em que as mulheres podem apresentar maior susceptibilidade a manifestar transtornos afetivos e de ansiedade. A exposição de roedores ao resíduo químico 4-diepóxido de vinilciclohexeno (VCD) é um modelo bem estabelecido para estudos sobre perimenopausa, pois o VCD acelera o processo natural de atresia folicular. Embora as concentrações plasmáticas de estradiol estejam normais ou elevadas durante a perimenopausa, a terapia com estradiol pode ser benéfica para mulheres sintomáticas na perimenopausa. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a depleção folicular gradativa acelerada pelo VCD resulta em alterações na neuroquímica de ratas fêmeas em núcleos cerebrais que controlam o humor, além de avaliar se o estradiol seria capaz de reverter as possíveis alterações. Ratas da linhagem Wistar (28 dias pós-natal) receberam diariamente, durante 15 dias consecutivos, injeções subcutâneas de VCD (160 mg / kg) ou óleo de milho (O). Aproximadamente 55 dias após a primeira injeção, cápsulas de silastic contendo 17 β -estradiol (E) ou O foram inseridas subcutaneamente (Grupos O+O; VCD+O; VCD+E). Cerca de 21 dias após o implante das cápsulas, as ratas dos grupos O+O e VCD+O foram decapitadas na manhã do diestro, enquanto que as do grupo VCD+E foram decapitadas exatamente 21 dias após o implante das cápsulas contendo estradiol, entre 0900 h e 1100 h. O sangue foi colhido para avaliação das concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona por radioimunoensaio (RIE). Os cérebros foram removidos para microdissecção do hipocampo, amígdala, *Locus coeruleus* (LC) e Núcleo Dorsal da Rafe (NDR), para posterior análise dos níveis de RNAm para os receptores de progesterona (PR) e estradiol do tipo beta (ER β) por meio de RT/PCR. Este experimento foi replicado para remoção do hipocampo e amígdala para dosagem dos conteúdos de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) por meio de cromatografia líquida de alta performance, seguida de detecção eletroquímica (HPLC/ED). Outro conjunto de ratas submetidas às mesmas condições

experimentais foi perfundido para imunohistoquímica para TPH no NDR e TH no LC. Como esperado, na periostropausa (grupo VCD+O) as concentrações plasmáticas de estradiol não foram diferentes daquelas das ratas controles (O+O). As concentrações plasmáticas de progesterona na periostropausa foram menores que as do grupo controle, o que foi revertido pelo estradiol. No LC, a expressão de PR na periostropausa foi igual à das ratas controles, enquanto a expressão do ER β foi menor; a terapia com estradiol não modificou a expressão de nenhum destes receptores. A densidade de neurônios noradrenérgicos (TH+) no LC não foi alterada nem pela depleção folicular nem pela terapia estrogênica. Na periostropausa, o conteúdo de NA foi menor na amígdala, mas não no hipocampo, e o estradiol não alterou este conteúdo em nenhuma das áreas. No NDR, a expressão de PR e de ER β nas ratas na periostropausa foi menor que nas ratas controles; o estradiol preveniu o declínio da expressão de ER β , mas não de PR. O NDR foi analisado separadamente por toda a extensão rostro-caudal em 3 níveis anatômicos: rostral, médio e caudal, cada um dividido em 3 sub-regiões: lateral, dorsal e ventral. O número de neurônios serotoninérgicos (TPH+) no NDR foi menor na periostropausa, e o estradiol foi capaz de reverter esse efeito, atuando principalmente na região caudal. A expressão gênica de PR não foi alterada nem pela depleção folicular nem pela terapia estrogênica tanto na amígdala como no hipocampo. A expressão de ER β também não foi diferente na periostropausa, quando comparada ao grupo controle, mas o estradiol aumentou esta expressão no hipocampo. Tanto na amígdala como no hipocampo houve redução no conteúdo de 5-HT na periostropausa e estradiol foi capaz de reestabelecer os níveis deste neurotransmissor aos valores controles apenas no hipocampo. Estes dados elucidam, pelo menos em parte os mecanismos do efeito positivo da terapia estrogênica nos sintomas de mulheres normoestrogênicas na perimenopausa. Estes efeitos parecem não envolver de forma importante o sistema noradrenérgico central, mas resultar do aumento da biossíntese de progesterona periférica em associação com a regulação positiva de ER β no NDR e hipocampo, que parece potencializar a via serotoninérgica NDR/HPC. Portanto, o desenvolvimento de novas terapias que ativem os ER β pode ser uma alternativa para obter os efeitos positivos da ação do estradiol, eliminando os efeitos colaterais das terapias de estradiol que normalmente resultam da ativação do ER α .

Palavras chave: perimenopausa, VCD, estradiol, progesterona, receptor de progesterona, receptor de estradiol, serotonina, noradrenalina, NDR.

ABSTRACT

PESTANA-OLIVEIRA, N. Effects of estrogen therapy on neurochemistry in animal model of perimenopause (female rat) induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide, 2018. Tese (PhD) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Perimenopause represents the transition from reproductive to non-reproductive life. It is usually characterized by neuroendocrine, metabolic and behavioural changes, which result from a follicular depletion and reduced number of ovarian follicles. During this period, women are more likely to express mood disorders and anxiety. The exposure of animals to diepoxide 4-vinylcyclohexene (VCD) is a well-established experimental model for perimenopause studies, as VCD induces loss of ovarian small follicles (primary and primordial) in mice and rats by accelerating the natural process of atresia. Although estrogens levels are normal or even high during perimenopause, estrogen therapy can be beneficial for symptomatic perimenopausal women. The aim of this study was to investigate whether gradual follicular depletion induced by VCD results in changes in the neurochemistry of female rats in brain nuclei that control mood and the role of estradiol on these changes. Female rats (28 days) were daily injected with VCD or corn oil (O) for 15 days. Around 55 days after the first injection, pellets of 17β -estradiol (E) or O were inserted s.c (Groups O+O; VCD+O; VCD+E). Around 21 days after, rats O+O and VCD+O were decapitated between 0900 h and 1100 of diestrus while rats VCD+E were decapitated exactly 21 days after the onset of E therapy. Another set of rats followed the same experimental design and were perfused for TH and TPH immunohistochemistry in *Locus coeruleus* (LC) and Dorsal Raphe Nuclei (DRN), respectively. Blood was collected for estradiol and progesterone measurement by radioimmunoassay (RIA). The brains were removed from decapitated rats to punch out LC, DRN, hippocampus and amygdala to analyse the expression of mRNA for $ER\beta$ and PR by RT/PCR. This experiment was replicated to punch out the hippocampus and amygdala for the determination of noradrenaline (NE) and serotonin (5-HT) contents by High Performance Liquid Chromatography, followed by Electrochemical Detection (HPLC/ED). As expected, plasma concentrations of estradiol were not different from those of control rats (O + O). Plasma concentrations of progesterone in the periostropause were lower than those in the control group, which was reversed by estradiol. In the LC, the PR expression in the periostropause was similar to that of the control rats, whereas the $ER\beta$ expression was lower; estradiol therapy did not modify the expression of any of these receptors. The

density of noradrenergic (TH +) neurons in LC was not altered by either follicular depletion or estrogen therapy. In periostropause, NA content was lower in the amygdala, but not in the hippocampus, and estradiol did not alter this content in any of the areas. In NDR, the expression of PR and ER β in periostropausal rats was lower than in controls; estradiol prevented the decrease of ER β expression, but not PR. The NDR was analyzed separately for the entire rostrocaudal axis in three anatomical levels: rostral, middle and caudal, each divided into three sub-regions: lateral, dorsal and ventral. The number of serotonergic neurons (TPH +) in NDR was lower in the periostropause, and estradiol was able to reverse this effect, acting mainly in the caudal region. PR gene expression was not altered by either follicular depletion or estrogen therapy in either the amygdala or the hippocampus. ER β expression was also no different in periostropause compared to the control group, but estradiol increased this expression in the hippocampus. Both in the amygdala and in the hippocampus there was a reduction in 5-HT content in the periostropause, and estradiol was able to reestablish the levels of this neurotransmitter at the control values only in the hippocampus. These data elucidate, at least in part, the mechanisms of the positive effect of estrogen therapy on the symptoms of normoestrogenic women in perimenopause. These effects do not appear to significantly involve the central noradrenergic system but result from increased peripheral progesterone biosynthesis in association with positive regulation of ER β in the NDR and hippocampus, which appears to potentiate the serotonergic NDR/HPC pathway. Therefore, the development of new therapies that activate ER β may be an alternative to obtain the positive effects of the estradiol action, eliminating the side effects of the estradiol therapies that normally result from the activation of ER α .

Key-words: perimenopause, VCD, estradiol, progesterone, progesterone receptor, estradiol receptor, serotonin, noradrenaline, DRN

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de secreção de metabólitos urinários de estrogênios e progestagênios.....	18
Figura 2. Caracterização do perfil hormonal da mulher na perimenopausa.....	19
Figura 3. Classificação da vida reprodutiva das mulheres segundo <i>The Stages of Reproductive Aging Workshop</i>	20
Figura 4. Diversidade de sintomas neurológicos durante a perimenopausa.....	21
Figura 5. Comparação entre gêneros de risco de depressão ao longo da vida e representação esquemática das flutuações hormonais na vida da mulher.....	22
Figura 6. Variabilidade de sintomas endócrinos e neurológicos nas diferentes fases da vida da mulher.....	23
Figura 7. Risco de manifestação de sintomas depressivos em mulheres de acordo com as flutuações hormonais que ocorrem durante a vida reprodutiva.....	23
Figura 8. O Efeito do composto químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) sobre os folículos ovarianos.....	25
Figura 9. Fotomicrografias representativas de secções do ovário.....	26
Figura 10. Via de sinalização KIT/KITL nos folículos primordiais e primários.....	27
Figura 11. Concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona nas fases de proestro e diestro em modelo animal de perimenopausa induzida por VCD.....	30
Figura 12. Interações entre estrogênios, serotonina e noradrenalina.....	31
Figura 13. Conteúdo de 5-HT no hipocampo (A) e amígdala (B) 80 dias após exposição crônica ao VCD na fase de diestro.....	32
Figura 14. Comparação entre mulheres com depressão na perimenopausa que realizaram terapia estrogênica por três semanas (0.05 mg/d) e mulheres nas mesmas condições fisiológicas que receberam placebo.....	33
Figura 15. Desenho experimental.....	37
Figura 16. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) nas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona.....	45

Figura 17. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β no <i>Locus Coeruleus</i>	46
Figura 18. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na densidade de células imunorreativas à tirosina-hidroxilase (TH) no LC.....	46
Figura 19. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) no conteúdo de NA na amígdala e hipocampo.....	47
Figura 20. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β no Núcleo Dorsal da Rafe.....	48
Figura 21. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na imunoreatividade do triptofano-hidroxilase (TPH) no NDR.....	49
Figura 22. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β na amígdala e hipocampo.....	50
Figura 23. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na no conteúdo de 5-HT na amígdala e hipocampo.....	51

LISTA DE ABREVIACES

5-HT - Serotonina
ALLO - Allopregnanolona
AMI - Amígdala
APO - rea Pré-ptica
ABL - Amígdala Basolateral
DA - Dopamina
ER - Receptor para estradiol
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GABA - cido Gama-Aminobutírico
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HIP - Hipocampo
HMB - Hipotálamo médio basal
HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG - Hipotálamo-hipófise-gnadas
LC - Locus coeruleus
LEC - Labirinto em Cruz Elevado
LH - Hormônio Luteinizante
LHRH - Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
NA - Noradrenalina
NDR - Núcleo Dorsal da Rafe
PR - Receptor para progesterona
TH - Tirosina Hidroxilase
TPH - Triptofano Hidroxilase
VCD - 4-vinylcyclohexene diepoxide

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIACÕES

Introdução.....17

Objetivos.....34

Materiais e Métodos.....36

Resultados.....44

Discussão.....52

Conclusão.....70

Referências.....72

ANEXO

1. Introdução

1.1. Conceito de Perimenopausa

A perimenopausa pode ser definida como o período de transição entre a vida reprodutiva e a não reprodutiva das mulheres (Brinton et al, 2015; Chalouhi, 2017). Vários termos têm sido empregados para definir este período, incluindo: climatério, perimenopausa e transição para menopausa. Considerando a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde em 1996, os termos transição para a menopausa e perimenopausa são mais recomendados do que climatério. Assim, a perimenopausa pode ser definida como o período imediatamente anterior à menopausa, cujo início é marcado pelo aparecimento dos sintomas endócrinos, biológicos, bem como os sintomas clínicos sugestivos da aproximação da menopausa e se estende até doze meses após a última menstruação, com tempo médio de duração de cinco anos (Mckinlay et al., 1992; OMS, 1996; Soules et al, 2001; Burger et al, 2008; Bacon, 2017). Dessa forma, a perimenopausa tem como resultado a senescência reprodutiva, já os sintomas relacionados são, em grande parte, de natureza neurológica (Brinton et al, 2015).

Treloar e colaboradores (1967) foram os primeiros a propor o conceito de perimenopausa. Baseados em uma análise transversal com mais de cem calendários obtidos a partir do ciclo menstrual de mulheres durante toda a vida reprodutiva, o estudo apontou como marcador crítico do envelhecimento reprodutivo a irregularidade dos ciclos menstruais, caracterizada por intervalos de menstruação mais curtos ou mais longos. Já no final da década de 1980 foi demonstrado que durante a perimenopausa eram observados ciclos nos quais as concentrações do metabólito urinário do estradiol, estrona conjugada (E1 conj), eram mais baixas e da progesterona, gluconato de pregnanediol (PdG), mais altas que as observadas em um ciclo normal (Shidler et al., 1989).

Figura 1. Perfil da secreção de metabólitos urinários de estrogênios (estrone conjugada-E1 conj) e progestagênios (gluconato de pregnanediol-PdG) em dois ciclos menstruais durante a perimenopausa: o primeiro ciclo normal e um segundo com concentrações séricas maiores de E1 e menores de PDG na fase luteal (Shidler et al., 1989)

Em 1996, Santoro e colaboradores, baseados em dados clínicos nos quais foram avaliados o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo estimulante (FSH), e metabólitos do estradiol e da progesterona, caracterizaram o perfil hormonal das mulheres na perimenopausa (Figura 2), o qual difere do observado na menopausa (Santoro et al, 1996).

Figura 2. Caracterização do perfil hormonal da mulher em perimenopausa (Santoro et al., 1996).

De acordo com tal estudo, a mulher na perimenopausa apresenta concentrações urinárias do LH inalteradas, não diferindo daquelas que estão na pré-menopausa (período anterior à perimenopausa). As concentrações do FSH, contudo, estão significativamente elevadas. Neste estudo foi reafirmada a ideia de que durante a perimenopausa as concentrações de estradiol se encontram normais ou elevadas, contrariando a dogmática teoria do hipoestrogenismo. Por outro lado, as concentrações urinárias do metabólito da progesterona são significativamente menores (Santoro et al., 1996).

O primeiro guia que estabeleceu as diretrizes para a classificação do envelhecimento reprodutivo em mulheres foi proposto em 2001 (Figura 3), denominado *Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW*; Soules et al., 2001). Resumidamente, o *STRAW* divide a vida das mulheres em 7 estágios baseados nos padrões dos ciclos menstruais, bem como nas concentrações do Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Com base neste sistema de classificação, o período reprodutivo abrange três fases: inicial, pico e tardia, iniciando na menarca. A transição para a menopausa é dividida em estágios inicial e tardio, ambos definidos pela variabilidade no ciclo menstrual e aumento nas concentrações do FSH e termina com a última menstruação, iniciando a fase de pós-menopausa, a qual é dividida em inicial e tardia (Soules et al., 2001; Burger et al, 2008; Hale & Burger, 2009; Davis et al, 2015). Em 2012 foram realizados ajustes na

classificação proposta pelo *STRAW* e este passou a ser chamado de *STRAW + 10* (Harlow et al, 2012).

Figura 3. Caracterização dos estágios da vida da mulher segundo *The Stages of Reproductive Aging Workshop* (STRAW; Soules et al., 2001). O *STRAW* definiu 7 estágios da vida das mulheres, que vão desde o início dos ciclos menstruais na menarca e a idade reprodutiva até as fases de perimenopausa e pós-menopausa. Adaptado de Davis et al, 2015. *Nature Reviews: Menopause*,

Pesquisas clínicas consideram o aumento das concentrações do FSH como um marcador da menopausa, na perimenopausa as concentrações deste hormônio são variáveis (Davis et al, 2015). Inúmeros estudos reportam que durante quase todo o período de perimenopausa as concentrações deste hormônio podem ainda não estar elevadas, e que o aumento nas suas concentrações ocorre somente na fase tardia da perimenopausa, próximo à menopausa (Burger, 1994; Burger et al, 1995; Burger et al, 1998; Burger et al., 2008). Foi também sugerido que o aumento nas concentrações do FSH é associado aos ciclos menstruais prolongados no final da perimenopausa (Landgren et al, 2004).

Assim, segundo Prior & Hitchcock, a perimenopausa, antes vista como um período de hipostrogenismo, pode ser caracterizada por três principais alterações hormonais em mulheres menstruando regularmente: 1) concentrações normais ou erraticamente elevadas de estradiol; 2) declínio das concentrações plasmáticas de progesterona e 3) alterações em todos os níveis do eixo reprodutivo (Prior & Hitchcock, 2011).

1.2. Sintomas da perimenopausa

Embora muitos sintomas observados na perimenopausa sejam atribuídos à menopausa, eles são típicos desse período imediatamente anterior e podem comprometer severamente a qualidade de vida das mulheres de meia idade (Avis et al., 1997; Prior, 1998; Brinton et al, 2015). De fato, durante a perimenopausa é elevada a porcentagem de mulheres que manifestam sintomas típicos deste período, os quais incluem: alterações vasomotoras, variações na duração do ciclo menstrual, distúrbios do sono, piora em funções cognitivas, alterações comportamentais e de humor (irritabilidade, nervosismo, ansiedade e depressão), além de alterações metabólicas e fisiológicas (Mitchell & Woods, 1996; Brinton et al., 2015; Chalouhi, 2017). Considerando as alterações cerebrais deste período, Brinton e colaboradores (2015) definiram a perimenopausa como um “estado de transição neurológica”. Estas alterações estão representadas na Figura 4.

Figura 4. Diversidade de sintomas neurológicos durante a perimenopausa. Um grande número de mulheres manifesta os sintomas da perimenopausa, o que provoca significativa redução na qualidade de vida. Modificado de: Brinton, et al. 2015.

Outras alterações fisiológicas também são observadas com média a alta frequência neste período como atrofia nos tecidos vaginais, dores de cabeça, ganho de peso, aumento na predisposição ao câncer de mama e endometrial, osteoporose e risco de fraturas, redução da fertilidade, perda do interesse e disposição sexual e exacerbação dos sintomas pré-menstruais (Treloar et al., 1967; Avis et al., 1997; Prior, 1998; Wu et al., 2005).

No que se refere aos transtornos de humor, tanto estudos clínicos como epidemiológicos têm consistentemente demonstrado que após a puberdade, o risco de depressão é maior nas mulheres do que nos homens e isto atinge o máximo durante a perimenopausa (Deecher et al, 2008; figura 5). É possível que alterações na transmissão e processamento monoaminérgico contribuam para esta maior suscetibilidade à depressão observada em mulheres (Weissman et al., 1996). A perimenopausa parece ser o período de maior vulnerabilidade à depressão em mulheres em comparação a outros períodos da vida (Yen et al., 2009; Parry, 2010; Brinton et al, 2015; figura 6).

Figura 5. Comparação entre gêneros de risco de depressão ao longo da vida e representação esquemática das flutuações hormonais na vida da mulher (Deecher et al., 2008).

Figura 6. Variabilidade de sintomas endócrinos e neurológicos nas diferentes fases da vida da mulher. A perimenopausa é caracterizada como o período de maior variabilidade nos sintomas endócrinos e neurológicos (Modificado de: Brinton et al, 2015).

Schmidt e colaboradores (2004) demonstraram que nos 24 meses ao redor da última menstruação, o risco da instalação da depressão é 14 vezes maior que nas mulheres no período da pré-menopausa.

Considerando as diferenças intersexuais na manifestação das desordens afetivas, é possível sugerir que a predisposição genética e/ou hormônios gonadais sejam fatores de risco significativos para o desenvolvimento de tais patologias (Solomon & Herman, 2009). Outra evidência significativa de que os esteroides ovarianos são importantes no controle das desordens afetivas é que as janelas de vulnerabilidade emocional que ocorrem ao longo da vida das mulheres estão correlacionadas com períodos reprodutivos marcados por grandes flutuações hormonais como a menstruação, gravidez, período pós-parto e a perimenopausa (Stahl, 2000; Figura 7).

Figura 7. Risco de manifestação de sintomas depressivos em mulheres de acordo com as flutuações hormonais que ocorrem durante a vida reprodutiva (Stahl, 2000). PMS: Síndrome Pré-Menstrual.

No último século, a expectativa de vida das mulheres aumentou significativamente. Dados da Organização Mundial da Saúde sustentam a ideia de que, por volta do ano de 2030, mais de 1,2 milhão de mulheres terão pelo menos 50 anos de idade (Government Printing Office, 1995). No Brasil, a expectativa de vida das mulheres aumentou em mais de 30 anos entre 1940 e 2016 (IBGE, 2017). Embora a vida média dos humanos tenha aumentado (de 50 para 80 anos), a idade em que a menopausa é estabelecida permaneceu fixa (Rehman & Masson, 2005) por volta dos 50 anos (Burger et al., 2008; Wise et al., 1999). Desse modo, também será elevada a proporção de mulheres que experimentarão a perimenopausa e suas consequências fisiológicas e fisiopatológicas. Portanto, é essencial a melhor compreensão dos mecanismos que regem este período e assim buscar alternativas para melhorar a qualidade de vida das mulheres.

1.3. Modelos experimentais de perimenopausa

O processo de senescência reprodutiva em espécies de mamíferos é complexo e pouco esclarecido, especialmente em humanos. A causa primária da senescência reprodutiva em fêmeas de mamíferos ainda não foi totalmente elucidada. Este envelhecimento é caracterizado pelo progressivo declínio na fertilidade atribuído à perda de folículos ovarianos, bem como redução na qualidade dos oócitos, além de deficiências uterinas e modificações em todos os níveis do eixo ovariano. Tais eventos podem ser observados tanto em mulheres como em roedores (Peng & Huang, 1972; Costoff & Mahesh, 1975; Vom Saal et al., 1994; Wise et al., 1999; Rubin, 2000). Nas mulheres, a perda da fertilidade parece estar associada primariamente à exaustão dos folículos ovarianos (Faddy et al., 1992; Rubin, 2000), enquanto nas fêmeas de roedores, as alterações na função hipotalâmica/hipofisária parecem ser a causa primária do envelhecimento reprodutivo (Peng & Huang, 1972; Lu et al., 1979). De fato, diversas evidências indicam que durante os primeiros estágios do declínio reprodutivo, antes de qualquer mudança na ciclicidade ovariana e circulação de estradiol, alterações cerebrais podem desempenhar importante função no início da senescência reprodutiva em fêmeas de roedores (Lu et al., 1994; Gore et al., 2004; Anzalone et al., 2001). Desta forma, modelos animais podem nos ajudar a compreender os mecanismos envolvidos neste processo. Contudo, os modelos animais atuais para o estudo do envelhecimento reprodutivo não replicam com sucesso a perimenopausa humana e as mudanças graduais que ocorrem nesta fase.

O modelo animal tradicional para estudo da menopausa, a ovariectomia, negligencia este período de transição, uma vez que as concentrações hormonais ovarianas declinam abruptamente, não reproduzindo o que ocorre na mulher. No modelo de envelhecimento natural podem ser observadas concentrações muito elevadas de progesterona resultado da manutenção prolongada de corpos lúteos (Kermath & Gore, 2012; Frye et al., 2012; Koebele & Bimonte-Nelson, 2016). Além disso, estudos com animais em idade avançada são difíceis de ser conduzidos em função do tempo despendido e da necessidade de cuidados especiais aos animais idosos. Além disso, há sobreposição das alterações relacionadas ao envelhecimento somático e aquelas do envelhecimento reprodutivo.

Um modelo experimental bem estabelecido na literatura para estudar perimenopausa e menopausa refere-se à exposição dos animais ao composto químico 4-

diepóxido de vinilciclohexeno (VCD), o qual acelera a falha gradual da função ovariana pelo esgotamento progressivo dos folículos primordiais e primários, mas retém tecido ovariano residual, como ocorre nas mulheres na perimenopausa (Springer et al., 1996; Kao et al., 1999; Hoyer et al., 2001; Mayer et al., 2004). As baixas doses de VCD causam a destruição seletiva dos pequenos folículos pré-antrais do ovário sem afetar outros tecidos periféricos. Além disso, este composto químico não atravessa a barreira hematoencefálica (Lukefahr et al., 2012).

4-Diepóxido de vinilciclohexeno (VCD), o modelo de falha ovariana acelerada.

O 4-Diepóxido de vinilciclohexeno, ou VCD é um resíduo químico industrial produzido a partir da síntese de inseticidas, antioxidantes, pneus de borracha, etc. Seus efeitos ovotóxicos foram percebidos em operárias que trabalhavam nas fábricas e que apresentaram menopausa precoce (National Toxicology Program Technical Report Series, 1986; Springer et al., 1996; Hoyer et al., 2001; Mayer et al., 2002). O VCD tem sido utilizado comercialmente para reduzir a fertilidade e proliferação de roedores, sem gerar a contaminação de um pesticida convencional ao meio ambiente (Dyer et al, 2013).

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que o VCD pode induzir disfunção oocitária, o que justifica seu caráter ovotóxico. De forma mais específica, o VCD destrói os folículos pequenos (primordiais e primários; figura 8) no ovário de roedores, causando assim prejuízos na função reprodutiva (Kappeler & Hoyer, 2012; Liu et al, 2015). Além disso, em nosso laboratório foi observado que o VCD altera a dinâmica folicular, promovendo declínio no número de folículos antrais saudáveis e aumentando o número de atresícos (Figura 9; Reis et al., 2014)

Figura 8. O Efeito do composto químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) é específico sobre os folículos ovarianos primordiais e primários. (Kappeler & Hoyer, 2012).

Figura 9. Fotomicrografias representativas de secções do ovário apresentando folículos antrais saudáveis (A) e atresícos (B). Avaliação quantitativa dos folículos antrais saudáveis e atresícos de animais dos grupos veículo e VCD. Modificado de: Reis et al., 2014.

O que torna os folículos ovarianos primordiais e primários alvos seletivos do VCD é a presença de um grupo bastante diversificado de fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência das células foliculares, dentre os quais se destacam: fatores de associação de células de granulosa, o ligante do receptor KIT (KITL - também referido como fator de célula tronco, fator *steel* e fator de crescimento de células *mast*), fator inibidor de leucemia (LIF) e mais uma série de outros (Fernandez et al. 2008; Mark-Kappeler et al. 2011).

O KITL é um fator de crescimento produzido pelas células da granulosa, que se liga ao seu receptor KIT, um receptor do tipo tirosina-quinase presente na membrana dos oócitos (Yoshida et al, 1997). KITL age estimulando o crescimento do oócito de folículos pré-antrais pequenos (Manova et al, 1990; Packer et al, 1994), induzindo o desenvolvimento de folículos primordiais e iniciando a foliculogênese (Parrott & Skinner, 1999; Liu et al. 2006). O KITL também age como um fator antiapoptótico nos oócitos dos folículos primordiais (Jin et al, 2005). Portanto, esta interação ligante/receptor é crucial para a comunicação entre estes dois tipos celulares e é de extrema importância para o início da foliculogênese e para a sobrevivência dos oócitos.

A ativação do receptor pelo seu ligante resulta na autofosforilação do KIT, que por sua vez ativa a via de sinalização da 3 quinase-fosfatidilinositol (PI3K). A PI3K ativa a proteína quinase-1 dependente de fosgamositide (PDK-1), que por sua vez fosforila e ativa a proteína quinase AKT, como mostrado na Figura 10. A ativação desta via inibe a apoptose dos oócitos contidos nos folículos primordiais (Parrott e Skinner, 1999; Jin et al, 2005), sendo, portanto, importante para a sobrevivência folicular.

Figura 10. Via de sinalização KIT / KITL nos folículos primordiais e primários. Esta via é crucial para a viabilidade e sobrevivência dos oócitos. O ligante do KIT (KITL), sintetizado pelas células da granulosa, se liga ao seu receptor KIT (receptor do tipo tirosina quinase) presente na membrana do oócito. A interação entre KITL e KIT estimula sua atividade quinase promovendo a autofosforilação do KIT, desencadeando assim uma série de respostas celulares por meio da via de sinalização da 3 quinase-fosfatidilinositol (PI3K). PI3K ativa a proteína quinase-1 dependente de fosgamositide (PDK-1), que fosforila e ativa a proteína quinase AKT. pAKT então transloca para o núcleo e ativa uma série de vias importantes para a inibição da apoptose e promoção da sobrevivência celular. (Modificado de Kappeler & Hoyer, 2012).

A exposição crônica ao VCD altera a cascata de sinalização KIT / KITLG em vários níveis, pois este composto químico interage diretamente com o KIT. Nos primeiros dias de exposição ao VCD, a fosforilação do KIT e da AKT é reduzida. Posteriormente, há declínio na expressão do KIT, tanto do RNAm como da proteína. Estes efeitos resultam na ativação de vias apoptóticas envolvendo Bax, citocromo C e caspase-3 com resultante perda dos folículos primordiais e primários (Hoyer et al., 2001; Lukerfahr et al., 2012; Kappeler & Hoyer, 2012).

Em estudos sobre a capacidade de alguns destes fatores resistirem à ovotoxicidade induzida pelo VCD, foi verificado que o KITL foi único protetor. Assim, uma vez que apenas o KITL endógeno exibiu capacidade de proteção dos oócitos contra a toxicidade induzida pelo VCD, foi sugerido que a via de sinalização KIT / KITL esteja envolvida na especificidade da ação do VCD nos folículos primordiais e primários (Kappeler & Hoyer, 2012).

O modelo de depleção folicular, seguida de falha ovariana induzida pelo VCD tem sido amplamente utilizado em pesquisas experimentais sobre perimenopausa e menopausa (Frye et al, 2012; Reis et al, 2014; Merchenthaler et al, 2014; Liu et al, 2015; Brooks et al, 2016; Koebele et al, 2017) e é o modelo experimental que mais se aproxima da progressão humana natural para a menopausa, uma vez que a maioria das mulheres entra na menopausa por uma redução gradual da função ovariana mantendo, porém, o

tecido residual do ovário (Brooks et al, 2016). Desta forma, considerando que é um número crítico de folículos ovarianos e não a idade da mulher que determina o início da menopausa (Faddy et al., 1992), a perimenopausa induzida por VCD é um modelo que apresenta analogia, previsibilidade e homologia, o que o torna plausível para se fazer inferências sobre a dinâmica da perda folicular e seus efeitos na neuroquímica de mulheres na perimenopausa e na menopausa, períodos em que desordens afetivas, alterações vasomotoras e vários outros sintomas que comprometem a qualidade de vida das mulheres de meia idade podem se manifestar.

1.4. Mecanismos de ação dos esteroides ovarianos

Nas últimas décadas, observou-se considerável aumento no interesse em estudar outras ações do estradiol e da progesterona além daquelas exercidas na função reprodutiva (Barth et al, 2015). Os esteroides exercem um efeito pleiotrópico sobre Sistema Nervoso Central (SNC) onde são capazes de modular e induzir ações em diversas áreas cerebrais, desde o desenvolvimento neural, marcado por efeitos permanentes, até a fase adulta, quando ocorrem a modulação da síntese de neurotransmissores e da expressão de receptores, transmissão sináptica e remodelamento (Genazzani et al., 1996; Compagnone & Mellon, 2000).

Sabe-se que os estrogênios afetam mais de quatrocentas funções corporais e que são hormônios neuromoduladores e neuroprotetores (McEwen & Alves, 1999; Manthey & Behl, 2006). Tais efeitos biológicos são mediados pela ligação a dois tipos de receptores nucleares, ou receptores clássicos, que atuam ativando fatores de transcrição: os receptores do tipo α (ER α) e os do tipo β (ER β). A ação estrogênica também pode ser desencadeada via receptores de membrana, por ativar cascatas de sinalização envolvendo segundos mensageiros (Paech et al., 1997; Filardo et al., 2002).

Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* demonstraram a ampla distribuição dos ERs pelo SNC (Weiss et al., 2008; Helena et al., 2009). Também foram observadas diferenças na forma como estes receptores são expressos no cérebro, podendo haver sobreposição ou distinção das áreas cerebrais (Azcoitia et al., 1999). Enquanto ER α é abundantemente expresso em áreas que regulam a função reprodutiva e o balanço energético, como área pré-óptica (APO), núcleo arqueado (ARC) e hipotálamo, o ER β predomina em áreas envolvidas com a regulação do humor e das respostas ao estresse, tais como: hipocampo, núcleo dorsal da rafe (NDR), córtex pré-frontal e núcleo paraventricular (NPV; Shughrue et al., 1997).

Seguindo um padrão análogo ao dos demais esteroides, a progesterona exerce seus efeitos por meio da ligação e ativação do seu receptor intracelular específico (PR), ativando fatores de transcrição (De Marzo et al., 1991). As ações deste esteroide também podem ser mediadas pela ligação e ativação de receptores de membrana, levando à ativação de cascatas de segundos mensageiros (Nilsen & Briton, 2002).

Assim como os ERs, os PRs exibem uma ampla distribuição pelo cérebro, sendo expressos em regiões não relacionadas à função reprodutiva como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala. Dessa forma, são consistentes os indícios de que a progesterona exerce ações tanto neuroprotetora como neuro-regenerativa no organismo (Baulieu et al., 1997; Carrol et al., 2007).

1.5. Relação entre esteroides ovarianos, perimenopausa e transtornos afetivos

Os hormônios sexuais são capazes de modular sistemas de neurotransmissores que regulam o humor (McEwen, 2002; Barth et al, 2015), influenciando profundamente as funções neurológicas e afetivas das mulheres (Walf et al., 2009). Na prática clínica, tem sido erroneamente considerado que, assim como na menopausa, todas as mulheres sintomáticas, na perimenopausa, devem estar “deficientes de estrógenos” (Oudshoorn, 1994; Prior, 2005). Dessa forma, grande parte dos estudos clínicos aponta o declínio das concentrações de estradiol como causa dos sintomas observados durante esta transição. No entanto, foi descrito que as concentrações plasmáticas deste hormônio se encontram normais ou elevadas, e só declinam na menopausa (Santoro et al., 1996; Prior, 2005; Burger et al., 2008; Sowers et al., 2008).

Dados deste laboratório demonstraram no modelo animal de perimenopausa induzida pelo VCD, que as concentrações plasmáticas de estradiol não diferem entre as ratas com depleção folicular e o grupo controle (Reis et al. 2014; Figura 11). Estudos sobre o perfil hormonal de mulheres na perimenopausa indicaram um padrão errático com intensas oscilações na secreção de estradiol (Santoro et al., 1996; Prior, 2005). No entanto, é interessante notar que, em algumas mulheres na perimenopausa, o tratamento com estrogênios provoca melhoras significativas nas ondas de calor e previne os sintomas de depressão e ansiedade (Morgan et al., 2007). Isto nos sugere que a maior vulnerabilidade aos transtornos afetivos e de ansiedade exibida pelas mulheres neste período pode ser reflexo das flutuações de estrogênios no cérebro e/ou a redução na sua responsividade, mediada pela redução na expressão de ERs e não pelo declínio de suas concentrações plasmáticas.

Por outro lado, dados da literatura apontaram o declínio das concentrações plasmáticas de progesterona como a possível causa dos sintomas observados na perimenopausa (Santoro et al., 1996; Prior, 1998; Prior, 2005; Prior & Hitchcock, 2011). Reduções na secreção de progesterona têm sido associadas com as alterações de humor observadas na síndrome pré-menstrual e na depressão pós-parto (Lovick, 2012). Dados provenientes de testes que avaliam ansiedade, Labirinto em Cruz Elevado (LEC) e campo aberto também corroboram a ação dos esteroides ovarianos no estado afetivo: ratas manifestaram mais comportamentos preditivos de ansiedade durante o diestro, fase do ciclo estral onde as concentrações plasmáticas de progesterona diminuem rapidamente e equivale ao final da fase lútea nas mulheres, quando estas expressam os sintomas da síndrome pré-menstrual (Frye & Walf, 2002; Lovick, 2012). Similar ao que ocorre nas mulheres na perimenopausa, observamos em nosso modelo experimental declínio nas concentrações plasmáticas de progesterona nas ratas com depleção folicular induzida por VCD, o que reforça a importância do modelo utilizado para se inferir sobre alterações na perimenopausa da mulher (Reis et al, 2014; Figura 11).

Diversos modelos animais demonstram que os esteroides ovarianos modulam muitos sistemas neurorregulatórios implicados na fisiopatologia das desordens afetivas. (McEwen et al., 1997; Frye & Walf, 2002). Esses hormônios reduzem a atividade da monoamina-oxidase (MAO - enzima que metaboliza a 5-HT e a NA) tornando estes neurotransmissores mais disponíveis na fenda sináptica, e elevam a síntese de receptores pós-sinápticos para ambos os neurotransmissores, aumentando a sensibilidade dos neurônios a eles responsivos (Deecher et al., 2008; Solomon & Herman, 2009; Figura 12).

Figura 11. Concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona nas fases de proestro e diestro no modelo animal de perimenopausa induzida pelo VCD. As concentrações plasmáticas de estradiol se mantiveram inalteradas em ambos os grupos avaliados (controle e VCD), variando apenas em função da fase do ciclo estral. Contudo, as concentrações plasmáticas de progesterona reduziram significativamente no grupo VCD. (Modificado de: Reis et al, 2014).

Figura 12. Interações entre estrogênios, serotonina e noradrenalina. (Modificado: de Deecher et al., 2008)

Acredita-se que os comportamentos relacionados à depressão e ansiedade são modulados pelos ERs do subtipo β , e não α (Walf et al, 2004; Lund et al., 2005; Solomon & Herman, 2009). Resultados deste laboratório já mostraram a expressão de $ER\alpha$, $ER\beta$ e PR no núcleo noradrenérgico *Locus coeruleus* (LC) de ratas (Helena et al., 2006) e camundongos fêmeas (Helena et al., 2009). Isso indica que tanto os estrogênios como a progesterona podem modular diretamente o sistema noradrenérgico nesse núcleo cerebral.

Já foi demonstrado que os neurônios do núcleo dorsal da rafe (NDR) de ratos e camundongos, em ambos os sexos, também expressam $ER\beta$ e $ER\alpha$ (Lu et al., 2001; Sheng et al., 2004), sugerindo modulação direta dos estrogênios sobre o sistema serotoninérgico. Outro estudo evidenciou que camundongos fêmeas *knockout* para $ER\beta$ possuem menor conteúdo de serotonina em diversas regiões encefálicas importantes nos transtornos afetivos (Imwalle et al., 2005).

Assim, a presença de receptores de estrogênios e de progesterona (PR) em áreas cerebrais que controlam a síntese dos neurotransmissores envolvidos com o humor seria esperada, definindo os neurônios dessas áreas como alvos dos esteroides ovarianos. Portanto, é possível que os estrogênios (estriol, 17- β estradiol e estrona) estejam envolvidos na etiologia da depressão e da ansiedade tanto em roedores (Schimit & Rubinow 2009; Solomon & Herman, 2009) quanto em primatas não humanos (Bethea et al., 1998; Bethea et al., 2002). Em ratas ovariectomizadas, o conteúdo plaquetário de 5-HT foi reduzido em relação às do grupo controle, sugerindo um papel dos esteroides ovarianos no metabolismo deste neurotransmissor (Guivcheney & Marcel, 1984). Além

disso, dados clínicos mostram que alterações nas concentrações estrogênicas e da progesterona têm impacto no sistema serotoninérgico (Halbreich 1990; Halbreich & Lumley, 1993).

Dados ainda não publicados deste laboratório, obtidos no teste do nado forçado, mostraram que os animais expostos ao VCD expressam mais comportamentos preditivos de depressão que as do grupo controle. Outros experimentos nos quais foram avaliados os conteúdos de 5-HT no hipocampo e amígdala, áreas cerebrais envolvidas com o humor, demonstram redução significativa deste neurotransmissor nas ratas tratadas com VCD em relação às do grupo controle (Figura 13 A e B). Dessa forma, estes animais parecem apresentar alterações centrais análogas às exibidas pelas mulheres na transição para a menopausa.

Figura 13. Conteúdo de 5-HT no hipocampo (A) e amígdala (B) 80 dias após exposição crônica ao VCD na fase de diestro. Ratas com 28 dias de idade (n=11-15 animais por grupo) receberam injeções subcutâneas de óleo de milho (grupo veículo) ou 4-vinilciclohexeno diepóxido (grupo VCD) por 15 dias consecutivos e foram decapitadas às 9 h entre 75 e 85 dias após o início das injeções. *p <0,05 vs grupo veículo e **p <0,01 vs grupo veículo. (Pestana-Oliveira, et al dados não publicados).

1.6. A Terapia Hormonal Estrogênica na perimenopausa.

O potencial dos estrogênios no tratamento da depressão tem sido sugerido há mais de um século (Easterbrook, 1900). De fato, os estrogênios são esteroides com propriedades neuromodulatórias e neuroprotetoras (Manthy & Behl, 2006).

Estudo clínico conduzido por Schmidt e colaboradores (2000) demonstrou que a terapia com estrogênios durante um curto intervalo de tempo está associada a significativas melhoras no humor em mulheres com quadros de depressão na perimenopausa (Figura 14).

Figura 14. Comparação entre mulheres com depressão na perimenopausa que realizaram terapia estrogênica por três semanas (0.05 mg/d) e mulheres nas mesmas condições fisiológicas que receberam placebo. O grupo que recebeu estrogênio mostrou redução significativa nos escores de sintomas de depressão em relação ao grupo placebo. (Modificado de Schmidt et al., 2000).

Embora alguns trabalhos (Grady et al, 2000; Henderson & Brinton, 2010) tenham demonstrado que a terapia estrogênica administrada durante um longo período pode oferecer riscos à saúde da mulher, aumentando a incidência de eventos tromboembólicos, em ratas ovariectomizadas e de meia idade, o estradiol reduziu significativamente a esquizofrenia e outros danos cerebrais induzidos por substâncias neurotóxicas (Dubal & Wise, 2001). O período para o início da terapia estrogênica foi bastante discutido nos últimos 15 anos. Há hoje um consenso de que esta terapia deve ser iniciada antes do estabelecimento da menopausa, ou seja, no período de transição ou perimenopausa (Grady et al., 2000), o que promove melhorias na qualidade de vida das mulheres uma vez que reduz sintomas como ondas de calor, prejuízo das funções cognitivas e transtornos afetivos como a depressão (Wiklund et al., 1993; Morgan et al., 2007). Tais achados fortalecem os benefícios que a terapia estrogênica pode fornecer, desde que administrada na dose, tempo e idade adequados.

No entanto, as razões pelas quais a terapia com estradiol induz melhoras em alguns sintomas na mulher na perimenopausa permanecem ainda pouco compreendidas, uma vez que as concentrações deste hormônio estão normais ou até mesmo aumentadas nesta fase, e entender estas razões constitui o objetivo geral deste trabalho.

2. *Objetivos*

Considerando que o estradiol estimula a expressão de receptores para a progesterona, sugerimos que o aumento na expressão do PR seria uma forma de compensar os efeitos da redução nas concentrações plasmáticas da progesterona, tornando assim os tecidos, em especial o cérebro mais sensíveis à ação deste hormônio. Além disso, o estradiol estabelece forte interação com os sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do humor e comportamento (Barth et al, 2015).

Dessa forma, utilizando o modelo animal de perimenopausa induzida por VCD, os objetivos deste trabalho foram:

1. avaliar as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona, por radioimunoensaio;
2. investigar o efeito da terapia estrogênica na expressão gênica do PR e ER β em neurônios envolvidos na gênese da ansiedade e depressão, ou seja, neurônios serotoninérgicos (NDR) e noradrenérgicos (LC), por PCR em tempo real;
3. avaliar a expressão gênica do PR e ER β nas áreas cerebrais alvo dos neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, o hipocampo e a amígdala;
4. avaliar os efeitos do estradiol sobre a expressão das enzimas chaves para a sínteses de noradrenalina, a Tirosina hidroxilase (TH) no LC e de serotonina, a Triptofano hidroxilase (TPH₂) no NDR por imunohistoquímica;
5. avaliar o conteúdo de noradrenalina e de serotonina no hipocampo e amígdala, por cromatografia líquida de alta performance e detecção eletroquímica (HPLC/ED).

3. *Material e Métodos*

3.1. Desenho experimental

Ratas fêmeas com 28 dias pós-natal (p.n) receberam diariamente injeções subcutâneas (sc) de VCD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na dose de 160 mg/Kg (128 mg/mL diluído em óleo de milho), ou veículo (1,25mL/Kg de óleo de milho; grupo controle) por 15 dias consecutivos. Aproximadamente 55 dias após a primeira injeção, uma cápsula contendo 17β -estradiol (E) ou óleo foi implantada sc (Grupos O+O; VCD+O; VCD+E). O esfregaço vaginal foi colhido e verificado diariamente pela manhã quinze dias antes da eutanásia, para o acompanhamento do ciclo estral. Entre 75 e 85 dias após o início das injeções de VCD, os animais dos grupos O+O e VCD+O foram decapitados no diestro, e os animais do grupo VCD+E 21 após a implantação das cápsulas, entre 0900 h e 1100 h (Figura 15).

Figura 15. Desenho experimental. Ratas fêmeas com 28 dias p.n receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD/óleo receberam uma cápsula sc contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) ou 17β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas ou perfundidas durante a fase diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia estrogênica (VCD+E), entre 75 e 85 dias após o início da administração de VCD/óleo, entre 0900 h e 1100 h.

O sangue foi colhido para avaliação das concentrações hormonais de estradiol, progesterona e LH por meio de ensaio de ELISA (estradiol) e radioimunoensaio (RIE; progesterona e LH). Os encéfalos também foram retirados para microdissecção bilateral

do HPC, AMI, NDR e LC para posterior avaliação dos níveis de RNAm para PR e ER β por meio de PCR em tempo real. O experimento foi repetido, e o HPC e AMI foram microdissecados para a análise dos conteúdos de 5-HT e NA por meio de cromatografia líquida de alta performance seguida de detecção eletroquímica (HPLC/ED). Em outro experimento, grupos idênticos aos citados acima foram eutanasiados por sobredose anestésica para posterior perfusão. Os encéfalos foram retirados e seccionados no criostato, e as secções do LC e NDR foram utilizadas para avaliação da imunorreatividade às enzimas tirosina-hidroxilase (TH) e triptofano-hidroxilase (TPH), respectivamente.

3.2. Animais

Fêmeas Wistar com 21 dias p.n (idade do desmame), provenientes do Biotério Central da USP em Ribeirão Preto, foram mantidas em grupos de quatro ratas por caixa plástica (40x32x17cm) até o período de realização dos experimentos, quando tinham cerca de 110 dias de idade (cerca de 350 g). Uma semana após o desmame (28 dias p.n) demos início às injeções diárias de óleo ou VCD durante 15 dias consecutivos, conforme já mencionado no desenho experimental (Figura 15). Os animais foram mantidos sob ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas às 06:00h) e temperatura controlada (24 ± 0.5 °C) e com 10-15 renovações de ar/hora. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. O número amostral foi de 6 a 9 animais/grupo experimental, dependendo do parâmetro avaliado. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA), Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (nº 2013.1.1412.58.7).

3.3. Terapia estrogênica

A partir de 83 dias p.n (55 dias após o início das injeções de VCD), foram implantadas subcutaneamente cápsulas contendo 17 β -estradiol (Sigma, St. Louis, USA; grupo VCD+E) ou óleo de milho (grupos: O+O; VCD+O). As cápsulas de Sillastic (Dow Corning Cat nº 508-006; dimensões: 1,5cm de comprimento; 1,44 mm X 1,96mm de diâmetro e 0,49mm de espessura), contendo 8 μ L de 17 β -estradiol (50mg/ml) ou óleo foram confeccionadas conforme descrito por Kiss et al., 2012. Para o implante, as ratas foram pesadas e anestesiadas (ketamine 55mg/Kg; Agener and xylazine 10mg/Kg; Coopers of Brazil, s.c). Após a cirurgia, os animais receberam tratamento profilático com

antibiótico (Pentabiotico Fort Dodge; 0.2 mL/rato intramuscular) e anti-inflamatório (Banamine, Schering-Plough, 2.5 mg/Kg, s.c.).

3.4. Dosagens hormonais

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto. O sangue coletado (armazenado em tubos heparinizados) foi centrifugado a 2500g, por 20 minutos a 4°C e o plasma separado e estocado a -20°C até o momento das dosagens hormonais. As concentrações plasmáticas de estradiol foram determinadas por ensaio de ELISA utilizando kit DRG EIA 2693 (DRG Instruments GmbH, Germany). As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas utilizando kits de RIE específicos da MP Biomedicals (Orangeburg, NY, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio para o estradiol e progesterona foi de 4.7% e 3.6%, respectivamente. Os limites mínimos de detecção foram 8.6pg/mL, 0.02 ng/mL, respectivamente, para o estradiol e progesterona. Para se evitar erro inter-ensaio, todas as amostras de um mesmo experimento foram processadas no mesmo ensaio de cada hormônio.

3.5. Microdissecção das áreas encefálicas

Imediatamente após a decapitação, os encéfalos foram removidos e congelados em gelo seco para posterior microdissecção das áreas de interesse, utilizando-se a técnica de *punch* de Palkovitz (1973). O encéfalo foi fixado a uma peça apropriada, recoberta com meio próprio para congelamento (Tissue-tek o.c.t. compound, Miles INC.) e então adaptada ao criostato com temperatura mantida a - 15°C. Para identificação das áreas analisadas foi utilizado como referência o Atlas de Paxinos e Watson (2007). HPC dorsal, AMI, NDR e LC foram microdissecados para análise da expressão dos RNAm para ERβ e PR. Os conteúdos de serotonina e noradrenalina foram avaliados em microdissecções do HPC dorsal e AMI. Para o HPC dorsal e AMI foram retiradas fatias coronais de 1500 μm obtidas a partir de -1,92 do Bregma (Paxinos e Watson, 2007) e as áreas foram microdissecadas com agulhas circulares de 1.5 mm e 1.0 mm de diâmetro, respectivamente. Para o NDR foram retiradas fatias de 1000 μm obtidas a partir de -7.2 do Bregma (Paxinos e Watson, 2007) e o núcleo foi microdissecado com auxílio de uma agulha circular de 0.7 mm de diâmetro. Para o LC as fatias foram de 1000 μm obtidas a

partir de -6.2 do Bregma (Paxinos e Watson, 2007), e o núcleo foi microdissecado com auxílio de uma agulha circular de 1.0 mm de diâmetro.

3.6. Conteúdos de 5-HT e NA (HPLC/ED)

Os conteúdos de NA, 5-HT no HPC e AMI foram determinados por meio de HPLC-ED. As amostras dos tecidos foram homogeneizadas individualmente por ultrassom com 100 µl de solução de ácido perclórico (PCA 0,15 M) + EDTA (0,1 mM) contendo 380 nM isoproterenol (ISOP) como padrão interno. Cada homogenato foi centrifugado a 15.700g (por 5 minutos, a 4°C), os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membrana de 0,22 µm (Durapore, Millipore) e então submetidos à hidrólise por aquecimento a 94 ° C durante 5 min antes da injeção no sistema de HPLC com um auto-injector (SIL-10ADvp; Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada a 32°C em coluna de fase reversa RP-18e 250x4 mm (Kinetex EVO C18, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA), precedida por uma pré-coluna RP-18e 4x4 mm (Lichrospher, 5 µm; Merck). A fase móvel foi constituída por 75 mM de dihidrogenofosfato de sódio, 15 mM citrato de sódio, 10 mM cloreto de sódio, 25 µM EDTA, 1.7 mM de ácido 1-octanesulfônico de sódio (Sigma-Aldrich) e 4% de metanol (Merck Chemical Inc., Gibbstown, NJ, EUA). O pH foi ajustado para 3.0 com ácido fosfórico. A vazão da bomba (LC-10Advp; Shimadzu) foi de 0,8 ml/min, e o potencial do detector foi de 0,65 V (Decade; Antec, Leyden, Holanda). Cada amostra gerou um cromatograma que foi registrado e analisado com o software Class-VP (Shimadzu). NA e 5-HT foram identificados pelo seu tempo de retenção de pico, e quantificados pelo método de padrão interno em função da altura de cada pico. Todas as amostras foram processadas na mesma análise para evitar erro inter-ensaio. No HPC dorsal e AMI, as variações intra-ensaio foram de 6.1% e 5.0%, respectivamente. Para cada amostra, os níveis de 5-HT e NA foram normalizadas em relação à quantidade de proteína presente detectada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Laboratories, Inc; Bradford, 1976), no sedimento obtido por centrifugação do homogenato, e expressos em picogramas por micrograma de proteína (pg/µg).

3.7. Análise semi-quantitativa de expressão gênica por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman® – PCR).

Os encéfalos foram removidos em condições RNase *free* e em seguida estocados no freezer a -70°C até a etapa de microdissecção dos núcleos estudados. Amostras de tecidos do HPC dorsal, AMI, LC e NDR foram obtidas pela técnica de *punch* conforme descrito anteriormente. O RNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen). O RNA total foi quantificado utilizando-se um Nanodrop 2000c UV-vis Spectrophotometer (Thermo-Scientific®, USA). A PCR em tempo real para ERβ e PR foi realizada utilizando-se o sistema Step One Plus real-time PCR adquirido da Applied Biosystems. Após a etapa acima descrita, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 250 ng de RNA, por kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O cDNA obtido foi utilizado para as reações da PCR em tempo real. Sondas e iniciadores dos genes de ERβ (Rn00562610_m1; símbolo: Ers2) e PR (Rn01448227_m1 para PR1; símbolo: Pgr) marcados com repórter fluorescente 6-carboxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET) foram utilizados. As reações foram realizadas em volumes de 12 ul (4 ul de cDNA), utilizando reagentes TaqMan EZ RT-PCR (Perkin Elmer, Foster City, CA cat# N808-0235), seguindo as orientações do fabricante. As reações com 40 ciclos foram realizadas em um instrumento ABI PRISM 7000 (Catálogo 4330087, Perkin Elmer, Foster City, CA). A β-actina, GAPDH e 18S foram utilizados como genes de referência (controles endógenos) da reação. As expressões gênicas de ERβ e PR foram consideradas para amostras que apresentarem intensidades de fluorescência acima de dois desvios padrão da média das intensidades dos controles negativos (com ausência de RNA). A expressão do genes-alvo foi normalizada utilizando-se o controle endógeno e calculada, pela comparação com o calibrador (grupo controle dos protocolos experimentais), segundo a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{desconhecido} - \Delta Ct_{Calibrador}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Desta forma, o resultado obtido representou a expressão relativa de RNAm dos genes de interesse.

3.8. Perfusão e Imunohistoquímica para TPH e TH

Após sobredose anestésica e coleta de sangue, as ratas foram perfundidas através da artéria aorta ascendente com 50 mL de tampão fosfato salina 0,01M (PBS, pH 7,4), contendo heparina (5UI/mL) à temperatura ambiente, seguido de 400 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (PFA 4%; pH 7.4) a 4°C. Os encéfalos foram removidos imediatamente após a perfusão, pós-fixados em PFA 4% por 24 horas

a 4°C. Após a fixação, os cérebros foram mergulhados em solução de sacarose 30% diluída em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M) à temperatura de 4°C, até a saturação. Em seguida à crioproteção os cérebros foram mergulhados durante 1 minuto em isopentano 99% (Vetec, C₅H₁₂) mantido entre -45 e -50°C de temperatura. Logo após o congelamento, os tecidos foram armazenados a -70°C até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Foram obtidos cortes coronais seriados de 30 µm de toda a extensão anteroposterior do LC e NDR os quais foram armazenados em solução crioprotetora (Watson et al., 1986) a -20°C, onde permaneceram até o processamento imunohistoquímico para TH no LC e TPH no NDR.

A imunohistoquímica foi realizada pelo método de *free-floating*. Antes de iniciar o processamento dos cortes, estes foram lavados três vezes, por 10 minutos, em PBS 0,01M para remoção da solução crioprotetora. Em seguida, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 1%) por 10 minutos, para a eliminação da peroxidase endógena. Todos os passos de preparação do tecido foram realizados a temperatura ambiente, com soluções diluídas em PBS 0,01M (pH=7.4), intercalados por três lavagens com PBS (0.01M) durante 10 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 60 minutos (temperatura ambiente) em albumina bovina (BSA 1%; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O mesmo protocolo foi utilizado para todos os processamentos imunohistoquímicos realizados neste trabalho, havendo modificações nos anticorpos primário e secundário.

As secções do LC foram incubadas por 40 h a 4°C com anticorpo monoclonal anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH2, Sigma), diluído 1:500000 em PBS⁺ (TX-100 0,3% e BSA 1% em PBS 0,01M por 40 h a 4°C. Depois de lavados, os cortes foram incubados com um 2º anticorpo biotilado, uma anti-IgG de camundongo produzida em cavalo (BA-2001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), diluído 1:600 em PBS+ durante 90 minutos. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (1:100; KIT ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), por 60 minutos à temperatura ambiente. A solução de 25 mg/mL de sulfato de níquel, 0.2 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine-HCl (DAB) e 0.03% H₂O₂ (Ni-DAB) diluído em 0.175 M de acetato de sódio foi usada como cromógeno. Para as secções do NDR foi utilizado o anticorpo policlonal anti-TPH produzido em cabra (1:2000; Millipore, Temecula, CA, USA), por 40h a 4°C. O anticorpo secundário foi o biotilado anti-cabra feito em coelho (BA 6000; 1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), incubado por 1h em temperatura ambiente.

As secções foram montadas em lâminas (Fisherbrand Superfrost Plus; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) gelatinizadas (0.1 % gelatina e 0.01 % chromium potassium sulfate) secas à temperatura ambiente, lavadas com etanol e xilol e cobertas com lamínulas utilizando-se Entellan (Merck, Germany) e armazenas em caixas plásticas para posterior análise ao microscópio óptico Zeiss Axioskope 2 plus. Para as contagens foi utilizado o Atlas de Paxinos e Watson (2007) como referência para identificação das áreas analisadas.

Para a quantificação da densidade de neurônios noradrenérgicos do LC, dada pela porcentagem de área, as imagens obtidas bilateralmente por toda a extensão rostro-caudal do núcleo, de -9.48 a -10.32 mm do Bregma foram capturadas utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioskope 2 plus e as fotos foram analisadas por meio do sistema de imagem do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

O número de neurônios imunorreativos ao TPH foi quantificado por toda extensão rostro-caudal do NDR de -7.32 a -8.58 mm do bregma. O número de células TPH-positivas foi analisado em três níveis anatômicos: rostral (-7.32 mm do bregma), médio (-7.80 mm do bregma) e caudal (-8.5 mm do bregma) cada um dividido em três sub-regiões, lateral, dorsal e ventral como descrito por Kunitura et al., 2015.

As imagens digitais foram então convertidas em formato de arquivo de imagem e importadas para o Adobe Photoshop (Adobe Photoshop Lightroom®, versão 5.3, Adobe Systems, Inc., San Jose, CA), no qual o balanço de cores foi ajustado para apresentação.

3.9. Análise estatística

As comparações foram realizadas usando one-way ANOVA seguido do teste pós-avaliação *Newman-Keuls* usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. A significância foi aceita em $P < 0,05$.

4. Resultados

As concentrações plasmáticas de estradiol foram avaliadas com o objetivo de comprovarmos a eficácia da terapia com 17β -estradiol. Não houve diferenças significativas entre os animais do grupo O+O e os do grupo VCD+O. No entanto, nos animais do grupo VCD+E as concentrações plasmáticas deste hormônio foram significativamente maiores (Figura 16A). A figura 16B apresenta as concentrações plasmáticas de progesterona. Como esperado, no grupo VCD+O as concentrações estão significativamente mais baixas em relação ao grupo O+O. O tratamento com estradiol reestabeleceu as concentrações plasmáticas de progesterona aos níveis dos animais do grupo controle.

Figura 16. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17β -estradiol (E) nas concentrações plasmáticas de estradiol (A) e progesterona (B) Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia com E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD/óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística ($n = 6-9$).

No LC, a expressão gênica do PR não foi alterada pela depleção folicular induzida pelo VCD nem pela terapia estrogênica (Fig. 17A). Contudo, a expressão gênica do ER β foi menor nos animais na periostropausa (VCD+O) quando comparados aos controles, e a terapia estrogênica não foi capaz de reverter esta redução (Figura 17B).

Figura 17. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β no *Locus Coeruleus* (LC; A e B). Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17 β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia com E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística (n = 6-9).

Não foram observadas diferenças significativas na densidade de neurônios noradrenérgicos do LC em nenhum dos grupos estudados (Figura 18).

Figura 18. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na densidade de células imunorreativas à tirosina-hidroxilase (TH) no LC. Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17 β -estradiol (VCD+E). Fotomicrografias representativas (10X) das seções coronais do LC marcado para TH. As ratas foram perfundidas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia com E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM (n = 6-9)

Na amígdala dos animais na periestro-pausa observamos redução do conteúdo de NA e a terapia com estradiol não promoveu alterações neste parâmetro. No hipocampo não observamos diferenças significativas no conteúdo de NA em nenhum dos grupos avaliados (Figura 19 A e B)

Figura 19. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) no conteúdo de NA na amígdala (AMI; A) e hipocampo (HIP; B). Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17 β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística ($n = 6-9$).

As ratas na periestro-pausa apresentaram níveis reduzidos do RNAm para PR no NDR e o estradiol não modificou isto (Figura 20A). A expressão gênica para o ER β também foi menor nos animais na periestro-pausa, porém reestabelecida aos níveis dos animais controles após a terapia com estradiol (Figura 20B).

Figura 20. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR; A e B). Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O + O e VCD + O) ou 21 dias após o início da terapia com E (VCD + E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística ($n = 6-9$).

O número de células imunorreativas à TPH, avaliado por toda extensão do NDR (rostral, médio e caudal), foi apresentado separadamente nas três regiões: lateral, dorsal e ventral na figura 21 A-C.

Na porção rostral do DRN, o número de células TPH-positivas no grupo VCD+O foi menor em relação ao grupo controle nas sub-regiões lateral e ventral. O tratamento crônico com estradiol foi capaz de restaurar o número de neurônios imunorreativos à TPH apenas na sub-região ventral. Contudo, quando analisado o número total de células TPH-positivas na porção rostral do NDR, não foi observado este efeito positivo do estradiol.

No nível médio, o número de células imunorreativas à TPH nos animais na periostropausa foi menor que no grupo controle em todas as sub-regiões. No entanto, apenas na sub-região lateral a terapia estrogênica restaurou o número destas células. Este efeito positivo do estradiol não foi observado no número total de células TPH-positivas da porção medial do NDR.

Na porção caudal do NDR, a sub-região lateral não foi afetada nem pelo tratamento com VCD nem pela terapia estrogênica. Por outro lado, nas sub-regiões dorsal e ventral houve declínio considerável no número de células TPH-positivas nas ratas na

periestropausa quando comparadas às do grupo controle e a terapia com estradiol foi capaz de reverter este efeito em ambas as sub-regiões. Estes efeitos, do VCD e do estradiol foram observados na somatória de toda a porção caudal do NDR.

Figura 21. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17β-estradiol (E) na imunorreatividade à triptofano-hidroxilase (TPH) no NDR. Fotomicrografias representativas (10X) das seções coronais do NDR marcadas para TPH nas seções Rostral (A; -7,32 mm do bregma), Medial (B; -7,80 mm do bregma) e Caudal (C; -8,28 mm do bregma) do DRN. As caixas pontilhadas indicam as sub-regiões laterais (L), dorsais (D) e ventrais (V) em cada nível do NDR. Aq: aqueduto. Barra de escala 50μm. As barras dos gráficos mostram o número de células TPH positivas por seção nas regiões Rostral (painel à esquerda), Medial (painel do meio) e Caudal (painel à direita) do DRN. Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de ratos VCD ou óleo foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17β-estradiol (VCD+E). As ratas foram perfundidas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média ± SEM. A significância foi aceita em P < 0,05. Letras diferentes indicam diferença estatística (n = 6-9).

Não foram observadas alterações na expressão relativa do RNAm para PR e ERβ na amígdala em nenhum dos grupos avaliados (Figuras 22 A e B).

No hipocampo também não foram observadas diferenças significativas na expressão relativa do RNAm para PR nos três grupos estudados (Figura 22C). Embora não tenha havido diferença na expressão de ERβ no hipocampo das ratas na periostropausa (grupo VCD+O) quando comparadas às do grupo controle (grupo O+O), a terapia com estradiol aumentou a expressão gênica deste receptor (Figura 22D).

Figura 22. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e do tratamento crônico com 17 β -estradiol (E) na expressão relativa do RNAm para PR e ER β na amígdala (AMI; A e B) e hipocampo (HPC; C e D). Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17 β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O+O e VCD+O) ou 21 dias após o início da terapia com E (VCD+E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística ($n = 6-9$).

Tanto na amígdala como no hipocampo houve redução no conteúdo de 5-HT nos animais na periostropausa (Figuras 23 A e B) e a terapia com estradiol foi capaz de reestabelecer os níveis de 5-HT aos valores controle apenas no hipocampo.

Figura 23. Efeito da depleção folicular induzida por VCD e tratamento crônico com 17β -estradiol (E) na no conteúdo de 5-HT na amígdala (AMI; A e B) e hipocampo (HIP; C e D). Ratas fêmeas com 28 dias receberam injeções s.c de óleo (O) ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) por 15 dias consecutivos. 55 dias após a primeira injeção de VCD ou óleo, foi implantada s.c uma cápsula contendo óleo de milho (grupos O+O e VCD+O) e em outro grupo VCD, uma cápsula contendo 17β -estradiol (VCD+E). As ratas foram decapitadas no diestro (grupos O + O e VCD + O) ou 21 dias após o início da terapia E (VCD + E), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / óleo, entre 0900 h e 1100 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. A significância foi aceita em $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística ($n = 6-9$).

5. Discussão

No tratamento clínico da perimenopausa é equivocadamente considerado que, assim como na menopausa, as mulheres sintomáticas estão deficientes de estrogênio e a redução das concentrações plasmáticas deste hormônio seria uma das causas para os sintomas exibidos durante esse período (Oudshoor, 1994; Prior & Hitchcock, 2011). Outros estudos demonstraram que as concentrações estrogênicas se encontram normais ou elevadas, diminuindo apenas na fase final da perimenopausa, já próximo à menopausa (Santoro et al., 1996; Prior, 2005; Burger et al., 2008; Sowers et al., 2008; El Khoudary et al, 2016; Tepper et al, 2012; Santoro & Randolph Jr, 2011; Prior JC & Hitchcock, 2011). Portanto, devido às controvérsias a respeito da terapia estrogênica na perimenopausa, o presente buscou contribuir para a melhor compreensão das possíveis razões pelas quais a terapia com estradiol pode melhorar os sintomas da perimenopausa, mesmo na presença de níveis normais ou elevados de estrogênios.

Recentemente, observamos no modelo animal de perimenopausa induzida pelo VCD alterações hormonais análogas às aquelas exibidas pelas mulheres, ou seja, manutenção das concentrações plasmáticas de estradiol e redução nas de progesterona (Reis et al., 2014). É interessante ressaltar que estes dados foram reproduzidos no presente estudo. Além disso, o aumento nos níveis de estradiol observado nas ratas na periropausa que receberam a terapia estrogênica confirmou a eficácia do tratamento hormonal.

Estradiol e Progesterona: Uma vez que as concentrações plasmáticas de estradiol permanecem inalteradas durante a perimenopausa, muitos sintomas observados neste período poderiam ser atribuídos à redução nas concentrações de progesterona. Curiosamente, nas ratas na periropausa submetidas à terapia estrogênica as concentrações plasmáticas de progesterona foram reestabelecidas aos valores normais. Esta ação provavelmente é devida ao caráter pleiotrópico que os estrogênios exibem, influenciando as mais diversas funções no organismo (McEwen & Alves, 1999; Wend et al., 2012). Os mecanismos pelos quais o estradiol induz aumento das concentrações de progesterona ainda não estão bem estabelecidos, contudo já foi demonstrado que este hormônio é capaz de modificar a esteroidogênese ovariana (Munabi et al., 1983). Ratas intactas da linhagem Sprague-Dawley que receberam cápsulas contendo etinilestradiol apresentaram aumento da atividade da enzima 3-βHydroxysteroid deshydrogenase-isomerase (3-βHSD), que acelera a conversão de pregnenolona em progesterona, aumentando a síntese deste hormônio. Além disso, foi demonstrado que a terapia com estrogênio reduziu a atividade da enzima 17-Hidroxilase (17-OH), responsável pela

clivagem da progesterona em 17OH-progesterona. Deste modo, aumentando a síntese e reduzindo a degradação, o estradiol é capaz de induzir o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona.

Os progestagênios são a uma classe de hormônios esteroidais, dos quais fazem parte a progesterona natural e progestinas (progesterona sintética), estes se ligam ao receptor de progesterona (PR). Apesar de ser amplamente conhecida como um hormônio, a progesterona também pode ser classificada como um neurohormônio. Quando hormônio é sintetizada a partir do colesterol nos ovários, córtex adrenal e placenta, enquanto a neuroprogesterona é sintetizada localmente em neurônios e em células gliais. A progesterona sintetizada no SNC ou periféricamente pode também ser metabolizada e convertida em outro neuroesteroide, a allopregnanolona (ALLO), e as concentrações de ALLO acompanham as de progesterona. A primeira etapa da sua síntese é a conversão, pela enzima 5 α -redutase, em 5 α -dihydroprogesterona, e esta por sua vez é convertida em ALLO pela enzima 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase (Penning et al, 1985, Russell & Wilson, 1994). O estradiol age induzindo o aumento das concentrações de progesterona tanto periférica como centralmente, isto foi observado por Miscevyh et al, 2008. Utilizando cultura de células astrocitárias do hipotálamo, foi observado que a incubação destas células *in vitro* com estradiol induziu aumento na concentração da ALLO no meio de incubação.

Estudos recentes estabeleceram uma relação entre sintomas da perimenopausa e a ALLO. De fato, recentemente foi descrita a relação entre os níveis reduzidos de ALLO e vários sintomas da perimenopausa, entre eles a depressão (Slopien et al, 2017). Menores concentrações de ALLO durante a perimenopausa reforçam seu papel nas alterações de humor e comportamento nesse período (Genazzani & Pluccino, 2012). Esta neuroprogesterona exerce efeitos ansiolíticos por atuar como um agonista do receptor GABA_A (Lovick, 2006), modulando assim as respostas ao estresse, humor e comportamento.

Desse modo, é possível que os efeitos benéficos da terapia estrogênica durante a perimenopausa se deem por meio do aumento dos níveis de ambas, ALLO e progesterona. De fato, a redução das concentrações plasmáticas de progesterona tem sido apontada como uma das prováveis razões para os sintomas da perimenopausa (Santoro et al., 1996; Prior & Hitchcock, 2011). Além disso, baixas concentrações de progesterona foram associadas às alterações de humor que ocorrem na síndrome pré-menstrual e depressão pós-parto (Lovick, 2012; Lovick et al., 2017; Angst et al., 2001). Resultados obtidos a

partir de modelos animais também contribuem para compreensão do papel da progesterona na modulação dos comportamentos de ansiedade e depressão. Foi observado que a progesterona reduz tanto comportamentos preditivos de ansiedade como de depressão em roedores (Frye et al., 2011; Mora et al., 1996; Walf et al., 2004). Nosso laboratório já demonstrou, utilizando o modelo VCD, aumento dos comportamentos preditivos de ansiedade no LCE no diestro. Estas ratas também apresentaram menores concentrações de progesterona do que as do grupo controle (Reis et al., 2014). É importante ressaltar que o diestro é a fase do ciclo estral caracterizada pela redução da progesterona lútea e é análoga à fase pré-menstrual em mulheres (Lovick et al., 2012).

Assim, a progesterona poderia estar ligada à fisiopatologia de alguns distúrbios de humor e de ansiedade em períodos marcados por grandes flutuações hormonais. Além de comportamentos preditivos de ansiedade, também foi observado em nosso laboratório, no modelo de perimenopausa induzido pelo VCD, aumento dos comportamentos preditivos de depressão no teste do nado forçado (Weismeyer et al., dados não publicados). Portanto, é possível que a redução das concentrações plasmáticas de progesterona durante a perimenopausa seja um fator desestabilizador, favorecendo a gênese ou exacerbação dos distúrbios de humor e ansiedade (Prior & Hitchcock, 2011).

Conforme mencionado anteriormente, tanto em modelos animais como em mulheres na perimenopausa, as concentrações plasmáticas de estradiol estão normais ou mesmo elevadas (Reis et al., 2014; Santoro et al., 1996; Prior, 2011; Prior & Hitchcock, 2011). Assim, as mudanças nos níveis de progesterona precedem as mudanças no estradiol e há aumento na relação estradiol/progesterona, que também pode contribuir para as mudanças comportamentais e físicas típicas deste período (Santoro et al., 1996). Curiosamente, a terapia com estrogênio quando adotada antes do estabelecimento da menopausa, ainda na perimenopausa, parece melhorar a qualidade de vida das mulheres, reduzindo os sintomas como ondas de calor e distúrbios do humor (Wiklund et al., 1993, Morgan et al., 2007).

Receptores para a progesterona (PR): Uma das nossas hipóteses foi a de que o declínio nas concentrações de progesterona poderia ser compensado pelo aumento da expressão de PR, uma ação típica do estradiol. De fato, entre os vários sistemas de regulação envolvidos no controle da expressão do PR (Savourn et al., 1998), o 17 β -estradiol e outros estrogênios são os principais moduladores na maior parte das células e tecidos. Na verdade, induzir a expressão deste receptor é uma das principais ações que o

estradiol exerce no SNC (MacLusky & McEwen 1978; Bethea, 1994; Graham & Clarke, 1997; Alves et al., 2000; Helena et al., 2009).

Receptores tipo β para o estradiol: O estradiol realiza suas funções nas células e tecidos primariamente por meio da ligação a dois tipos de receptores nucleares: ER α e ER β , os quais são codificados por genes distintos localizados em diferentes cromossomos (Kuiper et al., 1996). A sinalização intracelular clássica envolve a ligação do hormônio ao receptor, seguida da formação de dímeros (heterodímeros e homodímeros) e sua translocação para o núcleo onde atuarão como fatores de transcrição nos genes alvos dos receptores (Jensen et al., 1968; Shults et al, 2018). Sabe-se que ambos os receptores para estradiol compartilham inúmeras similaridades tanto estruturais como moleculares. Porém no que diz respeito à localização e funcionamento, especialmente no SNC, ER α e ER β exibem peculiaridades (McEwen, 2001; Ascenzi, Bocedi, & Marino, 2006; Borrow & Handa, 2017). Enquanto a sinalização via ER α está intimamente relacionada à função reprodutiva, o que é justificado por sua robusta distribuição em áreas cerebrais que regulam esta função (APO, PVN e núcleo arqueado) (Shughrue et al., 1997; Laflame et al., 1998; Mitra et al., 2003), a sinalização mediada pelo ER β é relevante para as funções não-reprodutivas, como cognição e comportamento afetivo e estresse (Rissman et al., 2002; Walf, 2010), visto que é altamente expresso no hipocampo, amígdala, NDR, cortex, bem como outras regiões cerebrais envolvidas no comportamento (McEwen, 2001; Mitra et al., 2003; Helena et al., 2009; Sugiyama et al., 2010).

➤ O SISTEMA NORADRENÉRGICO

O sistema noradrenérgico do Locus Coeruleus: O LC compreende um conjunto de neurônios noradrenérgicos intimamente envolvido com a regulação da liberação do Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante (LHRH) e do Hormônio luteinizante (LH). Nosso laboratório demonstrou que a ativação dos neurônios do LC e a noradrenalina por ele liberada é necessária para a gênese do pico pré-ovulatório de LH (Franci & Antunes-Rodrigues et al, 1985; Anselmo-Francini et al, 1997, Helena et al, 2002, Szawka et al, 2007). De fato, este pico é precedido e acompanhado por um aumento da atividade dos seus neurônios, medida pela expressão de FOS (Martins-Aferri et al, 2003).

Nosso laboratório também demonstrou que os neurônios do LC expressam receptores para estradiol e progesterona e a expressão de ER α e PR acompanha as flutuações dos esteroides ovarianos que ocorrem durante o ciclo estral (Helena et al,

2006). Em ratas ovariectomizadas, nossos estudos demonstraram que o tratamento crônico com estradiol inibe a atividade dos neurônios do LC (Szawka et al., 2009) assim como diminui a liberação de noradrenalina na APO (Szawka et al., 2013), área alvo das projeções destes neurônios e produtora de LHRH. Por outro lado, nos trabalhos acima citados também demonstramos que, em ratas pré tratadas com estradiol, a injeção aguda de progesterona aumenta intensamente tanto a atividade dos neurônios do LC como a liberação de noradrenalina na APO. Assim, sugerimos que o tratamento com estradiol aplicado por 3 dias deve induzir a expressão de PR no LC, o que justifica a forte ação da progesterona na liberação de noradrenalina. De fato, nós demonstramos uma ação muito clara e consistente do estradiol em aumentar a expressão de PR no LC (Helena et al., 2009).

PR e LC: Nos neurônios do LC a expressão de PR nas ratas na periestrofpausa foi igual à das ratas controles. Considerando-se que as concentrações plasmáticas de estradiol das ratas na periestrofpausa encontravam-se normais, não foi surpresa que a expressão de PR estivesse em níveis normais. No entanto, foi surpreendente o fato de que o estradiol não tenha modificado esta expressão.

Uma razão que poderia explicar a ineficiência do estradiol sobre os níveis de PR observada no presente estudo é o fato de suas concentrações plasmáticas não sofrerem alterações, diferente da ovariectomia, quando as concentrações plasmáticas dos esteroides estão drasticamente reduzidas. Muitos estudos que avaliam os efeitos do estradiol sobre a expressão do PR, fazem uso deste modelo (Frye et al., 2012; Helena et al, 2009). Dessa forma, é importante ressaltar que nossas ratas apresentam concentrações inalteradas deste hormônio e o ciclo estral ainda é regular. Uma vez que a regulação da expressão do PR varia de acordo com a fase do ciclo (Guerra-Araiza et al, 2000; Helena et al, 2006; Sá & Fonseca, 2016) e difere daquelas em animais ovariectomizados, os resultados aqui observados não se assemelham àqueles vistos em outros trabalhos.

Além disso, a ausência do efeito do estradiol sobre a expressão de PR nos dois núcleos avaliados pode estar relacionada a alteração da função ovariana destes animais. Furuta e colaboradores (2010) observaram que em ratas com idade avançada ocorre uma atenuação na expressão do PR em resposta ao estradiol quando comparadas à jovens. Uma vez que nossas ratas são jovens (aproximadamente 110 dias de idade), e não observamos a resposta ao estradiol em nenhum dos núcleos estudados, é possível que o “envelhecimento” ovariano, provocado em nossos animais pela aceleração da depleção

folicular induzida pelo VCD, esteja mais relacionado com a menor sensibilidade dos neurônios ao estradiol do que o envelhecimento somático.

ERβ e LC: Como já considerado anteriormente, além do ERα, o LC expressa ERβ de forma abundante (Jin et al., 2000; Helena et al., 2009). Assim, outra hipótese testada para tentarmos compreender o efeito benéfico do estradiol sobre os sintomas da perimenopausa foi a de que, apesar das concentrações de estradiol estarem normais, os neurônios das áreas avaliadas poderiam ter a sensibilidade reduzida a este hormônio, ou seja, a expressão dos receptores para este hormônio poderia estar diminuída. Dessa forma, nós investigamos a expressão gênica dos receptores para o estradiol do tipo β, por estarem relacionados aos distúrbios de humor.

Nossos dados mostraram que nas ratas na periostropausa há redução na expressão do ERβ nos neurônios do LC. Embora dados a respeito da expressão de ERβ na perimenopausa sejam escassos, já foi demonstrado em roedores que há redução nos níveis de ERβ em função da idade em várias áreas do cérebro como no córtex cerebral, hipocampo, bulbo olfatório, amígdala e NDR (Mehra et al., 2005; Sharma and Thakur, 2006; Yamaguchi-Shima and Yuri, 2007). Contudo, nestes estudos foram comparados animais jovens e de meia-idade ou velhos, sendo difícil definir se esta redução na expressão do ERβ foi causada pelo envelhecimento somático ou pela depleção folicular ovariana. No modelo de perimenopausa induzida pelo VCD é possível desvincular o envelhecimento somático do reprodutivo, visto que as ratas ainda são jovens. Dessa forma, podemos sugerir que a menor expressão de ERβ nos neurônios do LC poderia ser consequência do envelhecimento ovariano e não do envelhecimento somático. Portanto, a hipótese de que a sensibilidade de neurônios alvo do estradiol possa estar diminuída neste período de transição da vida reprodutiva parece bastante plausível.

No LC, a redução na expressão de ERβ não foi modificada pelo estradiol. Esta ausência de efeito do estradiol parece não ser devida à idade, uma vez que já demonstramos anteriormente em ratas jovens que o tratamento com estradiol não afeta a expressão de ERβ nos neurônios noradrenérgicos do LC (Helena et al., 2009). É importante enfatizar que as ratas utilizadas nesse estudo de 2009 foram submetidas à ovariectomia e as ratas do presente estudo eram intactas e com ciclo estral regular, também não podemos concluir que a ausência de efeito do estradiol se deva à falha ovariana.

Densidade de neurônios noradrenérgicos do LC: No presente estudo, também investigamos os efeitos da depleção folicular induzida pelo VCD, bem como da terapia estrogênica sobre a densidade de células imunorreativas à enzima Tirosina Hidroxilase (TH), enzima chave para a síntese de noradrenalina no LC, o principal núcleo noradrenérgico do cérebro, e uma região crucial para mediação das respostas ao estresse. Não observamos diferenças significativas entre os grupos avaliados o que mostra que este núcleo parece não ser afetado pela depleção folicular e que o estradiol não exerce efeitos na plasticidade neuronal deste núcleo em nosso modelo experimental.

Os dados da literatura sobre o efeito do estradiol na expressão de TH no LC são contraditórios, e sugerem que a resposta pode variar de acordo com o tempo, a dose e a forma de administração. Em ratas ovariectomizadas foi demonstrado que a terapia estrogênica administrada de forma contínua por meio de cápsulas não altera a expressão gênica de TH no LC (Tseng et al., 1999). No entanto, Serova e colaboradores (2002) observaram aumento na expressão gênica de TH no LC em ratas ovariectomizadas que receberam 5 injeções subcutâneas de estradiol em um intervalo de 12h, efeito semelhante foi observado em macacas ovariectomizadas (Pau et al, 2000). Simone e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de dose alta e baixa de etinil estradiol em ratas intactas e mostraram que doses baixas diminuem a expressão de TH no LC enquanto que dose alta não altera isto. É importante mais uma vez ressaltar que nas ratas na peri menopausa as concentrações plasmáticas de estradiol não estão reduzidas, o que pode justificar em parte a imunoreatividade para TH não alterada no LC. Além disso, em estudo recente do nosso laboratório, observamos que nas ratas na peri menopausa o número de neurônios TH ativados (Fos+) pelo estresse não foi diferente daquele dos animais controles não estressados (Rodrigues et al, dados não publicados).

Noradrenalina na amígdala e hipocampo: Embora a maioria dos estudos sobre transtornos afetivos e de ansiedade deem maior atenção ao papel da 5-HT nestas alterações, o papel da noradrenalina na fisiopatologia das desordens afetivas também tem sido amplamente discutido (para revisão ver: Maletic et al, 2017).

Os neurônios do LC se projetam difusamente para todo o prosencéfalo, incluindo áreas cerebrais envolvidas no controle das emoções, como amígdala e hipocampo (Dahlström & Fuxe, 1964). Por esta razão, nós avaliamos o conteúdo de noradrenalina em ambas as áreas.

McCall e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento da atividade tônica dos neurônios do LC provocada pelo estresse induz comportamento do tipo ansioso, enquanto o bloqueio desta atividade neuronal elevada suprime a ansiedade induzida pelo estresse. A ativação das aferências CRHérgicas da amígdala para o LC aumentam a atividade tônica do LC e induz comportamento preditivo de ansiedade. Assim, o LC parece ser um mediador crítico da ansiedade aguda induzida pelo estresse. Uma vez que do LC partem projeções para a amígdala (Asan, 1998; Zhang et al, 2013) e que a estimulação da amígdala basolateral (ABL) induz comportamento preditivo de ansiedade (Siuda et al, 2016), é necessário compreender como o sistema noradrenérgico do LC pode, atuando na ABL, alterar tais comportamentos. Recentemente McCall e colaboradores (2017) demonstraram que a fotoestimulação das projeções do LC para a ABL induz liberação de NA e que o aumento do tônus noradrenérgico é mediado pela ativação de receptores β -adrenérgicos de neurônios na ABL que se projetam para regiões ansiogênicas do cérebro, tais como hipocampo ventral e amígdala central produzindo assim, comportamentos preditivos de ansiedade. Considerando este mecanismo proposto, a menor quantidade de NA encontrada na amígdala no presente estudo se contrapõe à observação de que as ratas na periestro-pausa manifestam mais comportamentos preditivos de ansiedade.

O menor conteúdo de noradrenalina na ABL das ratas na periestro-pausa não coincide com a densidade de neurônios TH positivos no LC que não foi afetada neste período de transição. É possível, portanto, que esta alteração do tônus noradrenérgico na ABL esteja relacionada às alterações de outros grupamentos neuronais noradrenérgicos (como o A1 e A2, por exemplo). De fato, foi sugerido que o aumento de NA na amígdala parece envolver a ativação de eferentes noradrenérgicos originados do grupo A2 (localizado no núcleo do trato solitário) que se projetam para a amígdala (Zardetto-Smith & Gray, 1990). É possível também que a participação do LC possa ocorrer apenas em situações de estresse, como mostrado por McCall e colaboradores (2015). De fato, em nosso laboratório observamos que, na periestro-pausa, ratas submetidas a estresses prévios apresentaram maior atividade dos neurônios do LC em resposta ao estresse por contenção quando comparadas às ratas controles, o que não ocorre nas ratas não submetidas ao estresse prévio. No presente estudo as ratas não foram previamente estressadas, o que pode justificar a ausência de alteração no sistema noradrenérgico do LC. É possível que os mecanismos de controle destas vias estejam alterados na periestro-pausa, mas os mecanismos pelos quais ocorrem tais alterações ainda não foram elucidados.

Diversos estudos têm demonstrado que os estrogênios podem modular a neurotransmissão noradrenérgica ao longo do SNC, e isto ocorre por meio da liberação de noradrenalina, regulação de seus receptores, bem como pelos processos de síntese e metabolização do neurotransmissor; o resultado final é o aumento da disponibilidade da NA (para revisão ver: Vega-Rivera, et al 2013). Contudo, na ABL, o tratamento crônico com o estradiol não foi capaz de prevenir a redução no conteúdo de NA. Em ratas ovariectomizadas, também foi demonstrado que a terapia com estradiol não afeta os níveis de NA na amígdala (Pandaranandaka, et al 2006). Estes dados sugerem que, se a diminuição no conteúdo de NA observada na peri menopausa envolve outros núcleos, que não o LC, estes núcleos também parecem não ter sido afetados pelo estradiol.

Discordante do observado no SNC, um estudo desenvolvido com mulheres na perimenopausa demonstrou que a terapia com estrogênios foi capaz de atenuar as concentrações totais de NA corporal (Sudhir, et al 1997). É possível, portanto que nesta fase da vida reprodutiva, o sistema simpático periférico seja controlado por este hormônio de forma diferenciada daquela observada no SNC.

No hipocampo não foram observadas diferenças entre os três grupos avaliados, ou seja, nem a depleção folicular induzida pelo VCD nem a terapia estrogênica foram capazes de alterar o conteúdo de NA nesta região. Nossos achados vão ao encontro de um estudo realizado com ratas ovariectomizadas, submetidas à terapia estrogênica que não apresentaram modificações nos níveis de NA no hipocampo (Pandaranandaka, et al 2006). É importante ressaltar que os efeitos dos estrogênios sobre os níveis de neurotransmissores variam em função de uma série de fatores, tais como: o tempo de exposição, dose, concentração, tipo de comportamento avaliado e área do cérebro analisada.

Assim, a ausência de efeitos do estradiol sobre a liberação de NA na ABL e no hipocampo, na expressão da TH bem como sobre a expressão de PR e de ER β nos neurônios do LC nos sugere que a terapia estrogênica parece não influenciar o sistema noradrenérgico originado do LC durante a peri menopausa.

➤ SISTEMA SEROTONÉRGICO

PR e NDR: A distribuição do PR no NDR em mamíferos é bastante complexa e varia de acordo com a espécie. Em macacos, por exemplo, os receptores para

progesterona são expressos nos neurônios serotoninérgicos do NDR (Alves et al, 1997). Em porquinhos da índia, estes receptores estão situados em neurônios posicionados acima e lateralmente aos neurônios serotoninérgicos, na matéria cinzenta periaquedutal (PAG; Shlaes et al, 1999). Em ratos, são encontrados PRs em pequenos grupamentos de interneurônios excitatórios no NDR, mas não nos neurônios serotoninérgicos (Alves et al, 1998).

As ratas na periestrofa apresentaram deficiência na expressão do RNAm para o PR no NDR, e este parâmetro não foi revertido pela terapia com estradiol, ou seja, não foi observado o efeito clássico do estradiol em induzir aumento na expressão dos níveis de PR. Acreditamos que isto possivelmente é uma característica desta fase da vida reprodutiva.

Uma das hipóteses sugeridas para tentar justificar esta ausência de efeito do estradiol sobre a expressão do PR no NDR é que estes receptores podem não ser sensíveis ao estradiol. De fato, já foram identificadas duas classes distintas de PR quanto à responsividade ao estradiol (MacLucsky & McEwen, 1978) e a localização deles varia de acordo com a região do cérebro. Os chamados receptores induzíveis pelo estradiol estão presentes principalmente no hipotálamo, APO e hipófise de ratas fêmeas (MacLucsky & McEwen, 1980a). A outra classe de receptores para progesterona, insensíveis ao estradiol, são amplamente distribuídos córtex, hipocampo, amígdala, caudato-putamen e cerebelo (Kato & Grouch, 1977). Alguns estudos mostraram que os neurônios serotoninérgicos do NDR não apresentam PRs sensíveis ao estradiol (Alves et al., 1994; Furuta et al., 2010). Desta forma, o controle da expressão destes receptores no NDR poderia ocorrer devido a outros fatores que não o estradiol.

Por outro lado, estudos sugerem que a responsividade do PR ao estradiol seja dependente do ER β , que nos ratos está localizado nos neurônios serotoninérgicos do NDR, não havendo nestes neurônios colocalização do PR e ER β (Alves et al, 1998; Bethea et al, 2002). No entanto, mesmo aumentando a expressão do ER β no NDR, o estradiol não foi capaz de restaurar a expressão do PR nas ratas na periestrofa, o que parece ser uma característica desta fase da vida reprodutiva.

As outras duas hipóteses, discutidas para o LC, também poderiam ser válidas para o NDR: 1) a maior parte dos estudos é realizada em animais ovariectomizados e 2) o envelhecimento ovariano altera a resposta destes receptores ao estradiol.

Assim, nossa hipótese de que a redução nas concentrações de progesterona seria compensada pelo aumento da expressão de PR induzido pelo estradiol, tanto no NDR

como no LC não se concretizou. Por outro lado, pelo menos parte desta compensação parece ocorrer por meio do aumento da secreção da progesterona.

ER β e NDR: Assim como no LC, o ER β é expresso de forma abundante no NDR, sendo esta isoforma a predominante. Neste núcleo, 90% dos neurônios ER β positivos coexpressam TPH (Mitra et al., 2003; Nomura et al., 2005; Suzuki et al., 2013), sugerindo a existência de uma importante relação entre as ações do estradiol nestes receptores e a síntese/liberação de serotonina.

Nossos dados mostraram que em neurônios do NDR das ratas na periostropausa, tal como observado no LC, houve declínio na expressão do ER β . Em outros estudos já foi observada redução na expressão deste receptor em função da idade em várias áreas do SNC incluindo o NDR (Mehra et al., 2005; Sharma and Thakur, 2006; Yamaguchi-Shima and Yuri, 2007). Contudo, no presente trabalho tal deficiência não poder ser atribuída ao envelhecimento somático, mas sim ao envelhecimento ovariano (depleção folicular induzida pelo VCD). Portanto, assim como nos neurônios do LC, a sensibilidade dos neurônios alvo do estradiol no NDR parece estar prejudicada durante a periostropausa.

Diferente do que observamos no LC, o declínio na expressão de ER β no NDR foi restaurado pelo estradiol. Em ratas ovariectomizadas com déficit no número de células ER β positivas no NDR, o tratamento com agonista seletivo para este receptor reestabeleceu a imunoreatividade ao ER β aos níveis normais (Suzuk et al., 2013). Esta ação diferenciada do estradiol sobre a expressão do ER β no NDR e LC nos sugere que o 17 β -estradiol regula a expressão do ER β de uma maneira região-específica, de forma semelhante à que ocorre com PR.

Inúmeros estudos já estabeleceram que os efeitos antidepressivos do estradiol parecem ser mediados pela ativação do seu receptor do tipo β , especialmente pela modulação sobre o sistema serotoninérgico, seja aumentando a síntese de 5-HT no NDR (Bethea et al., 2000; Gundlah et al., 2005; Hiroi et al., 2006; Lu et al., 1999) e/ou diminuindo a degradação pela inibição da atividade da enzima monoamino-oxidase (MAO), aumentando assim a disponibilidade da 5-HT na fenda sináptica (Gundlah et al., 2005; Luine and Rhodes, 1983; Ortega-Corona et al., 1994; Osterlund, 2010; Smith et al., 2004). Tais ações, bem como o aumento nas taxas de disparo dos neurônios do NDR (Robichaud & Debonnel, 2005), parecem estar relacionadas ao aumento na expressão do ER β . Nós sugerimos, portanto, que a redução nas concentrações plasmáticas de progesterona, aliada à redução na sinalização celular do estradiol via ER β no NDR possa

contribuir para algumas alterações comportamentais e afetivas observadas na perimenopausa.

Número de neurônios serotoninérgicos do NDR: O número total de neurônios serotoninérgicos foi menor nas ratas na periestro-pausa, o que não foi revertido pela terapia estrogênica. Visto que o NDR é uma estrutura altamente complexa, composta por sub-regiões topograficamente organizadas com fisiologia e anatomia distintas (para revisão ver: Lowry et al, 2002), as regiões deste núcleo foram analisadas separadamente. Nós observamos nas ratas na periestro-pausa que, na avaliação total dos neurônios das porções rostral, média e caudal do NDR, assim como na maioria das sub-regiões (lateral, dorsal e ventral) das 3 porções acima citadas, houve redução no número de neurônios imunorreativos à TPH. É provável que esta redução esteja associada à diminuição da expressão do ER β observada nesta área como um todo, o que sugere, portanto, uma ação estimulatória do estradiol na neurogênese no NDR. Por outro lado, o efeito do estradiol sobre o número de neurônios TPH-positivos foi seletivo, limitando-se a poucas sub-regiões do NDR, como as sub-regiões ventral do NDR; rostral, lateral do NDR Médio, bem como as sub-regiões dorsal e ventral do NDR Caudal. Estudos de eletrofisiologia realizados em tecidos de animais submetidos a avaliações comportamentais forneceram bases consistentes que evidenciam a especialização funcional de subpopulações organizadas topograficamente dos neurônios serotoninérgicos (para revisão ver: Lowry, 2002). Já foi demonstrado que as diferentes sub-regiões do NDR enviam projeções para diferentes alvos no cérebro (Michelsen et al., 2007). Além disso, a análise individualizada das sub-regiões do NDR mostra que há um padrão topográfico nas respostas destes neurônios ao estradiol (Hiroi et al, 2016).

Já foi demonstrado que as asas laterais da porção média do NDR se projetam para os núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e para os núcleos talâmicos lateral e ventral posterior, sabe-se que estas regiões regulam um vasto conjunto de eventos fisiológicos (Monti, 2010). Neste contexto, não é conhecido ainda o exato papel fisiológico do aumento no número de neurônios TPH-positivos promovido pelo estradiol na sub-região lateral da porção média do NDR. Havendo, portanto, necessidade de investigação para maiores esclarecimentos. Assim, a relação entre as alterações no NDR induzidas pelo estradiol e as funções a serem controladas permanecem a ser discutidas.

É importante ressaltar que o NDR é a principal estrutura encefálica a enviar projeções serotoninérgicas para o sistema límbico (Kohler & Steinbusch, 1982), sendo hipocampo e a amígdala alvos das projeções deste núcleo.

Amígdala basolateral e central: Graeff e colaboradores (1996) postularam que, enquanto o hipocampo está mais intimamente envolvido com os comportamentos do tipo depressivos, a amígdala parece estar mais relacionada à ansiedade. A amígdala recebe projeções da sub-região dorsal da porção média do NDR (Lowry, 2002). Nesta sub-região observamos menor número de neurônios TPH-positivos nas ratas em periostropausa, o que pode estar relacionado à gênese dos comportamentos preditivos de ansiedade, relatados anteriormente por nós, neste modelo de perimenopausa (Reis et al, 2014). Além disso, a deficiência no número de neurônios serotoninérgicos no NDR pode estar relacionada ao menor conteúdo de 5-HT encontrado na amígdala destes animais. Este dado corrobora a hipótese de que o aumento dos comportamentos preditivos de ansiedade durante a periostropausa seja decorrente da redução no número de neurônios no NDR e como consequência, do conteúdo de 5-HT na amígdala.

O declínio no número de neurônios TPH-positivos no NDR, bem como do conteúdo de 5-HT na amígdala não foi revertido pela terapia estrogênica, o que sugere que o estradiol parece não exercer ação ansiolítica neste modelo animal de perimenopausa.

Os trabalhos que avaliam a ação do estradiol sobre a ansiedade apresentam resultados bastante controversos, de forma que o estradiol pode ter efeitos ansiogênicos, ansiolíticos ou mesmo não ter ação sobre a ansiedade. A predominância de uma ou outra resposta parece ser influenciada por fatores como a dose, o tempo de exposição, a via de administração, o tipo de estrogênio utilizado e o tipo de receptor ativado.

Vários trabalhos mostram o efeito ansiolítico do estradiol. Estradiol, bem como outros estrogênios que mimetizam sua ação, diminui comportamentos do tipo ansioso em ratas ovariectomizadas (De Jesús-Burgos et al, 2016; Lemini et al, 2016). Quando injetado diretamente no núcleo da Rafe, o estradiol também apresenta efeitos ansiolíticos (Andrade et al, 2005). Por outro lado, é também demonstrado que o estradiol pode provocar efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos, dependendo do receptor ativado. A ativação do ER α estaria envolvida com respostas ansiogênicas, enquanto que a ativação do ER β com respostas ansiolíticas (Borrow & Handa, 2017).

Também já foi demonstrado que o estradiol não exerce efeitos sobre a ansiedade em ratas na meia-idade, uma vez que a inibição da enzima aromatase (que converte a testosterona em estradiol) não alterou o comportamento destas no LCE (Borbélyová et al, 2017). No entanto, não foi possível determinar se esta ausência de ação do estradiol é decorrente do envelhecimento somático ou ovariano.

Neste estudo, apesar do estradiol ter reestabelecido a expressão de ER β no NDR, ele não foi efetivo em restaurar o número de neurônios serotoninérgicos da sub-região dorsal da porção média do NDR (que se projeta para a amígdala), não modificou a expressão de ER β bem como o conteúdo de 5-HT na amígdala. Portanto, podemos presumir que estradiol parece não ter exercido efeitos sobre os comportamentos de ansiedade. Em apoio a esta hipótese, estudos do nosso laboratório mostraram que, mesmo revertendo os comportamentos preditivos de depressão (Weisheimer et al, dados não publicados), o estradiol não modificou os comportamentos preditivos de ansiedade (Barros et al, dados não publicados) das ratas na periostropausa.

Hipocampo: O hipocampo recebe projeções serotoninérgicas oriundas da porção caudal do NDR (Michelsen et al., 2007b). As ratas na periostropausa apresentaram redução significativa no número de neurônios imunorreativos à enzima TPH em duas sub-regiões da porção caudal do NDR, a dorsal e a ventral, o que parece estar relacionado ao menor conteúdo de 5-HT no hipocampo destes animais. Considerando que o hipocampo esteja mais envolvido com a depressão do que com a ansiedade, podemos sugerir que esta deficiência de serotonina no hipocampo possa explicar, pelo menos em parte o comportamento depressivo exibido pelas ratas na periostropausa, observado em outros estudos do nosso laboratório (Weisheimer et al, dados não publicados).

Diferente do observado na amígdala, a terapia com estradiol foi capaz de reestabelecer tanto o número de neurônios serotoninérgicos nas duas sub-regiões do NDR, bem como o conteúdo de serotonina no hipocampo. Além disso, o estradiol reestabeleceu a expressão do ER β no NDR e induziu aumento, além dos níveis do grupo controle, da expressão de ER β no hipocampo. Desta forma, a sensibilidade ao estradiol foi intensificada tanto no NDR como no hipocampo.

Em estudos do nosso laboratório já observamos que os comportamentos do tipo depressivo exibidos no teste do nado forçado, em ratas na periostropausa induzida pelo VCD, foram prevenidos pela terapia estrogênica (Weisheimer et al, dados não publicados). Portanto, os mecanismos acima citados desencadeados pelo estradiol poderiam explicar, pelo menos em parte, seus efeitos anti-depressivos neste modelo experimental de perimenopausa.

Esta hipótese é reforçada por estudos recentes que mostram que a terapia estrogênica em ratas ovariectomizadas provoca aumento na expressão de TPH na porção caudal do NDR e redução nos comportamentos preditivos de depressão (Hiroi et al, 2016).

Por outro lado, a administração de antagonistas para receptores de estradiol no hipocampo resultou em aumento dos comportamentos preditivos de depressão em roedores, sustentando a ideia de que o hipocampo é um alvo crítico para os efeitos anti-depressivos do estradiol (para revisão, ver: Walf & Frye, 2007).

Os efeitos do estradiol sobre a neurotransmissão serotoninérgica, bem como comportamentos preditivos de depressão, parecem ser causados pela ativação do ER β , visto que este é o receptor predominante no NDR, especialmente nas porções média e caudal (Shurghue et al., 1997; Lu et al., 2001; Donner & Handa, 2009). Agonistas seletivos para ER β , mas não ER α , resultam em efeitos antidepressivos, como redução da imobilidade e aumento da natação no teste do nado forçado (Bansal and Chopra, 2015b; Bastos et al., 2015; Benmansour et al., 2016; Clark et al., 2012; Rocha et al., 2005; Walf et al., 2004). Além disso, em camundongos *knockout* para ER β expostos ao estradiol, tais efeitos antidepressivos não foram observados (Rocha et al., 2005). Assim, sugerimos que a restauração dos níveis de ER β na porção caudal do NDR pelo estradiol possa ser um dos mecanismos que contribui para a melhora dos episódios de depressão durante a perimenopausa.

Apesar de não termos observado diferenças significativa nos níveis de RNAm para ER β no hipocampo das ratas na periestro-pausa, curiosamente, a terapia com estradiol aumentou a expressão gênica deste receptor. Portanto, suspeitamos que este seja outro mecanismo pelo qual o estradiol parece melhorar as alterações psicossomáticas nas mulheres na perimenopausa normoestrogênicas.

Estudos prévios demonstraram que a terapia com estradiol aumenta a taxa de renovação de serotonina em ratas adultas (Kiss et al, 2012) e a administração local de um agonista seletivo para o receptor β , o DPN, reduz comportamentos preditivos de ansiedade e depressão em ratas ovariectomizadas (Walf and Frye, 2007). Curiosamente, os efeitos intracelulares do DPN nos neurônios hipocampais de ratos são análogos àqueles observados após tratamento com sertralina, fármaco inibidor da recaptação de 5-HT (Benmansour et al., 2016). Há evidências de que o declínio na função serotoninérgica nas mulheres está associado ao aumento na vulnerabilidade a algumas formas de transtornos afetivos e que a terapia com estradiol pode melhorar estes sintomas pelo aumento na neurotransmissão serotoninérgica (Hiroi et al., 2016). Benmansour e colaboradores (2012) demonstraram que a infusão local de DPN no hipocampo reduz o *clearance* de 5-HT, enquanto que o uso de agonista para o ER α bloqueia os efeitos inibitórios da fluvoxamina, também um inibidor da recaptação de 5-HT, sobre o *clearance* de 5-HT. Portanto, é

possível sugerir que os efeitos anti-depressivos do estradiol se deem por meio da ativação do ER β presente no NDR, aumentando a liberação de 5-HT para o hipocampo e/ou diretamente no hipocampo pela maior ativação do receptor neste núcleo.

Em geral, nossos dados podem esclarecer os possíveis mecanismos pelos quais a terapia com estradiol, mesmo em condições normoestrogênicas, tem efeitos positivos sobre mulheres sintomáticas na perimenopausa. Considerando que neste estudo foram observadas alterações sutis no sistema noradrenérgico das ratas na periestrospausa, bem como raras modificações promovidas pelo estradiol, parece que este sistema participa de maneira muito discreta dos transtornos de humor e ansiedade observados na perimenopausa. Contudo, dados não publicados deste laboratório demonstraram redução significativa no conteúdo de noradrenalina na área pré-óptica (APO) bem como na atividade neuronal de núcleos específicos da APO. Esta região é o principal centro termorregulatório no SNC (Romanovsky, 2007) e está diretamente envolvida com outro sintoma bastante comum neste período de transição: as alterações vasomotoras e ondas de calor (Deecher et al, 2008; Pestana-Oliveira, et al., dados não publicados). Worsley e colaboradores (2014), em uma revisão, apontaram uma associação positiva bidirecional entre os sintomas vasomotores e de depressão na perimenopausa, além da melhora em ambos os sintomas após a terapia com estradiol. É possível, portanto, que o sistema noradrenérgico participe de maneira indireta nos transtornos afetivos das mulheres na perimenopausa. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreensão do papel deste sistema nas desordens afetivas observadas neste período.

Diferente do sistema noradrenérgico, foram observadas profundas alterações no sistema serotoninérgico nas ratas na periestrospausa, as quais foram de forma geral, revertidas pela terapia estrogênica.

6. Conclusão

Nossos dados fornecem novos conhecimentos sobre os mecanismos pelos quais a terapia estrogênica parece exercer efeitos positivos sobre os sintomas das mulheres normoestrogênicas na perimenopausa. Mostramos que ratas na periostropausa exibem níveis plasmáticos reduzidos de progesterona, diminuição no número de neurônios serotoninérgicos e na expressão do ER β no DRN, bem como no conteúdo de serotonina na amígdala e hipocampo. Os efeitos positivos da terapia com estradiol durante a perimenopausa parecem resultar, pelo menos em parte, do aumento da biossíntese de progesterona periférica em associação com a regulação positiva de ER β no NDR e hipocampo, que parece potencializar a via serotoninérgica NDR/HPC. Portanto, o desenvolvimento de novas terapias que ativem os ER β pode ser uma alternativa para obter os efeitos positivos da ação do estradiol, eliminando os efeitos colaterais das terapias com este hormônio que normalmente resultam da ativação do ER α .

7. Referências

- ALVES SE, MCEWEN BS, HAYASHI S, KORACH KS, PFAFF DW, OGAWA S (2000) Estrogen-regulated progesterone receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER alpha) gene-disrupted mice. *J Comp Neurol* 427:185–95
- ALVES SE, WEILAND NG, HASTINGS NB, TANAPAT P, MCEWEN BS (1997). Estradiol regulation of 5HT neurons in the dorsal raphe of the rat differs from the monkey: An analysis of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Soc Neurosci*; 23: 1222
- ANDRADE TG1, NAKAMUTA JS, AVANZI V, GRAEFF FG (2005). Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT1A receptors. *Behav Brain Res.*163(1):18-25.
- ANGST J, SELLARO R, MERIKANGAS KR, ENDICOTT J (2001) The epidemiology of perimenstrual psychological symptoms. *Acta Psychiatr Scand* 104:110–6.
- ANSELMO-FRANCI JA, FRANCI CR, KRULICH L, ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM (1997). Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res. Sep 5*;767(2):289-96
- ANZALONE CR., HONG L-S; LU JKH & LAPOLT PS (2001) Influences of Age and Ovarian Follicular Reserve on Estrous Cycle Patterns, Ovulation, and Hormone Secretion in the Long-Evans Rat. *Biology of Reproduction* 64, 1056–1062.
- ASAN E (1998). The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol.*; 142():1-118
- ASCENZI P, BOCEDI A, MARINO M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.*Aug;27(4):299-402.
- AVIS NE, CRAWFORD SL, MCKINLAY SM (1997). Psychosocial, behavioral, and health factors related to menopause symptomatology. *Womens Health.* 3 103-120.
- AZCOITIA I, SIERRA A, GARCIA-SEGURA LM (1999) Localization of estrogen receptor beta-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. *Glia.*26:260–267.
- BACON JL (2017) The Menopausal Transition, *Obstet Gynecol Clin N Am* 44 285–296.
- BANGASSER DA., WIERSELIS KR., AND KHANTSIS S (2016). Sex Differences in the Locus Coeruleus-Norepinephrine System and its Regulation by Stress *Brain Res.* June 15; 1641(Pt B): 177–188
- BANSAL S, CHOPRA K (2015) Differential role of estrogen receptor modulators in depression-like behavior and memory impairment in rats with postmenopausal diabetes. *Menopause* 22:1117–1124.

BARTH C, VILLRINGER A, SACHER J (2015) Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Front Neurosci* 9:37

BASTOS CP, PEREIRA LM, FERREIRA-VIEIRA TH, DRUMOND LE, MASSENSINI AR, MORAES MFD, PEREIRA GS (2015) Object recognition memory deficit and depressive-like behavior caused by chronic ovariectomy can be transitorially recovered by the acute activation of hippocampal estrogen receptors. *Psychoneuroendocrinology* 57:14–25

BAULIEU EE, et al (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res.*; 52:1–32

BENMANSOUR S, ADENIJI OS, PRIVRATSKY AA, FRAZER A (2016) Effects of Long-Term Treatment with Estradiol and Estrogen Receptor Subtype Agonists on Serotonergic Function in Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinology* 103:269–81.

BENMANSOUR S, WEAVER RS, BARTON AK, ADENIJI OS, FRAZER A (2012) Comparison of the Effects of Estradiol and Progesterone on Serotonergic Function. *Biol Psychiatry* 71:633–641.

BETHEA CL (1994) Regulation of progestin receptors in raphe neurons of steroid-treated monkeys. *Neuroendocrinology* 60:50–61.

BETHEA CL, LU NZ, GUNDLAH C, STREICHER JM (2002). Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front Neuroendocrinol.* Jan;23(1):41-100.

BETHEA CL, MIRKES SJ, SHIVELY CA, ADAMS MR (2000) Steroid regulation of tryptophan hydroxylase protein 447 in the dorsal raphe of macaques. *Biol Psychiatry* 47:562–576.

BORBÉLYOVÁ V, DOMONKOS E, CSONGOVÁ M, KAČMÁROVÁ M, OSTATNÍKOVÁ D, CELEC P, HODOSY J (2017). The sex-dependent effects of letrozole on anxiety in middle-aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 44 Suppl 1:93-98.

BORGES GP, MICÓ JA, BERROCOSO E (2015).Corticotropin-Releasing Factor Mediates Pain-Induced Anxiety through the ERK1/2 Signaling Cascade in Locus Coeruleus Neurons. *Int J Neuropsychopharmacol.* Feb 25;18(8). pii: pyv019.

BORROW AP, HANDA RJ (2017). Estrogen receptors modulation of anxiety-like behavior. *Vitam. Horm.* 103, 27–52.

BRINTON RD, THOMPSON RF, FOY MR, BAUDRY M, WANG J, FINCH CE, MORGAN TE, PIKE CJ, MACK WJ, 449 STANCZYK FZ, NILSEN J (2008) Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29:313–339

BRINTON RD, YAO J, YIN F, MACK WJ, CADENAS E (2015) Perimenopause as a neurological transition state. *Nat Rev Endocrinol* 11:393–405.

- BROOKS HL, POLLOW DP, HOYER PB (2016). The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology* (Bethesda). Jul;31(4):250-7
- BURGER HG, DUDLEY EC, HOPPER JL, SHELLEY JM, GREEN A, SMITH A, DENNERSTEIN L, MORSE C (1995) The 454 endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3537–3545.
- BURGER HG, GROOME NP, ROBERTSON DM (1998) Both inhibin A and B respond to exogenous follicle stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*.83 4167-4169.
- BURGER HG, HALE GE, DENNERSTEIN L, ROBERTSON DM. (2008) Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. *Menopause*. Jul-Aug;15 (4 Pt 1):603-12.
- CARROLL N 2010 A review of transdermal non patch estrogen therapy for the management of menopausal symptoms. *J.Womens Health (Larchmt.)* 19 47-55.
- CHALOUHI S (2017) Menopause: A complex and controversial journey. *Post Reproductive Health*, Vol. 23(3) 128–131
- CHHIBBER A, WOODY SK, KARIM RUMI MA, SOARES MJ, ZHAO L (2017) Estrogen receptor β deficiency impairs BDNF–5-HT 2A signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression. *Psychoneuroendocrinology* 82:107–116.
- CLARK JA et al. (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* 63:1051–63.
- COMPAGNONE N. A., BULFONE A., RUBENSTEIN J. L., MELLON S. H. (1995). Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* 136, 5212–5223. [10.1210/en.136.11.5212](https://doi.org/10.1210/en.136.11.5212)
- COSTOFF A, MAHESH VB (1975) Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc*. May;23(5):193-6.
- DAHLSTRÖM A, FUXE K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 20(7):398–399.
- DALTON K (2017) Menstruation and acute psychiatric illnesses. *British medical journal*. 1959 1(5115):148–149.

DAVIS SR, LAMBRINOUDAKI I, LUMSDEN M, MISHRA G D, PAL L, REES M, SANTORO N AND SIMONCINI T (2015). Menopause. *Nature Reviews* 23 April: 15004

DE JESÚS-BURGOS MI, GONZÁLEZ-GARCÍA S, CRUZ-SANTA Y, PÉREZ-ACEVEDO NL (2016). Amygdalar activation of group I metabotropic glutamate receptors produces anti- and pro-conflict effects depending upon animal sex in a sexually dimorphic conditioned conflict-based anxiety model. *Behav Brain Res.* Apr 1;302:200-12.

DE MARZO, A.M., BECK, C.A., ONATE, S.A., AND EDWARDS, D.P (1991). Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of protein. in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 88.; 72–76

DEECHER D, ANDREE TH, SLOAN D, SCHECHTER LE (2008) From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. *Psychoneuroendocrinology* 33:3–17.

DIAZ BRINTON R (2012) Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology* 153:3571–3578.

DONNER N., HANDA R.J (2009) Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan–hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience* 163 705–718.

DUBAL DB, WISE PM (2001). *Endocrinology.*;142:43–48

EASTERBROOK CC (1900). Organo-therapeutics in mental disease. *BMJ.* 2:813–823.

EL KHOUDARY; SR SANTORO N; CHEN HY, TEPPER PG, BROOKS MM, THURSTON RC, JANSSEN I HARLOW; SD BARINAS-MITCHELL E, SELZER F, DERBY CA, JACKSON EA, MCCONNELL D, MATTHEWS KA. (2016). Trajectories of estradiol and follicle-stimulating hormone over the menopause transition and early markers of atherosclerosis after menopause. *Eur J Prev Cardiol.* May;23(7):694-703

FADDY MJ GOSDEN RG, GOUGEON A, RICHARDSON SF, NELSON JF (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 7:1342–1346.

FERNANDEZ SM, KEATING AF, CHRISTIAN PJ, SEN N, HOYING JB, BROOKS HL, et al (2008). Involvement of the KIT/KITLG signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biol Reprod.* 79:318–327

FILARDO EJ, et al (2002) Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and camp-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16(1):70–84.

- FRANCI JA, ANTUNES-RODRIGUES J (1985). Effect of locus ceruleus lesion on luteinizing hormone secretion under different experimental conditions. *Neuroendocrinology*. Jul;41(1):44-51.
- FRYE CA (2011) Progesterone reduces depressive behavior of young ovariectomized, aged progesterone receptor knockout, and aged wild type mice in the tail suspension test. *J Psychopharmacol* 25:421– 428.
- FRYE JB, LUKEFAHR AL, WRIGHT LE, MARION SL, HOYER PB, FUNK JL (2012) Modeling perimenopause in Sprague-Dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comp Med* 62:193–202.
- FRYE JB, LUKEFAHR AL, WRIGHT LE, MARION SL, HOYER PB, FUNK JL (2012). Modeling perimenopause in sprague-dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comparative Medicine*. 62(3)193-202.
- FURUTA M, FUKUSHIMA A, CHIBA S, SANO A, AKEMA T, KIMURA F, FUNABASHI T (2010) Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. *Neuroreport* 21:777–781.
- GENAZZANI AR, PETRAGLIA F, PURDY R H. (1996). *The Brain: source and target for sex steroid hormones*. London: The Parthenon Publishing Group.
- GENAZZANI AR, PLUCHINO N (2012). Brain and Steroids: a long history of love. *Arc. Of Perin Med*. 18 (3) 127-132.
- GRADY D, WENGER NK, HERRINGTON D, KHAN S, FURBERG C, HUNNINGHAKE D, VITTINGHOFF E, HULLEY S (2000) Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med*. May 2;132(9):689-96.
- GRAEFF FG, GUIMARÃES FS, DE ANDRADE TG, DEAKIN JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54:129–41.
- GUICHENEY P, LÉGER D, BARRAT J, TRÉVOUX R, DE LIGNIÈRES B, ROQUES P, GARNIER JP, BOYER P, GRENIER J, DREUX C, et al 1988 Platelet serotonin content and plasma tryptophan in peri- and postmenopausal women: variations with plasma oestrogen levels and depressive symptoms. *Eur J Clin Invest*.18(3):297-304.
- GUNDLAH C, ALVES SE, CLARK JA, PAI L-Y, SCHAEFFER JM, ROHRER SP (2005) Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biol Psychiatry* 57:938–42.
- HALBREICH U (1990) Gonadal hormones and antihormones, serotonin and mood. *psychopharmacol.bull*. 26 291-295.
- HALBREICH U, LUMLEY LA (1993). The multiple interactional biological processes that might lead to depression and gender differences in its appearance. *J Affect Disord*.; 29:159–173.

HALE GE, BURGER HG (2009). Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Feb 23(1) 7-23

HALBREICH U, LUMLEY LA (1993). The multiple interactional biological processes that might lead to depression and gender differences in its appearance. *J Affect Disord.*; 29:159–173

HALE GE, BURGER HG (2009). Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Feb 23(1) 7-23

HARLOW, S. D. et al (2012). Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop+10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *J. Clin. Endocrinol.Metabolism* 97, 1159–1168

HELENA CV, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA (2002). Luteinizing Hormone and Luteinizing Hormone-Releasing secretion is under Locus coeruleus control in female rats. *Brain Research (Netherlands).* 955 245-252

HELENA CV, DE OLIVEIRA-POLETINI M, SANVITTO GL, HAYASHI S, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA (2006). Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the Locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *J Endocrinol.* 188 (2) 155-65.

HENDERSON VW & BRINTON RD (2010) Menopause and Mitochondria: windows into estrogen effects on Alzheimer's Disease risk and therapy. *Neuroendocrinology.* 182 77-96.

HIROI, R; MCDEVITT, R.A; NEUMAIER J.F (2006) Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field, *Biol. Psychiatry* 60 288–295.

HIROI, R; WEYRICH, G; KOEBELE, SV; MENNENGA, SE. TALBOOM, JS; HEWITT; LT; LAVERY; CN; MENDOZA P; JORDAN A; BIMONTE-NELSON H A (2016) Benefits of Hormone Therapy Estrogens Depend on Estrogen Type: 17 β -Estradiol and Conjugated Equine Estrogens Have Differential Effects on Cognitive, Anxiety-Like, and Depressive-Like Behaviors and Increase Tryptophan Hydroxylase-2 mRNA Levels in Dorsal Raphe Nucleus Subregions. *Front Neurosci.* Dec 8;10:517.

HOYER PB, DEVINE PJ, HU X, THOMPSON KE & SIPES IG (2001). Ovarian toxicity of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide: A Mechanistic Model. *Toxicol.Pathol.* 29 91-99.

HU X, CHRISTIAN PJ, THOMPSON KE, SIPES IG, HOYER PB (2001) Apoptosis induced in rats by 4- vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biol Reprod* 500 65:87–93.

- HUANG HH, MEITES J (1975). Reproductive capacity of aging females rats. *Neuroendocrinology*, 17 289-295.
- IMWALLE DB, GUSTAFSSON JA, RISSMAN EF (2005) Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav.*;84(1):157-63
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Agência de notícias. 2017. Estatísticas Sociais. (<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias>)
- JENSEN, E.V., SUZUKI, T., KAWASHIMA, T., STUMPF, W.E., JUNGBLUT, P.W., DESOMBRE, E.R., (1968). A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 632-638
- JIN X, HAN CS, YU FQ, WEI P, HU ZY, LIU YX (2005). Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev.*; 70:82–90
- KAO SW, SIPES IG & HOYER PB (1999). Early effects of ovotoxicity induced by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in rats and mice. *Reprod.Toxicol.* 13 67-75.
- KAPPELER CJ, HOYER PB. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Syst Biol Reprod Med.*58(1):57-62
- KATO J, GROUCH T (1977). Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of rat. *Endocrinol.*;101:912–928
- KERR JB, MYERS M, ANDERSON RA (2013) The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction* 146: 205-15
- KERMATH BA, GORE AC (2012) Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinology* 96(1):1-12.
- KISS, A et al., (2012). 17 β -estradiol replacement in young, adult and middle aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas. *Behavioural Brain Research.* 227 100– 108
- KOEBELE SV, BIMONTE-NELSON HA (2016). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas.* May;87:5-17
- KOEBELE SV, MENNENGA SE, HIROI R, QUIHUIS AM, HEWITT LT, POISSON ML, GEORGE C, MAYER LP, DYER CA, AIKEN LS, DEMERS LM, CARSON C, BIMONTE-NELSON HA (2017) Cognitive changes across the menopause transition: A longitudinal evaluation of the impact of age and ovarian status on spatial memory. *Horm Behav.* Jan;87:96-114

- KOHLER C, CHAN-PALAY V, STEINBUSCH H (1982) The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 209:91–111
- KREGE JH, HODGIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON JA, SMITHIES O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15677–82.
- KUNIMURA Y, IWATA K, IJIMA N, KOBAYASHI M, OZAWA H (2015) Effect of sex steroid hormones on the number of serotonergic neurons in rat dorsal raphe nucleus. *Neurosci Lett* 127–132.
- KUIPER G. G., ENMARK E., PELTO-HUIKKO M., NILSSON S., GUSTAFSSON J. A (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93:5925–30
- LAFLAMME N, NAPPI RE, DROLET G, LABRIE C, RIVEST S (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of neurobiology*;36(3):357–378
- LANDGREN, BM; COLLINS, A; CSEMICZKY, G; BURGER, HG; BAKSHEEV, L; ROBERTSON DM (2004) Menopause transition: annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, vol. 89 (pg. 2763 – 2769)
- LEMINI C, GARCÍA-ALBOR E, CRUZ-LÓPEZ B, MATAMOROS-TREJO G, MARTÍNEZ-MOTA L (2016). Differential effect of the 17 β -aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 64:102-8.
- LIU W, WANG LY, XING XX, FAN GW (2015) Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure *Altern Lab Anim*. Dec;43(6):385-92
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- LOHFF JC, CHRISTIAN PJ, MARION SL, ARRANDALE A, HOYER PB (2005) Characterization of cyclicity and hormonal 518 profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. *519 Comp Med* 55:523–7.
- LOVICK TA. (2012) Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Braz J Med Biol Res*. 45 (4): 314 – 20.
- LOVICK T A., GUAPO V G., ANSELMO-FRANCI J A., LOUREIRO C M., FALEIROS MCM., DEL BEN C M. BRANDÃO M L (2017). A specific profile of luteal phase progesterone is associated with the development of premenstrual symptoms. *Psychoneuroendocrinology* 75 83–90

- LU KH, HOPPER BR, VARGO TM & YEN SSC (1979) Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biology of Reproduction* 21 193-203.
- LU JKH, ANZALONE CR, LAPOLT PS (1994) Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. *Neurobiol Aging*; 15:541–544
- LU H, OZAWA H, NISHI M, ITO T, KAWATA M (2001) Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta. *J Neuroendocrinol.* 13:839–845.
- LUINE VN, RHODES JC (1983) Gonadal hormone regulation of MAO and other enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology* 36:235–41
- LUKEFAHR AL, FRYE JB, WRIGHT LE, MARION SL, HOYER PB, FUNK JL (2012) Decreased bone mineral density in rats rendered follicle-deplete by an ovotoxic chemical correlates with changes in Follicle-Stimulating Hormone and Inhibin A. *Calcif Tissue Int.* 90(3):239-49
- LUND TD, ROVIS T, CHUNG WC, HANDA RJ (2005) Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146 797–807
- MACLUSKY NJ, MCEWEN BS (1978a) Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274:276–8.
- MACLUSKY NJ, MCEWEN BS (1980a) Progesterin receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progesterin-binding sites. *Endocrinology*.Jan;106(1):192-202.
- MALETIC V, ERAMO A, GWIN K, OFFORD S J & DUFFY R A (2017). The Role of Norepinephrine and Its α -Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. *Front Psychiatry*; 8: 42
- MANOVA K, NOCKA K, BESMER P, BACHAROVA RF (1990). Gonadal expression of Kit encoded at the W locus of the mouse. *Development.*;110:1057–1069
- MANTHEY D. & BEHL C (2006) From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138 845–850.
- MARK-KAPPELER CJ, SEN N, LUKEFAHR A, MCKEE L, SIPES IG, KONHILAS J, et al (2011). Inhibition of ovarian KIT phosphorylation by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. *Biol Reprod.* Jun 15.
- MARTINS-AFFERRI, M.P.; FERREIRA-SILVA, I.A.; FRANCI, C.R.; and ANSELMO-FRANCI, J.A. (2003). LHRH release depends on Locus Coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. *Brain Res. Bull.*, 61, 5, p. 521-527.

MAYER LP, DEVINE PJ, DYER CA & HOYER PB (2004) The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biol.Reprod.* 71 130-138.

MAYER LP, PEARSALL NA, CHRISTIAN PJ, DEVINE PJ, PAYNE CM, MCCUSKEY MK, MARION SL, SIPES IG & HOYER PB (2002) Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod.Toxicol.* 16 775-781.

MCEWEN BS (1989) Endocrine effects on the brain and their relationship to behaviour. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel GJ ed), pp893–913. New York: Raven.

MCCALL JG, AL-HASANI R, SIUDA ER, HONG DY, NORRIS AJ, FORD CP, BRUCHAS MR (2015). CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron.* Aug 5;87(3):605-20.

MCCALL JG, , BHATTI DL, LAWSON LA, MCELLIGOTT ZA, STUBER GD, BRUCHAS MR. (2017). Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife.* Jul 14;6. pii: e18247

MCEWEN BS, BIRON CA, BRUNSON KW, BULLOCH K, CHAMBERS WH, DHABHAR FS, GOLDFARB RH, KITSON RP, MILLER AH, SPENCER RL, WEISS JM (1997) The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev.* Feb;23(1-2):79-133.

MCKINLAY SM, BRAMBILLA DJ, POSNER JG (1992) The normal menopause transition. *Am J Hum Biol* 4 37.

MEHRA RD, SHARMA K, NYAKAS C, VIJ U (2005) Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res* 1056:22–35.

MERCHENTHALER I, LANE MV; ZHAN M AND HOYER PB. (2014) The 4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD)-Treated rat provides a unique preclinical model to study perimenopausal Hot Flashes. *Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity*

MICEVYCH P, SOMA KK, SINCHAK K (2008) Neuroprogesterone: Key to estrogen positive feedback? *Brain Res Rev* 57:470–480.

MICHAEL J. WEISER, CHAD D. FORADORI, AND ROBERT J. HANDA (2008) Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev* 57(2): 309–320.

MICHELSSEN KA, SCHMITZ C, STEINBUSCH HWM (2007) The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev* 55:329–342.

MITCHELL ES, WOODS NF (1996) Symptom experiences of midlife women: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Maturitas* 25:1–10.

- MITRA SW et al., (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144 2055-2067.
- MONTI JM (2010). The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev.* Oct;14(5):307-17
- MORA S, DUSSAUBAT N, DÍAZ-VÉLIZ G (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:609–620.
- MORET C & BRILEY M (2011).The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2011; 7(Suppl 1): 9–13.
- MORGAN ML, et al 2007. Neurophysiologic changes during estrogen augmentation in perimenopausal depression. *Maturitas.* 56 (1), 54–60
- MULHALL, S; ANDELA R; ANSTEYA K J. (2018). Variation in symptoms of depression and anxiety in midlife women by menopausal status. *Maturitas* 108: 7-12
- MUNABI AK, CASSORLA FG, PFEIFFER DG, ALBERTSON BD, LORIAUX DL (1983) The effects of estradiol and progesterone on rat ovarian 17-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Steroids* 41:95–8
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Vinylcyclohexene (CAS No. 100-40-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1986. Aug; 303:1-190
- NILSEN J, BRINTON RD (2002) Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology.*143 205–212.
- NOMURA M, AKAMA KT, ALVES SE, KORACH KS, GUSTAFSSON J-A, PFAFF DW, OGAWA S (2005) Differential distribution of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in the midbrain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: Predominant role of ER-beta in midbrain serotonergic systems. *Neuroscience* 130:445–56.
- ORTEGA-CORONA BG, VALENCIA-SÁNCHEZ A, KUBLI-GARFIAS C, ANTON-TAY F, SALAZAR LA, VILLARREAL JE, PONCE574 MONTER H (1994) Hypothalamic monoamine oxidase activity in ovariectomized rats after sexual behavior restoration. *Arch Med Res* 25:337–40
- OSTLUND H, KELLER E, HURD YL. (2003) Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1007 54-63.
- OUDSHOORN N (1994) *Beyond the Natural Body: an archeology of sex hormones.* New York: Routledge, 195 p.

- PACKER A, HSU Y, BESMER P, BACHVAROVA R (1994). The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol.*; 161:194–205.
- PAECH K, et al. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277(5331):1508–10.
- PALKOVITS M (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59:449–50
- PANDARANANDAKA, J; POONYACHOT, S; KALANDAKANOND-THONGSONG, S (2006). Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiology & Behavior* 87: 828–835
- PARROTT JA, SKINNER MK (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinol.*;140:4262–4271.
- PARRY BL. (2010) Optimal management of perimenopausal depression. *Int J Womens Health.* 9(2) 143-51.
- PAU KY, HESS DL, KOHAMA S, BAO J, PAU CY, SPIES HG (2000) Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. *J Neuroendocrinol* 12:899–909
- PAXINOS G & WATSON C (1996) *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*.
- PENDERGAST JS, TUESTA LM, BETHEA JR. (2008) Oestrogen receptor beta contributes to the transient sex difference in tyrosine hydroxylase expression in the mouse locus coeruleus. *J.Neuroendocrinol.*; 20 (10) 1155-64
- PENG MT, HUANG HH 1972. Age of hypothalamic-pituitary-ovarian function in the rat. *Fertil Steril.* 23 535-542.
- PENNING TM, SHARP RB, KRIEGER NR (1985). Purification and properties of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem.*; 260:15266–15272
- PONZIO F, CALDERINI G, LOMUSCIO G, VANTINI G, TOFFANO G, ALGERI S. (1982). Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. *Neurobiol Aging.* 3(1) 23-9.
- PRIOR JC & HITCHCOCK CL. (2011). The endocrinology of perimenopause: need for a paradigm shift. *Frontiers in Bioscience* S3, 474-486.
- PRIOR JC (1998) Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocr Rev.*; 19(4):397-428. PRIOR JC. (2005). Ovarian aging and the perimenopausal transition: the paradox of endogenous ovarian hyperstimulation. *Endocrine* 26(3), 297-300.

- QUADROS, PS & WAGNER CK (2008) Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain *Endocrinology* 149(6): 3054–3061
- REAM NK (1999). Neuroendocrine Regulation of the Perimenopause Transition. In: *Treatment of the Postmenopausal Woman. Basic and Clinical Aspects.* 149(6): 3054–3061.
- REHMAN HU & MASSON EA (2005). Neuroendocrinology of female aging. *Gend Med.* 2(1) 41-56.
- REIS FCMV, PESTANA-OLIVEIRA N, et al (2014) Perimenopause induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) is accompanied by specific hormonal changes in increased anxiety in female rats.
- RISSMAN EF, HECK AL, LEONARD JE, SHUPNIK MA, GUSTAFSSON JA (2002). Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3996–4001
- ROBICHAUD M, DEBONNEL G (2005) Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J Neuroendocrinol* 17:179–85
- ROCHA, B.A., FLEISCHER, R., SCHAEFFER, J.M., ROHRER, S.P., HICKEY, G.J., 2005. 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 179, 637–43.
- ROMANOVSKY A.A (2007b). Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol* 292, R37–R46
- RUBIN BS (2000) Hypothalamic Alterations and Reproductive Aging in Female Rats: Evidence of Altered Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neuronal Function. *Biology of Reproduction.* 63 968-976.
- RUSSELL DW, WILSON JD (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem.*;63:25-61.
- SÁ SI, FONSECA BM (2017) Dynamics of progesterone and estrogen receptor alpha in the ventromedial hypothalamus. *J Endocrinol.* May;233(2):197-207.
- SANTORO N, BROWN JR, ADEL T et al (1996) Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metabol.* 81 1495.
- SANTORO N, LASLEY B, MCCONNELL D et al (2004) Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89 2622-2631.

- SANTORO N, BROWN JR, ADEL T et al (1996) Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metabol.* 81 1495.
- SANTORO N, LASLEY B, MCCONNELL D et al (2004) Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J.*
- SAUER MV, VARDHANA P (1999). Reproductive Options for Perimenopausal and Menopausal Women. In: *Treatment of the Postmenopausal Woman. Basic and Clinical Aspects.*
- SAUER MV, VARDHANA P (1999). Reproductive Options for Perimenopausal and Menopausal Women. In: *Treatment of the Postmenopausal Woman. Basic and Clinical Aspects.*
- SAVOURET JF, MUCHARDT C, QUESNE M, MANTEL A, DE THE H, MILGROM E (1998). Regulation of the progesterone receptor functions. *Ann N Y Acad Sci.* 15;839:138-42. Review. No abstract available
Clin.Endocrinol.Metab 89 2622-2631
- SAVOURET JF, MUCHARDT C, QUESNE M, MANTEL A, DE THE H, MILGROM E (1998). Regulation of the progesterone receptor functions. *Ann N Y Acad Sci.* 15;839:138-42. Review. No abstract available
- SCHMIDT PJ, HAQ N, RUBINOW DR. (2004) A longitudinal evaluation of the relationship between reproductive status and mood in perimenopausal women. *Am. J. Psychiatry.* 161 2238-2244
- SELTZER VL, BENJAMIN F, & DEUTSCH S (1990). Perimenopausal bleeding patterns and pathologic findings. *J Am Med Womens Assoc.*45(4) 132-4.
- SEROVA L., RIVKINA M; NAKASHIMA A.; SABBANA EL (2002) Estradiol Stimulates Gene Expression of Norepinephrine Biosynthetic Enzymes in Rat Locus coeruleus *Neuroendocrinology*;75:193–200
- SHARMA PK, THAKUR MK (2006) Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids. *Neurobiol Aging* 27:880–7
- SHENG Z et al (2004). Expression of estrogen receptors (alpha, beta) and androgen receptor in serotonin neurons of the rat and mouse dorsal raphe nuclei; sex and species differences. *Neurosci.Res.*; 49 185-196.
- SHIDELER SE, DEVANE GW, KALRA PS, BENIRSCHKE K, LASLEY BL (1989) Ovarian-pituitary hormone interactions during the perimenopause. *Maturitas* 11:331–9.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J.Comp Neurol.* 388, 507-525.

SHULTS CL., DINGWALL CB., KIM CK., PINCETI E, RAO Y S., PAK TR (2018) 17b-estradiol regulates the RNA-binding protein Nova1, which then regulates the alternative splicing of estrogen receptor b in the aging female rat brain *Neurobiology of Aging* 61 13-22.

SIUDA ER, AL-HASANI R, MCCALL JG, BHATTI DL, BRUCHAS MR (2016). Chemogenetic and Optogenetic Activation of Gαs Signaling in the Basolateral Amygdala Induces Acute and Social Anxiety-Like States. *Neuropsychopharmacology.* Jul; 41(8):2011-23.

SLOPIEN R, PLUCHINO N, WARENIK-SZYMANKIEWICZ A, SAJDAK S, LUISI M, DRAKOPOULOS P, GENAZZANI AR (2017) Correlation between allopregnanolone levels and depressive symptoms during late menopausal transition and early postmenopause. *Gynecol Endocrinol.* Aug 31:1-4.

SMITH LJ, HENDERSON JA, ABELL CW, BETHEA CL (2004) Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. *Neuropsychopharmacology* 29:2035–45.

SOARES CN, ALMEIDA OP, JOFFE H, COHEN LS (2001) Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 58:529–34

SOLOMON MB & HERMAN JP (2009) Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. *Physiol Behav.* 97 250-258.
SOULES MR, SHERMAN S, PARROTT E et al (2001). Executive summary: stages of reproductive aging workshop (STRAW). *Fertility and Sterility.* 76 874-878.

SOWERS MF, ZHENG H, MCCONNELL D, NAN B, KARVONEN-GUTIERREZ CA, RANDOLPH JF JR. 2009 Testosterone, sex hormone-binding globulin and free androgen index among adult women: chronological and ovarian aging. *Hum Reprod.*24(9):2276-85

SPRINGER LN, FLAWS JA, SIPES IG, HOYER PB (1996) Follicular mechanisms associated with 4- vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reprod Toxicol* 10:137–143

STAHL SM (2001) Effects of estrogen on the central nervous system. *J Clin Psychiatry* 62:317–8

SUGIYAMA N., BARROS R. P., WARNER M. & GUSTAFSSON J. A (2010). ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab* 21, 545–552.

SUZUKI H, BARROS RPA, SUGIYAMA N, KRISHNAN V, YADEN BC, KIM H-J, WARNER M, GUSTAFSSON J-Å (2013) 628 Involvement of estrogen receptor β in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe. *Mol Psychiatry* 18:674–80

SZAWKA RE, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JÁ (2007). Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol.* May;19(5):374-82.

SZAWKA RE, POLETINI MO, LEITE CM, BERNUCI MP, KALIL B, MENDONÇA LBD, CAROLINO ROG, HELENA CVV, BERTRAM. R, FRANCI CR, FREEMAN ME, ANSELMO-FRANCI JA (2013). Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. *Endocrinology* 4 (1) 363-74.

SZAWKA RE, RODOVALHO GV; MONTEIRO P, CARRER HF, ANSELMO-FRANCI JA (2009). Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J of Neuroendocrinology*.21(7)629-39.

TAO R, FRAY A, ASPLEY S, BRAMMER R, HEAL D & AUERBACH S (2002) Effects on serotonin in rat hypothalamus of D-fenfluramine, aminorex, phentermine and fluoxetine. *Eur.J.Pharmacol.* 445 69-81

TRELOAR AE, et al (1967) Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Intern. J. Fertil.* 12 77-126.

TSENG JY, KILB PE, RASKIN MA, MILLER MA (1997) Estrogen regulates galanin but not tyrosine hydroxylase gene expression in the rat locus ceruleus. *Mol Brain Res* 50:100–106.

VAN KEMPEN TA, MILNER TA, WATERS EM (2011) Accelerated Ovarian Failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Res* 1379:176–187.

VEGA-RIVERA, NM; LÓPEZ-RUBALCAVA, C; PAEZ-MARTÍNEZ, N; CASTRO, M; ESTRADA-CAMARENA, EM (2013). The interaction of estrogens and noradrenaline in depression. *Salud Mental*; 36:331-336

VOM SAAL FS, FINCH CE, NELSON JN 1994. Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. 1994. In: Knobil E, Neill JD. (Ed.). *The physiology of reproduction*.2. ed. New York: Raven Press, v.2, p.1213-1314.

WALF AA (2010) Oestrogen receptor beta is involved in the actions of oestrogens in the brain for affective behaviour, but not trophic effects in peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 22:141–51

- WALF AA, FRYE CA (2007) Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:407–14.
- WALF AA, RHODES ME, FRYE CA (2004) Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 78:523–9.
- WEISER MJ, FORADORI CD, HANDA RJ (2008) Estrogen receptor beta in the brain: From form to function. *Brain Res Rev* 57:309–320
- WEISSMAN MM, BLAND RC, CANINO GJ, FARAVELLI C, GREENWALD S, HWU HG, JOYCE PR, KARAM EG, LEE CK, LELLOUCH J, LÉPINE JP, NEWMAN SC, RUBIO-STIPEC M, WELLS JE, WICKRAMARATNE PJ, WITTCHEN H, YEH EK (1996) Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA* Jul 24-31;276(4):293-9.
- WEND K , WEND P , AND KRUM SA. (2012) Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 3: 19
- WIKLUND I, KARLBERG J, MATTSSON LA (1993) Quality of life of postmenopausal women on a regimen of transdermal estradiol therapy: a double-blind placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol*
- WISE PM (1993) Neuroendocrine ageing: its impact on the reproductive system of the female rat. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 46 35-46.
- WISE PM, KRAJNAK KM, KASHON ML (1996) Menopause: the aging of multiple pacemakers. *Science* 273:67–70.
- WISE PM, SMITH MJ, DUBAL DB, WILSON ME, KRAJNAK KM, ROSEWELL, KL (1999). Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. *Endocr. Rev.* 20 (3) 243-248.
- WISE PM, SMITH MJ, DUBAL DB, WILSON ME, RAU SW, CASHION AB, BOTTNER M & ROSEWELL KL (2002) Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. *Recent Prog.Horm.Res.* 57 235-256.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996) Research on the menopause in the 1990s. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WORSLEY R, BELL R , KULKARNI J ,DAVIS S R. (2014).The association between vasomotor symptoms and depression during perimenopause: a systematic review. *Maturitas*. Vol 77, Issue 2: 111-117
- WU JM, ZELINSKI MB, INGRAM DK & OTTINGER MA (2005) Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 230 818-828.

Y.Z. JIN, G.H. ZHANG, H.S. GUO, Z.Y. JIN, X.J. JIN (2000) Locus ceruleus participates in PVN regulation of cardiovascular activity in anesthetized rats, *Chin. J. Neurosci.* 16 219–223

YAMAGUCHI-SHIMA N, YURI K (2007) Age-related changes in the expression of ER- β mRNA in the female rat brain. *Brain Res* 1155:34–41

YEN JY, YANG MS, WANG MH, LAI CY, FANG MS (2009) The associations between menopausal syndrome and depression during pre-, peri-, and postmenopausal period among Taiwanese female aborigines. *Psychiatry Clin Neurosci.*; 63(5) 678-84.

YOSHIDA H, TAKAKURA N, KATAOKA H, KUNISADA T, OKAMURA H, NISHIKAWA SI (1997) Stepwise requirement of Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol.*; 184:122–137

ZARDETTO-SMITH A.M, GRAY T.S (1990). Organization of peptidergic and catecholaminergic efferents from the nucleus of the solitary tract to the rat amygdala. *Brain Res. Bull.*, 25 pp. 875-887

ZHANG J, MULLER JF, MCDONALD AJ (2013). Noradrenergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala..*Neuroscience*. Jan 3; 228():395-408.

ANEXO