

PADRONIZAÇÃO DO TESTE HOLEBOARD PARA AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS

Giovanna Fecher Matarazzo

Miriam Oliveira Ribeiro

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

A menopausa, definida como o momento da última menstruação, é um processo natural que ocorre em torno da quinta década de vida das mulheres. As alterações nos níveis dos hormônios esteroides sexuais decorrentes desse processo estão associados à vulnerabilidade a doenças relacionadas aos ossos, ao Sistema Cardiovascular e ao Sistema Nervoso Central. De fato, dentre os efeitos decorrentes da menopausa estão os prejuízos significativos da cognição e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A performance das mulheres em tarefas de memória parece flutuar com os níveis de concentração do hormônio estrógeno circulante ao longo do ciclo menstrual, sendo relatados lapsos de memória por mais de 50% das mulheres nesse período. Para avaliar os efeitos comportamentais diante de hormônios ovarianos, o modelo animal de roedor ovariectomizado é o mais utilizado. Diversos testes comportamentais foram desenvolvidos a fim de avaliar o desempenho da memória em roedores. Ainda que usadas com menos frequência do que outras variantes de teste, as tarefas do tipo Holeboard têm se mostrado adequadas para analisar os efeitos comportamentais como aprendizado e memória. No entanto, mesmo estudos relatando que essa tarefa de aprendizagem é adequada para caracterizar a memória viso espacial e de trabalho em roedores, não há estudos suficientes que utilizem essa ferramenta em modelos animais ovariectomizados para avaliar o papel do estrógeno no comportamento cognitivo no período da menopausa. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma padronização de teste comportamental Holeboard, para avaliar a memória viso espacial e de trabalho em camundongos fêmeas ovariectomizadas. Através dessa padronização do teste Holeboard, observou-se prejuízo na memória viso espacial em fêmeas ovariectomizadas, entretanto não na memória de trabalho.

Palavras-chave: Estrógeno; Holeboard; Memória.

ABSTRACT

Menopause, defined as the time of the last menstruation, is a natural process that occurs around the fifth decade of a woman's life. The changes in sex steroid hormone levels resulting from this process are associated with vulnerability to diseases related to bones, the Cardiovascular System and the Central Nervous System (CNS). In fact, among the effects resulting from menopause are significant impairment of cognition and an increased risk of developing neurodegenerative diseases. The performance of women in memory tasks seems to fluctuate with the levels of circulating estrogen hormone concentration throughout the menstrual cycle, with memory lapses being reported by more than 50% of women in this period. To assess the behavioral effects on ovarian hormones, the ovariectomized rodent animal model is the most used. Several behavioral tests have been developed in order to assess memory performance in rodents. Although less frequently used than other test variants, Holeboard-type tasks have been shown to be adequate for analyzing behavioral effects such as learning and memory. However, even studies reporting that this learning task is adequate to characterize visual spatial and working memory in rodents, there are not enough studies using this tool in ovariectomized animal models to assess the role of estrogen in cognitive behavior in the menopause period. Thus, the present work aimed to develop a Holeboard behavioral test standardization to assess visual spatial and working memory in ovariectomized female mice. Through this standardization of the Holeboard test, impairment in visual spatial memory was observed in ovariectomized females, however not in working memory.

Keywords: Estrogen; Holeboard; Memory.

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida das mulheres aumentou para cerca de 80 anos ou mais nos últimos cem anos, entretanto o início da menopausa se mantém entre os 40 e 50 anos de idade. Dessa forma, as mulheres vivem cerca de um terço ou mais de suas vidas em um estado pós-menstrual, período suscetível para o aumento de risco de inúmeras doenças neurodegenerativas (LOBO et al, 2014).

Durante o período da menopausa, ocorre uma redução da produção de hormônios, em específico o estrógeno, nas mulheres. Esse hormônio parece exercer um papel protetor importante no Sistema Nervoso Central (SNC), a qual ele tem sido associado com estímulo da plasticidade sináptica, indução da sobrevivência neuronal e modulação de marcadores sinápticos relacionados à cognição (MCEWEN, 2002).

As flutuações hormonais durante o ciclo reprodutivo afetam áreas do cérebro que estão intimamente relacionadas ao aprendizado e à memória (MONTEIRO, 2007). O hipocampo é uma estrutura cerebral importante envolvida nos processos de aprendizado e memória, e apresenta diversos receptores de estrogênio (ERs), sendo altamente sensível aos efeitos da menopausa (AHMED et al., 2014).

Para avaliar os efeitos comportamentais em relação a hormônios ovarianos, o modelo animal de roedor ovariectomizado é o mais utilizado. Os testes para avaliação comportamental, em específico de aprendizagem e memória, conquistaram uma posição essencial para a pesquisa em neurociência. Esses testes fornecem muitas informações sobre os mecanismos biológicos relacionados com a aprendizagem e memória em roedores (GLICKMAN e SROGES, 1966). Embora não seja tão amplamente usado como as variantes das tarefas em labirintos, como o aquático de Morris ou o braço radial, os testes comportamentais do tipo Holeboard vem sendo utilizados para estudar e avaliar os efeitos em manipulações experimentais relacionadas com a aprendizagem e memória espacial e de trabalho. Além disso, as tarefas do tipo Holeboard podem ser adequadas para avaliar múltiplos comportamentos e características dos roedores. (VAN DER STAAY et al., 2012).

Sendo assim, os objetivos desse presente trabalho foram:

1. Avaliar se há diferenças entre o grupo controle intacto e o grupo SHAM em memória viso espacial e memória de trabalho avaliadas pela padronização do teste comportamental Holeboard.

2. Avaliar a memória de trabalho e a memória viso espacial de camundongos fêmeas do grupo OVX.

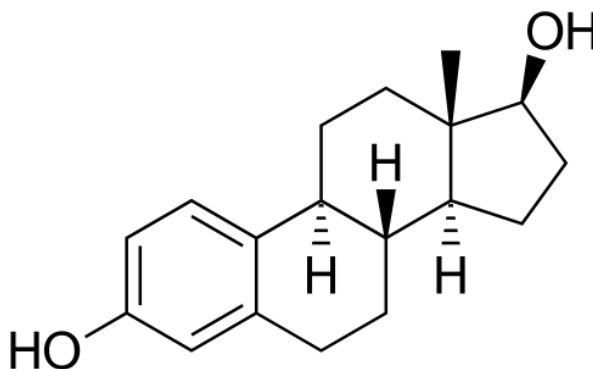
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Menopausa e Estrógeno

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o climatério é definido como o período de transição entre o período reprodutivo e não reprodutivo da vida da mulher, caracterizado pela redução na produção de hormônios esteroides ovarianos, principalmente estrogênio e progesterona. Durante essa transição ocorre a menopausa, clinicamente identificada pelo término da capacidade reprodutiva da mulher, que é a ocorrência do último fluxo sanguíneo menstrual pós-ovulatório devido à flutuação significativa na produção dos hormônios sexuais e pela redução gradual no número de folículos ovarianos em mulheres na faixa de 45 a 55 anos de idade (BARRET et al., 2010; ROCCA et al., 2012).

Os estrógenos ou estrogênios são caracterizados por um grupo de hormônios esteroides que desempenham papéis importantes em todo o organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Nesse grupo encontramos três diferentes hormônios, denominados 17β -estradiol, estrona e estriol, sendo o mais abundante deles o 17β -estradiol (Figura 1), hormônio sintetizado nas gônadas por meio da regulação feita pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, sendo tradicionalmente associado com a reprodução feminina (MEDEIROS, 2019). O estriol e a estrona são encontrados em baixos níveis e possuem uma menor atividade sobre os receptores de estrogênio (ER) (GRUBER et al., 2002).

Figura 1. Estrutura molecular do estradiol, hormônio principal dos estrogênios, mostrando o anel fenólico e a posição 17 contendo uma hidroxila (OH).

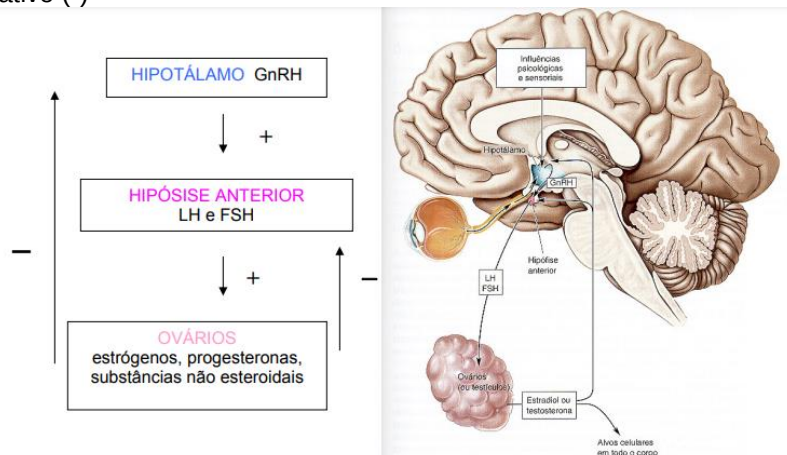


Fonte: Staboli (2011)

Como mostra a Figura 2, a liberação do 17β -estradiol é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, por meio da secreção das gonadotrofinas hipofisárias:

o hormônio folículoestimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), controlados pela secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual é secretado e liberado pelo hipotálamo. A secreção do GnRH é modulada positiva e negativamente através de diversos fatores, como os mecanismos de feedback positivo e negativo exercidos pelos compostos ovarianos e gonadotrofinas circulantes conforme o ciclo menstrual da mulher. Durante o período da transição para a menopausa, ocorrem alterações como a elevação do FSH e esgotamento dos folículos ovarianos nos ovários, portanto os níveis de estrógenos e progesterona na circulação caem e consequentemente, os mecanismos de feedback também sofrem alterações (MESSINIS, 2006).

Figura 2. Eixo Hipotálamo-Hipofisário-Ovariano e seus mecanismos de feedback positivo (+) e negativo (-)



Fonte: Monteiro (2007)

O declínio da produção do estrógeno decorrente da falência ovariana resulta em diversas alterações fisiológicas, principalmente no sistema nervoso central (FERREIRA; SILVA; ALMEIDA, 2015), sistema cardiovascular, ossos e músculos (YANES e RECKELHOFF, 2011).

Dentre os efeitos decorrentes da menopausa, são descritos prejuízos significativos da cognição e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Mais de 50% das mulheres relatam o comprometimento das funções cognitivas, como aprendizagem e memória. Com o declínio dos níveis dos hormônios esteroides, principalmente o estradiol, estudos relatam que o desempenho das mulheres em tarefas de memória tende a piorar (CAO et. al., 2013).

Diversos estudos mostram que o estrogênio tem uma grande influência nas propriedades eletrofisiológicas do hipocampo, região do cérebro que desempenha um papel importante nos processos de memória e aprendizado (BIRD e BUGGESS,

2008). Estudos de Behl (2002), mostram que inúmeros receptores de estrogênio (ERs) são encontrados no hipocampo e córtex pré-frontal, regiões que servem à memória, indicando o papel protetor desse hormônio contra a deterioração dessas funções cognitivas que são acentuadas com o envelhecimento natural.

Os estrógenos são capazes de controlar e modificar a transcrição de genes por meio de seus receptores. Dentre os genes regulados pela atividade do estrógeno, temos os que codificam proteínas responsáveis pela modulação da sobrevivência neuronal (CIMAROSTI, 2005). Os mecanismos de ação envolvidos na regulação de transcrição gênica pelo estrógeno dependem da ativação de dois tipos de receptores: ER- α (receptor de estrogênio α) e o ER- β (receptor de estrogênio β), que são encontrados no citoplasma e no núcleo da célula. Eles funcionam como fatores de transcrição nuclear, a qual possuem acesso direto ao DNA celular, inclusive nos neurônios. A partir da ligação entre estrógeno e receptor, ocorre uma sequência de eventos como alterações na molécula do receptor que regulam a taxa da transcrição gênica, inibindo ou ativando a transcrição de genes específicos (LUINE, 2014)

A regulação da transcrição gênica a partir do estrógeno resulta no estímulo ou inibição da síntese de certas proteínas, levando alterações ao estado funcional da célula e aumentando a expressão de moléculas que podem atuar na regeneração neuronal (BEAR, M.F. et al., 2002). Além disso, a ativação dos receptores estrogênicos pode estimular a neurogênese no hipocampo e influenciar certas características estruturais das células nervosas, promovendo melhora da plasticidade celular, regeneração dos axônios e manutenção do citoesqueleto celular, acarretando na recuperação das conexões sinápticas e fortalecimento das células nervosas (BEHL, 2002).

2.2 Modelo Animal

Com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais relacionados aos hormônios ovarianos, certos modelos animais são utilizados em pesquisas. A ausência de estrógeno pode ser avaliada por meio de um modelo de castração, em que os animais passam pela cirurgia de ovariectomia (OVX). Nesse procedimento, ocorre a remoção bilateral dos ovários. A cirurgia de ovariectomia é amplamente utilizada em roedores para estudos que pretendem avaliar a ausência do estrógeno e, portanto, simular o estado semelhante a menopausa (DIAZ BRINTON, 2012).

Os dados obtidos a partir de testes realizados com fêmeas ovariectomizadas permitem um melhor entendimento dos mecanismos de ações dos hormônios

ovarianos. Estudos de Wallace e colaboradores (2006) relataram que a ausência do estrógeno pode estar relacionada com um declínio na performance de roedores em tarefas comportamentais que avaliam memória, como o reconhecimento de objetos. Entretanto, alguns estudos sugerem que esses prejuízos podem ser corrigidos com a reposição de estrogênio em animais ovariectomizados, que passam a ter melhor desempenho em atividades relacionadas com a memória e aprendizado (VEDDER et al., 2013).

2.3 Memória e Testes Comportamentais

A memória pode ser caracterizada por um processo cognitivo que envolve a capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações obtidas através dos sentidos, que posteriormente possam ser utilizadas. Esses processos construtivos permitem a melhor adaptação dos organismos ao meio em que vivem (SILVA, 2018).

Denomina-se memória viso espacial a capacidade dos animais de armazenar manter e recuperar informações em relação ao ambiente, como por exemplo a localização de objetos, pontos de referências e rotas específicas (PAUL et al., 2009). Por meio dela, o animal é capaz de se orientar no seu habitat. Já a memória de trabalho é um componente da função executiva, definida pela capacidade do indivíduo de processamento de informações, raciocínio e solução de problemas. O suporte da memória de trabalho às atividades cognitivas possibilita ao indivíduo direcionar comportamentos a objetivos, realizando ações voluntárias. Portanto, os animais devem lidar com o contexto temporal associado a um evento - "o que aconteceu e quando" - e lembrar quais lugares foram visitados a fim de processar efetivamente o componente de memória operacional espacial da tarefa (NIEWOEHNER et al., 2007).

A sobrevivência de inúmeras espécies de animais depende da aprendizagem e memória espacial e de trabalho, já que ambas proporcionam respostas às ameaças e oportunidades fornecidas pelo ambiente em que vivem (BRANDNER, 2009).

Nas últimas décadas, diversos testes comportamentais foram desenvolvidos para avaliar o desempenho da memória espacial e de trabalho em roedores. Labirintos frequentemente usados com esse propósito incluem o labirinto em cruz, labirinto de braço radial, labirinto em Y e o labirinto aquático (KUC et al., 2006). Um exemplo é a tarefa do labirinto aquático de Morris (1981), que é adequada para avaliar a memória viso espacial em roedores, visto que eles precisam encontrar uma plataforma submersa em um compartimento circular com água. Nessa tarefa, a

plataforma submersa permanece no mesmo local do compartimento ao longo dos dias de testes, e os roedores aprendem as relações espaciais com o uso da memória viso espacial, a fim de lembrar a localização da plataforma e realizar sua fuga (SUTHERLAND, 1984).

O labirinto de braço radial é uma tarefa para avaliar a memória viso espacial e memória de trabalho em roedores, desenvolvido por Olton e Samuelson (1976). O aparato consiste em 8 braços que irradiam de uma pequena plataforma central circular, onde são colocados os animais e no final de cada braço são colocadas recompensas alimentares. Nessa tarefa, a memória viso espacial é avaliada através da quantidade de vezes que os roedores visitam os braços do labirinto iscados com a recompensa e, a memória de trabalho é avaliada através da quantidade de acertos em que os roedores adquirem ao visitar o braço iscado uma única vez (DUDCHENKO, 2004).

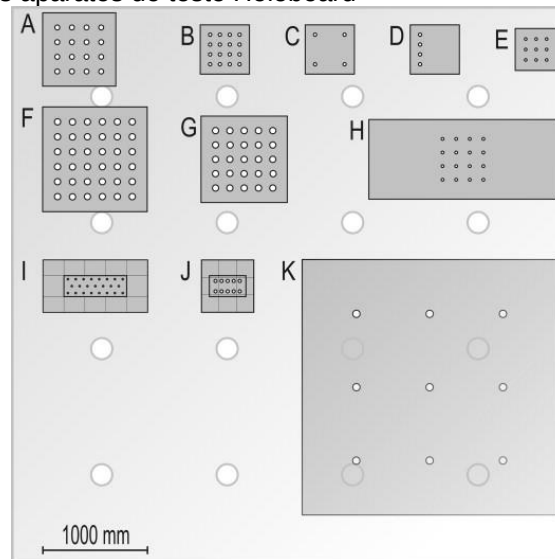
2.4 Teste Holeboard

A tarefa Holeboard começou a ser utilizada por pesquisadores na década de 1970. O aparato consiste em uma arena fechada e uma placa com uma quantidade determinada de buracos em que são colocados alimento em apenas alguns deles (Figura 3). Isso permite avaliar parâmetros de exploração e memória do roedor quando ele visita os buracos, mergulhando sua cabeça. Essa tarefa se tornou uma alternativa viável para realizar testes para avaliação comportamental, visto que é possível avaliar diversos parâmetros comportamentais em um único teste (FILE e WARDILL, 1975).

O teste Holeboard permite a avaliação de comportamentos exploratórios em roedores, assim como avaliação da memória espacial e memória de trabalho com alta reprodutibilidade. A capacidade cognitiva dos animais pode ser avaliada a partir da análise de alguns parâmetros como o número de acertos dos animais, ao visitarem o buraco com a recompensa alimentar, o número de erros que os animais cometem ao visitarem buracos sem a recompensa alimentar e números de vezes em que o animal visita o buraco iscado que ele já havia ido. Esses parâmetros são utilizados para medir a memória de trabalho e memória viso espacial dos roedores. Outros comportamentos que podem ser observados e avaliados usando esse paradigma são a locomoção e ansiedade, através de parâmetros de velocidade e tempo de permanência em regiões centrais e periféricas (DODART et al., 2002; VAN DER STAAY, 1998; ZANG et al., 2017).

Como mencionado, o aparato do Holeboard contém buracos que são colocadas as recompensas alimentares; entretanto, não há uma padronização da quantidade de buracos que devem ter. Alguns estudos mostraram que roedores conseguiram aprender a recuperar um pedaço de alimento localizado em um buraco de quatro do aparato (BROSNAN-WATTERS et al., 1996). No entanto, a simplicidade da tarefa usada nesses estudos com camundongos impediu uma avaliação direta dos desempenhos da memória viso espacial e de trabalho.

Figura 3. Diferentes aparatos do teste Holeboard



Fonte: Van der Staay e colaboradores (2012)

Estudos de Oades (1982) e Kuc e colaboradores (2005) mostram a utilização de 16 buracos no aparato para avaliar o comportamento de ratos e camundongos. No entanto, alguns estudos com ratos usaram versões com menos de 16 buracos, como por exemplo o holeboard de 4 cantos e o holeboard de linha (BROSNAN-WATTERS et al., 1996; WOZNIAK, et al, 1996). O protocolo do teste Holeboard descrito por Dodart e colaboradores (2002) consiste em um aparato com 16 buracos equidistantes, onde 4 foram iscados com comida, afim de medir a capacidade de memória de um rato ao lembrar quais foram os buracos iscados.

3. METODOLOGIA

Animais: O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM) (CEUA/UPM Nº 180-10-2019). Os camundongos utilizados no presente estudo foram reproduzidos no Biotério Central da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Foram utilizadas fêmeas C57 de quatro meses de idade, pesando entre 25 e 30 g, mantidas em ciclo de 12 horas de claro e escuro, a 25°C e em gaiolas coletivas com não mais que 5 animais por gaiola, tendo comida e água *ad libitum*. Foram divididas nos seguintes grupos:

- **Fêmeas C57 (n=5):** animais controle selvagem, ou seja, animais que não foram submetidos a nenhuma incisão ou cirurgia.
- **Fêmeas C57 SHAM (n=5):** animais controle selvagem que passaram pela cirurgia SHAM, ou seja, o animal sofreu a anestesia, a incisão, mas não teve nenhuma porção do ovário retirada
- **Fêmeas C57 OVX (n=5):** animais controle selvagem submetidos à cirurgia de ovariectomia.

Cirurgia de castração – ovariectomia: Com dois meses de idade, as fêmeas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia, realizada com o apoio e auxílio do veterinário responsável pelo biotério central da UPM. As fêmeas foram anestesiadas utilizando um protocolo anestésico composto pela administração por isoflurano [1ml/kg] na concentração de 5% e mantidos a 2,5%. Após a desinfecção da pele com clorexidina, foi feita uma incisão cutânea na linha média dorsal na parte posterior das costelas. Usando dissecação sem corte ao túnel subcutâneo, lateral a incisão da pele, os músculos da parede abdominal posterior foram separados para expor a cavidade abdominal. O ovário foi localizado e a gordura periovariana presa com pinça para levantar e exteriorizar o ovário. A tuba uterina foi cauterizada e o ovário removido por cauterização da área presa. A incisão da pele foi fechada usando fio de sutura número 6. Os animais dos grupos controle foram considerados intactos, ou seja, não passaram por nenhum procedimento cirúrgico, enquanto que os grupos SHAM somente passaram pelo procedimento cirúrgico, sem a cauterização dos ovários. Após a cirurgia, as fêmeas foram colocadas em uma gaiola comunitária com acesso *ad libitum* à comida e água, e mantidas em local aquecido com um aquecedor elétrico para se recuperar da anestesia.

Após o procedimento, os animais receberam a seguinte medicação necessária para recuperação do procedimento cirúrgico: associação de morfina (5mg/kg- SC - 8 horas/por um dia) e meloxicam (1mg/kg - SC - 12 horas/por um dia), assim como o uso do antibiótico enrofloxacino (10mg/kg - SC -dose única). Posteriormente os animais foram devolvidos às instalações habitacionais (Rigalli e Loreto, 2009) e receberam suplementação vitamínica e mineral na água de beber (Glicopan - 1ml cada 100ml de água para beber).

Determinação do ciclo estral: Dois dias antes do início do protocolo de testes comportamentais, as fêmeas foram submetidas ao “Whitten effect”, que consiste em expor as fêmeas às gaiolas com urina dos machos, com o objetivo de sincronizar seu

ciclo estral de modo a reduzir as flutuações comportamentais induzidas pelos níveis de estrogênio

Avaliação comportamental: Para avaliar os possíveis prejuízos na memória dos camundongos fêmeas em razão da cirurgia de ovariectomia, foram realizados os seguintes testes comportamentais:

Teste do Campo Aberto: para avaliar a capacidade locomotora dos animais, eles foram colocados no canto de uma arena quadrada de acrílico azul, com dimensões de 45 cm X 45 cm, um ambiente totalmente novo, sem habituação, com luminosidade baixa e sem estímulos durante o período de 10 minutos. Para a avaliação do teste, foi utilizado o software Ethovision, programa que permite analisar parâmetros de locomoção. Foram feitas delimitações de quadrantes no próprio software Ethovision, onde foram observados e avaliados parâmetros como a velocidade média dos animais durante o período, a distância percorrida e a porcentagem de tempo em que o animal se mantinha na região central e na região periférica.

Teste Holeboard (Protocolo adaptado de DODART et al, 2002): Esse teste teve como objetivo medir a capacidade de um camundongo de lembrar quais dos 9 buracos equidistantes foram iscados com comida. O teste foi realizado no aparato utilizado para o teste de Open Field, uma arena quadrada de acrílico azul, com dimensões de 45,0 x 45,0 cm com uma plataforma com nove buracos equidistantes, medindo 4,5 cm de diâmetro e 3,0 cm de profundidade.

Apenas no primeiro dia de teste, os animais foram habituados na plataforma do teste por 10 minutos cada. Durante os 4 dias consecutivos, os camundongos foram treinados por 4 sessões diárias de 180 segundos com um intervalo de 3 minutos entre cada sessão. Para todas as sessões, os mesmos buracos foram iscados com um único grânulo de alimento (confeito de chocolate).

Os animais foram privados de comida na noite antecedente ao primeiro dia do teste, que foi realizado durante a primeira metade do dia. Após as quatro sessões diárias, foi fornecido acesso livre à comida até 6pm, e após esse horário os animais foram submetidos a jejum novamente para serem expostos ao teste no dia seguinte. O protocolo permaneceu até o quarto e último dia de teste. Antes de cada camundongo passar pelo teste, houve a higienização do aparato com álcool 70%.

Todas as sessões de treino do teste foram filmadas para registro e análises posteriores. Durante o teste, foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Tempo em que o animal leva para comer a recompensa pela primeira vez;

2. Tempo em que o animal leva para comer as três recompensas;
3. Número de vezes que o animal comete um erro (visita o buraco sem recompensa);
4. Número de vezes que o animal come em determinado buraco;
5. Número de vezes em que o animal visita o buraco com a recompensa.

Foi considerada entrada no buraco, o momento que o animal coloca a cabeça inteira no buraco. Às vezes em que o animal vai ao buraco com a recompensa e não come, não é considerado erro. O erro de memória de referência foi considerado quando o animal visita um buraco que não foi iscado e revisitar em um buraco com isca em que ele já havia comido toda a isca anteriormente é considerado como erro de memória de trabalho.

Todos os testes comportamentais foram realizados em sala própria silenciosa e filmados para posterior avaliação por dois observadores em estudo cego. Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado com o uso de uma seringa por punção cardíaca, e os tecidos do cérebro para posteriores análises moleculares.

Análise estatística: Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística para levantamento de sua relevância. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA mista de 2 vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni através do software Graphpad Prism e a significância considerada foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados dos testes realizados, foi optado por dividir os grupos estudados para uma melhor visualização e apresentação dos resultados. Primeiramente, foram analisados o grupo controle e o grupo SHAM, para certificar que as possíveis implicações na memória dos animais não são decorrentes da anestesia e da própria incisão da cirurgia realizada. O grupo SHAM é um importante controle científico, pois assegura que os resultados são refletidos a partir dos efeitos da ovariectomia e não uma consequência da cirurgia em si. Posteriormente, os resultados foram divididos em grupo SHAM e grupo OVX, a qual o grupo SHAM ocupa o lugar do grupo controle do experimento, podendo assim comparar com mais precisão os resultados de cada grupo.

4.1 Teste de Campo Aberto

Os parâmetros observados no teste de campo aberto para análise foram: distância percorrida pelos animais no aparato; velocidade dos animais durante o teste e porcentagem de tempo em que os animais mantiveram no centro e na

periferia do aparato. Com relação a distância percorrida pelos animais do grupo CTRL e SHAM (Figura 4A), observou-se que o grupo SHAM percorreu uma maior distância em relação ao grupo controle no segundo dia com diferença significativa ($p = 0,0101$). A ANOVA de duas vias apresentou diferença estatística entre os dias de observação ($F_{2, 8} = 6,715$; $p = 0,0194$), entretanto não apresentou efeito significativo entre os grupos e na interação entre dias e grupos observados.

A Figura 4B mostra os resultados obtidos em relação a velocidade média dos animais observada no aparato de campo aberto. Nota-se que houve uma redução significativa na velocidade do grupo controle no dia 2 ($p = 0,0104$) quando comparado a velocidade do grupo SHAM. Não foram observadas diferenças significativas no tempo que os animais se mantiveram na região periférica e região central do aparato ($p = 0,4881$), como é mostrado nas figuras 4C e 4D, respectivamente.

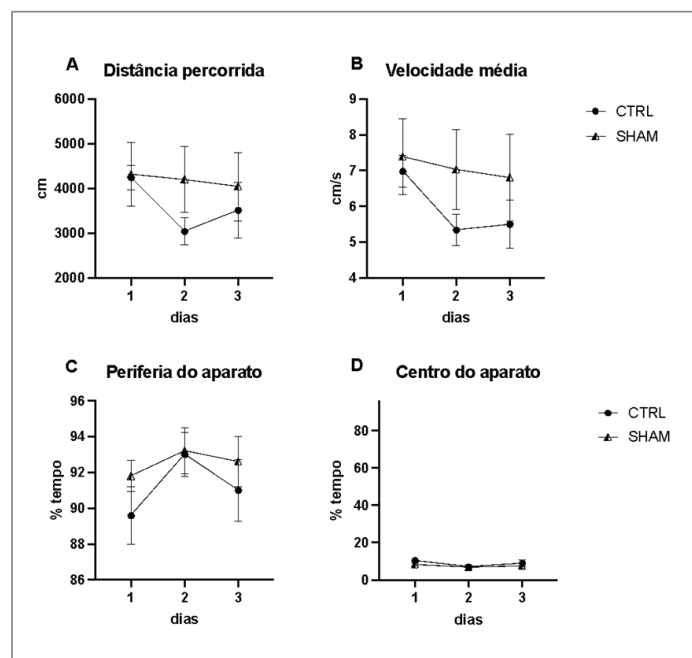


Figura 4. Resultados dos testes de campo aberto realizados pelos animais dos grupos CTRL ($n=5$) e SHAM ($n=5$). **A** Distância percorrida (cm) ao longo dos três dias de teste. **B** Velocidade média (cm/s) dos animais no aparato durante três dias de teste. **C** Porcentagem de tempo que os animais se mantiveram na região periférica do aparato. **D** Porcentagem de tempo em que os animais se mantiveram na região central do aparato.

Como podemos observar na figura 5A, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos em relação a distância percorrida pelos animais no 3º dia de exposição, entretanto os animais do grupo SHAM apresentaram uma velocidade estatisticamente maior quando comparado ao grupo OVX (Figura 5B) nos dias 1 ($p = 0,0003$) e 2 ($p = 0,0008$). Ainda em relação a velocidade em que os animais se deslocaram no aparato do campo aberto, a análise pela ANOVA de duas

vias não mostrou diferenças estatísticas entre os dias de observação ($F_{2, 8} = 4,235$; $p = 0,0557$) e os grupos ($F_{1, 4} = 1,516$; $p = 0,2856$), mas com efeito significativo entre a interação de dias e grupos ($F_{2, 8} = 11,46$; $p = 0,0045$). Em relação ao tempo dos animais na região periférica e central, a análise estatística não revelou diferenças estatísticas entre os grupos que realizaram o teste, como observado nas figuras 5C e 5D.

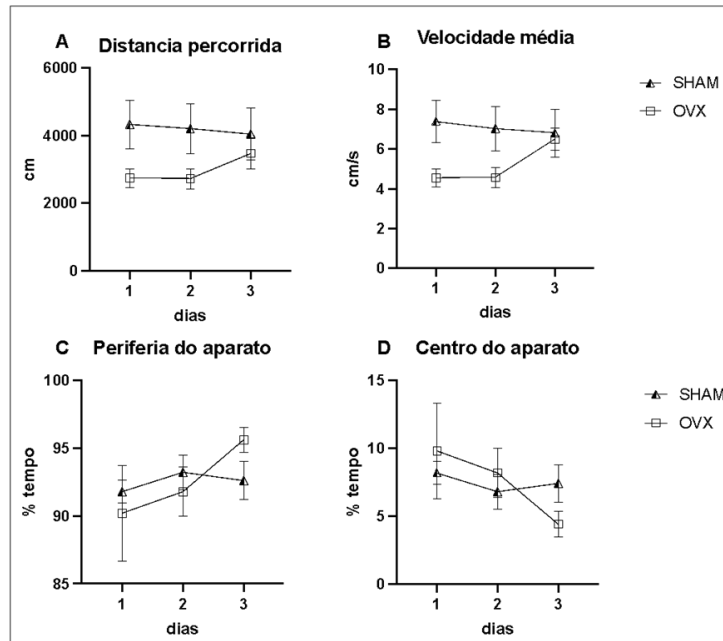


Figura 5. Resultados dos testes de campo aberto realizados pelos animais dos grupos SHAM (n=5) e OVX (n=5). **A** Distância percorrida (cm) ao longo dos três dias de teste. **B** Velocidade média (cm/s) dos animais no aparato durante três dias de teste. **C** Porcentagem de tempo que os animais se mantiveram na região periférica do aparato. **D** Porcentagem de tempo em que os animais se mantiveram na região central do aparato.

4.2 Teste Holeboard

Nesse teste foram observados três parâmetros para análise: número de erros cometidos pelos animais, ou seja, número de vezes em que o animal visita um buraco vazio sem nenhuma isca; número de acertos, caracterizado pela quantidade de vezes em que o animal vai até o buraco com isca e número de vezes que o animal visita o buraco iscado em que ele já comeu toda a comida anteriormente. Além disso, foram também analisadas mobilidade e locomoção, pelos parâmetros de distância percorrida, velocidade média e porcentagem de tempo em que os animais permanecem em cada área do aparato (centro e periferia)

A figura 6 mostra os resultados dos três parâmetros avaliados em relação a memória viso espacial (Fig. 6A e 6B) e memória de trabalho (Fig. 6C) durante os quatro dias de teste dos grupos CTRL e SHAM. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos números de vezes que os animais entram no buraco

sem isca, como mostra a Figura 6A ($p = 0,7566$). Em relação ao número de vezes que os animais entram no buraco iscado (Figura 6B), a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre os quatro dias de exposição ($F 3, 12 = 10,06$; $p = 0,0014$) e entre os grupos ($F 1, 4 = 22,21$; $p = 0,0092$). A análise estatística com ANOVA também mostrou diferença estatística entre os dias de observação em relação a memória de trabalho (Figura 6C) ($F = 3, 12 = 6,460$; $p = 0,0075$), mas não entre os grupos observados.

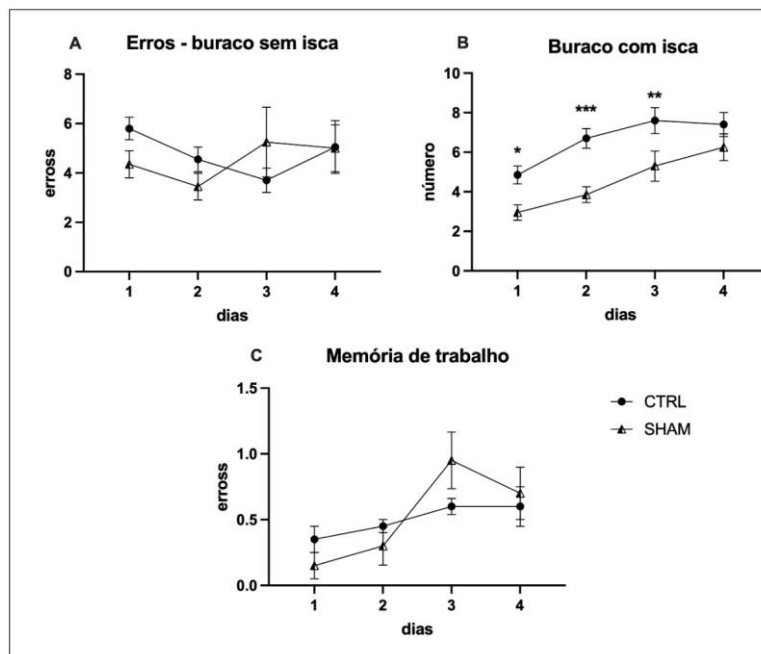


Figura 6. Resultados dos testes holeboard realizados nos animais dos grupos CTRL ($n=5$) e SHAM ($n=5$). **A** Número de vezes em que o animal visitou algum buraco vazio durante quatro dias. **B** Número de vezes em que o animal visitou algum buraco iscado durante quatro dias. **C** Número de vezes em que o animal revisitou algum buraco iscado ele já havia comido.

A figura 7 abaixo mostra os resultados dos grupos SHAM e OVX no teste do Holeboard. Não foi observada diferença significativa entre os grupos SHAM e OVX em relação ao número de vezes em que os animais entraram num buraco vazio durante os quatro dias de exposição no teste Holeboard (Figura 7A). Em relação ao número de vezes que os animais visitaram um buraco que tinha comida (Figura 7B), a análise estatística com a ANOVA de duas vias apresentou diferenças significativas entre os dias de observação ($F 3, 12 = 7,241$; $p = 0,0050$), entre os grupos ($F 1, 4 = 9,203$; $p = 0,0386$) e entre os dias e grupos ($F 3, 12 = 5,241$; $p = 0,0153$). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que o grupo SHAM visitou mais vezes o buraco com comida que as fêmeas ovariectomizadas, com diferença estatística no 3º dia ($p = 0,0061$) e 4º dia ($p < 0,0001$). Já em relação a memória de trabalho (Figura 7C), os animais que passaram pela cirurgia de ovariectomia cometem mais erros no 1º, 2º e 3º dia, entretanto houve diferença significativa apenas no 1º dia ($p =$

0,0472). A análise estatística com ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa entre os dias de observação ($F_{3, 12} = 5,241$; $p = 0,385$).

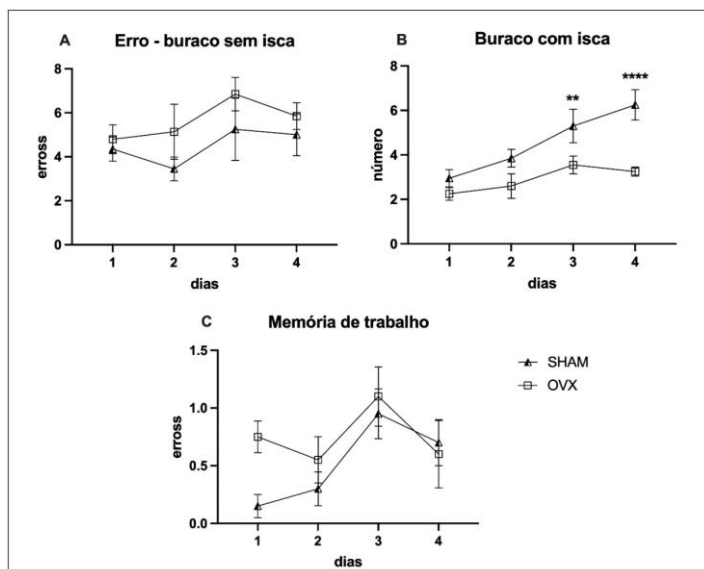


Figura 7. Resultados dos testes holeboard realizados nos animais dos grupos SHAM (n=5) e OVX (n=5). **A** Número de vezes em que o animal visitou algum buraco vazio durante quatro dias. **B** Número de vezes em que o animal visitou algum buraco iscado durante quatro dias. **C** Número de vezes em que o animal revisitou algum buraco iscado ele já havia comido.

Em relação aos parâmetros de mobilidade realizados no aparato do Holeboard e analisados pelo software Ethovision, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni não demonstrou diferença significativa entre os grupos observados em nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, a análise estatística com ANOVA de duas vias revelou significância entre os dias de observação nos parâmetros de distância percorrida pelos animais ($F_{3, 12} = 9,418$; $p = 0,0018$) e tempo de permanência na região central e periférica do aparato ($F_{3, 12} = 8,170$; $p = 0,0031$), mostrados nas figuras 8A, 8B e 8C, respectivamente.

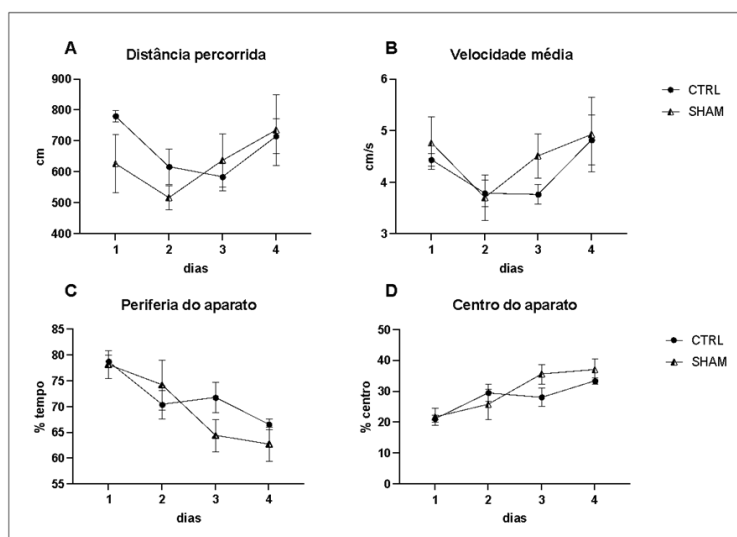


Figura 8. Resultados dos parâmetros de mobilidade e locomoção realizados pelos animais dos grupos CTRL (n=5) e SHAM (n=5) no aparato do Holeboard. A Distância

percorrida (cm) ao longo dos três dias de teste. B Velocidade média (cm/s) dos animais no aparato durante três dias de teste. C Porcentagem de tempo que os animais se mantiveram na região periférica do aparato. D Porcentagem de tempo em que os animais se mantiveram na região central do aparato.

Ainda em relação aos parâmetros de mobilidade analisados no aparato do Holeboard, não foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos SHAM e OVX pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; no entanto foram observadas diferenças pela ANOVA de duas vias entre os dias de observação, tanto em relação à distância ($F_{3, 12} = 6,415$; $p = 0,0077$) como em velocidade ($F_{3, 12} = 7,773$; $p = 0,0038$), como mostrado nas figuras 9A e 9B consequentemente. Além disso, podemos notar que as fêmeas ovariectomizadas passam mais tempo na região periférica (Figura 9C) e menos tempo na região central (Figura 9D) quando comparadas as fêmeas do grupo SHAM, em que houve significância estatística nos dias 3 ($p = 0,0115$) e 4 ($p = 0,0073$).

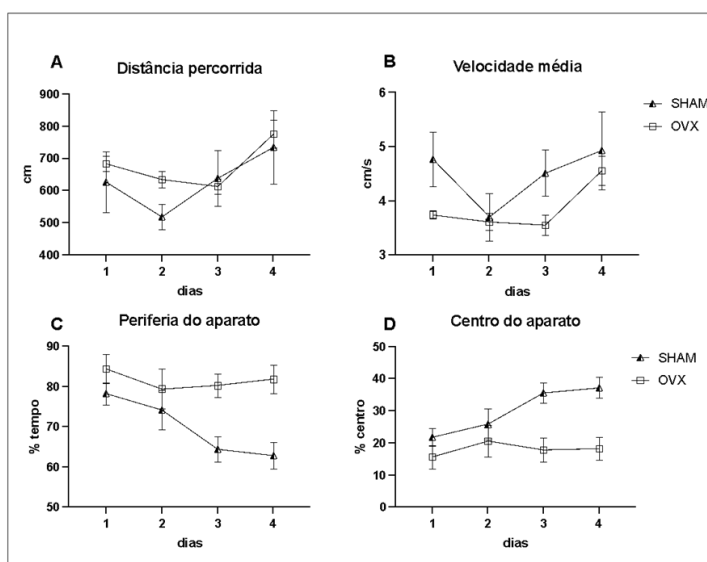


Figura 9. Resultados dos parâmetros de mobilidade e locomoção realizados pelos animais dos grupos SHAM (n=5) e OVX (n=5) no aparato do Holeboard. **A** Distância percorrida (cm) ao longo dos três dias de teste. **B** Velocidade média (cm/s) dos animais no aparato durante três dias de teste. **C** Porcentagem de tempo que os animais se mantiveram na região periférica do aparato. **D** Porcentagem de tempo em que os animais se mantiveram na região central do aparato.

Estudos anteriores já mostraram que durante a menopausa, mais de 50% das mulheres relatam o comprometimento das funções cognitivas, como aprendizagem e memória, visto que ambas são moduladas pelos hormônios ovarianos. Com o declínio dos níveis desses hormônios esteroides, principalmente o estradiol, estudos relatam que o desempenho das mulheres em tarefas de memória tende a piorar (CAO et. al., 2013).

O presente trabalho confirmou dados da literatura pois as fêmeas ovariectomizadas exibiram prejuízos na memória viso espacial no teste Holeboard, já

que as camundongas ovariectomizadas visitam menos vezes o buraco com a recompensa alimentar em relação ao grupo controle SHAM. No entanto, não observamos prejuízos na memória de trabalho desses animais.

A utilização do teste Holeboard foi escolhida por ser uma tarefa adequada para avaliar os parâmetros da memória viso espacial e memória de trabalho em roedores, além de avaliar atividade locomotora e preferência pela periferia ou centro do aparato (VAN DER STAAY, 2012), o que permite inferir comportamento do tipo ansioso em um único teste. Os resultados mostraram que a ovariectomia aumenta o tempo gasto na periferia do aparato, sugerindo um aumento no comportamento do tipo ansioso. O uso do teste de campo aberto, o teste gold standard para avaliar locomoção e ansiedade dos camundongos confirmou os achados do teste de Holeboard (GOULD et al., 2009).

O estudo também avaliou se a cirurgia SHAM resultaria em diferenças no comportamento em comparação ao grupo intacto. Os resultados do teste de campo aberto mostraram que o grupo controle selvagem e o grupo controle SHAM não apresentaram diferenças estatísticas na locomoção e permanência nas regiões centrais e periféricas, demonstrando que a anestesia e a incisão no camundongo não prejudicam o comportamento do animal em relação a uma possível ansiedade. O teste de Holeboard confirmou os achados do campo aberto.

A partir dos resultados obtidos do teste Holeboard, foi possível concluir que a memória de trabalho não foi afetada nas fêmeas do grupo controle SHAM em relação ao grupo controle intacto. Entretanto, os animais do grupo controle SHAM apresentaram mais erros da memória viso espacial durante os dias de teste; porém vale destacar que eles parecem aprender no último dia. Assim, podemos inferir que a cirurgia pode interferir na formação da memória possivelmente por levar à uma inflamação sistêmica que é reconhecidamente um fator de piora para consolidação da memória.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Presença de baixos níveis de estrógeno afetam a memória viso espacial em camundongos;
- Animais do grupo controle SHAM não apresentam diferenças no comportamento exploratório;
- Animais do grupo OVX apresentam prejuízos na memória viso espacial, mas não na memória de trabalho;

6. REFERÊNCIAS

- AHMED, Tariq et al. Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 11, p. 2474-2478, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>>. Acesso em: 12 Mar. 2021.
- BARRETT, K. E., BARMAN, S. M., BROOKS, H. L., YUAN, J. X. J. **Ganong's Review of Medical Physiology**, 2010. Acesso em: 03 Nov. 2020
- BEAR, M.F., CONNORS, B.W. AND PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2a ed., **Porto Alegre: Artmed**, p.547- 579, 2002. Acesso em: 12 Mar. 2021.
- BEHL, C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nat. Rev. Neurosci.** 3, 433–442. 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrn846>>. Acesso em: 20 Nov. 2020.
- BIRD, Chris M.; BURGESS, Neil. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182-194, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrn2335>>. Acesso em: 03 Dez. 2020.
- BRANDNER, C. Spatial Memory. In **Encyclopedia of Neuroscience**. 2009. Disponível em: < https://serval.unil.ch/resource/serval:BIB_B57EE846F030.P001/REF.pdf>. Acesso em: 04 Mai. 2021.
- BROSNAN-WATTERS, G. et al. Acute behavioral effects of MK-801 in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 3, p. 701-711, 1996. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02073-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02073-X)>. Acesso em: 10 Abr. 2021.
- CAO, Fang et al. Ovariectomy-mediated impairment of spatial working memory, but not reference memory, is attenuated by the knockout of the dopamine D3 receptor in female mice. **Behavioural brain research**, v. 247, p. 27-33, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.014>>. Acesso em: 22 Fev. 2021.
- CIMAROSTI, H., I. Estrógeno e pré-condicionamento: efeitos neuroprotetores e possíveis mecanismos de ação em modelos in vitro e in vivo de isquemia cerebral. 2005. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/5041>>. Acesso em: 19 Abr. 2021.
- DIAZ BRINTON, Roberta. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571-3578, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>>. Acesso em: 20 Out. 2020.
- DUDCHENKO, Paul A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699-709, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002>>. Acesso em: 20 Mai. 2021.
- DODART, Jean-Cosme et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 452-457, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn842>>. Acesso em: 02 Abr. 2021.
- FERREIRA, I. C. C., SILVA, S. S., ALMEIDA, R. S. Menopausa, Sinais e Sintomas e seus Aspectos Psicológicos em Mulheres sem Uso de Reposição

Hormonal. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 60-64, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2015v19n2p%25p>>. Acesso em: 20 Out. 2020.

FILE, Sandra E.; WARDILL, Ann G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 53-59, 1975. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/bf00421184>>. Acesso em: 29 Abr. 2021

GENAZZANI, A. R. SPINETTI, A., GALLO, R., BERNARDI, F. Menopause and the central nervous system: intervention options. **Maturitas**, v. 31, p. 103 – 110, 1999. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(98\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(98)00112-1)>. Acesso em: 02 Abr. 2021.

GLICKMAN, Stephen E.; SROGES, Richard W. Curiosity in zoo animals. **Behaviour**, v. 26, n. 1-2, p. 151-187, 1966. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/156853966X00074>>. Acesso em: 29 Abr. 2021.

GOULD, Todd D.; DAO, David T.; KOVACSICS, Colleen E. The open field test. **Mood and anxiety related phenotypes in mice**, p. 1-20, 2009. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1>. Acesso em: 03 Mai. 2021.

GRUBER, Christian J. et al. Production and actions of estrogens. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 5, p. 340-352, 2002. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra000471>>. Acesso em: 16 Abr. 2021.

KUC, K. A. et al. Holeboard discrimination learning in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 355-363, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00168.x>>. Acesso em: 22 Fev. 2021.

LABOTS, Maaïke et al. The modified hole board-measuring behavior, cognition and social interaction in mice and rats. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 98, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4541485/>>. Acesso em: 22 Fev. 2021.

LOBO, Rogerio A. et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, v. 17, n. 5, p. 540-556, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/13697137.2014.933411>>. Acesso em: 19 Out. 2020.

LUINE, Victoria N. Estradiol and cognitive function: past, present and future. **Hormones and behavior**, v. 66, n. 4, p. 602-618, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.011>>. Acesso em: 16 Abr. 2021.

MESSINIS, Ioannis E. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. **Human reproduction update**, v. 12, n. 5, p. 557-571, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/humupd/dml020>>. Acesso em: 06 Mai. 2021.

MONTEIRO, S. C., de Mattos, C. B., Ben, J., Netto, C. A., & Wyse, A. T. S. (2008). Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. **Metabolic Brain Disease**, 23(3), 243–253. doi:10.1007/s11011-008-9093-6 Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9093-6>>. Acesso em: 22 Fev. 2021.

MORRIS, Richard GM. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and motivation**, v. 12, n. 2, p. 239-260, 1981. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)>. Acesso em: 02 Abr. 2021.

NIEWOEHNER, Burkhard et al. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 837-846, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05312.x>. Acesso em: 03 Mai. 2021

OLTON, David S.; SAMUELSON, Robert J. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of experimental psychology: Animal behavior processes**, v. 2, n. 2, p. 97, 1976. Disponível em: < <https://psycnet.apa.org/doi/10.1037/0097-7403.2.2.97>>. Acesso em: 08 Mai. 2021.

PAUL, Carrillo-Mora; MAGDA, Giordano; ABEL, Santamaría. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. **Behavioural brain research**, v. 203, n. 2, p. 151-164, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.022>>. Acesso em: 21 Abr. 2021.

ROCCA, W. A., GROSSARDT, B. R., MILLER, V. M., SHUSTER, L. T., BROWN JR., R. D. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. **Menopause**, v. 19, n. 3, p. 272-7, Mar 2012. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1097%2Fgme.0b013e31822a9937>>. Acesso em: 16 Ago. 2021.

SILVA, João Roberto Ratis Tenório da et al. Memória e aprendizagem: construção de significados sobre o conceito de substância química. 2018. Disponível em: < <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/30378>>. Acesso em: 18 Abr. 2021.

STABOLI, Thalita Maschk. Desenvolvimento de sistema de análise para valerato de estradiol baseado em polímeros biomiméticos. 2011. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/132480>>. Acesso em: 04 Fev. 2021

SUTHERLAND, Robert J.; DYCK, Richard H. Place navigation by rats in a swimming pool. **Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie**, v. 38, n. 2, p. 322, 1984. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/doi/10.1037/h0080832>>. Acesso em: 14 Mai. 2021.

VAN DER STAAY, F. Josef. Spatial working memory and reference memory of Brown Norway and WAG rats in a holeboard discrimination task. **Neurobiology of learning and memory**, v. 71, n. 1, p. 113-125, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3860>>. Acesso em: 02 Abr. 2021.

VAN DER STAAY, F. Josef et al. The appetitively motivated “cognitive” holeboard: a family of complex spatial discrimination tasks for assessing learning and memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 1, p. 379-403, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.008>>. Acesso em: 02 Abr. 2021

VEDDER, Lindsey C. et al. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. **Hippocampus**, v. 23, n. 1, p. 108-115, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/hipo.22068>>. Acesso em: 25 Out. 2020.

YANES, L. L.; RECKELHOFF, J. F. Postmenopausal hypertension. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 7, p. 740-9, Jul 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.71>>. Acesso em: 16 Ago. 2021.

ZHANG, Rong et al. Loss of hypothalamic corticotropin-releasing hormone markedly reduces anxiety behaviors in mice. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 733-744, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/mp.2016.136>>. Acesso em: 19 Abr. 2021.

Contatos: giovannafm@outlook.com e miriam.ribeiro@mackenzie.br