

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

Lariza Oliveira de Souza

**AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO
ACOPLADO À PROTEÍNA G (GPER1) NA CONSOLIDAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS
Wistar.**

Porto Alegre
2020

Lariza Oliveira de Souza

**AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO
ACOPLADO À PROTEÍNA G (GPER1) NA CONSOLIDAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS
WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dra. Nadja Schröder

Porto Alegre

2020

*Dedico este trabalho em memória do meu avô,
Camilo Alves de Souza.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por me permitir a conclusão de mais uma importante etapa em minha vida;

Aos meus pais, Joiciane Oliveira de Souza e Claudionor Câmara de Souza, por todo o carinho e dedicação em minha educação. Sempre me incentivando a seguir em frente neste caminho;

À minha irmã Larissa Oliveira de Souza, por todos os anos em que me ajudou em trabalhos escolares e até mesmo em ensinamentos para a vida. Obrigada pelos momentos divertidos entre irmãs;

Aos meus avós paternos, Camilo Alves de Souza (in memorian), por todo o amor e tempo que estivemos juntos e Gregória Câmara de Souza; por sempre perguntar como estou e saber se estou me cuidando nesses tempos difíceis;

A toda minha família que sempre me apoiou nas minhas decisões e na profissão que escolhi para minha vida;

Aos meus inestimáveis amigos, Izabelly Lucas, Jéssica Fernandes, Alisson Costa, Pedro Gabriel, Isis Liz, Natália Regina, Matheus Dias e Eliziéle Paroli que conquistei ao longo dos anos e que sempre permanecem ao meu lado não importando onde esteja;

Agradeço à minha orientadora Prof. Dr. Nadja Schröder pelo, incentivo e todos os ensinamentos que me ajudaram desde o início, até a conclusão deste trabalho. Por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e me guiar ao caminho certo até aqui;

A meus amigos e companheiros de grupo de pesquisas, Sarah Luize Camargo Rodrigues, Maria Paula Arakaki Severo, Patrícia Molz e José Afonso Corrêa da Silva, por toda a ajuda na realização deste trabalho e pelos conhecimentos a mim passados, sua dedicação é um exemplo para minha vida e profissão;

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e ao Programa de Pós Graduação Farmacologia e Terapêutica pelo incentivo e pelos conhecimentos por eles oferecidos;

Ao suporte financeiro das agências de fomento à pesquisa científica: CAPES e CNPq.

A todos que trabalham no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), pelo cuidado com nossos animais.

Aos professores da pós-graduação que me inspiraram no desejo de ser uma pesquisadora da área de Farmacologia e Terapêutica.

E por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que porventura não foram citados, agradeço imensamente.

RESUMO

O estradiol (E2) embora, seja um hormônio de produção na sua maioria gonadal, pode ser sintetizado no sistema nervoso a partir do colesterol por uma conversão dependente de aromatase. Seus efeitos, irão depender dos níveis hormonais e da interação de diferentes receptores de estrogênio nos circuitos neurais. Seus mecanismos de resposta ainda não foram completamente esclarecidos, porém sabe-se que ocorrem por meio da ativação de receptores intracelulares de estrogênio (ERs), ER α e ER β , os quais funcionam através da indução da transcrição gênica e do recentemente caracterizado, receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1), relacionado à uma rápida sinalização da membrana, mediada pelo seu ligante estradiol . Sabe-se que o estradiol está envolvido em diversas funções de neuroproteção, controle da neuroinflamação, promovendo também o crescimento de sinapses glutamatérgicas, e com importância na função mitocondrial. Essas ações são fundamentais para a manutenção da função cognitiva, memória e proteção contra danos celulares associados ao estresse cognitivo. Essas funções são muito bem descritas na literatura com relação a fêmeas, porém seus efeitos em machos, ainda são muito pouco explorados. Sendo assim, será importante determinar quais os efeitos fisiológicos desses receptores de estrogênio, especialmente o acoplado a proteína G, durante a consolidação e reconsolidação da memória, em ratos machos. O objetivo do presente trabalho foi buscar estabelecer o papel do GPER1 nos processos de consolidação e reconsolidação da memória, além de investigar o perfil temporal da ativação do receptor GPER1 sobre a consolidação da memória de ratos machos adultos, por meio da administração sistêmica de seu agonista G-1. A administração subcutânea de G-1 (0, 15, 75 ou 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$), foi realizada em intervalos diferentes após a realização do treino nas tarefas comportamentais de reconhecimento de objeto e esquiva inibitória.. Os grupos que receberam tratamento com G-1 na dose mais alta, imediatamente após o treino, apresentaram ação melhoradora da memória em ambas as tarefas, enquanto a administração do seu antagonista G15 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) teve efeito amnésico na tarefa de reconhecimento de objeto. A administração de G-1 3 ou 6 horas após o treino não teve efeitos sobre a memória nas duas tarefas. Além disto, também não foi observado efeito sobre a reconsolidação da memória de esquiva inibitória. Desta forma, neste trabalho, exploramos estratégias farmacológicas através da administração do agonista e do antagonista de GPER1, levando em consideração seu

perfil temporal, em testes comportamentais, para melhor compreensão dos seus efeitos em ratos machos adultos saudáveis. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a estimulação do GPER1 modula positivamente os estágios iniciais da consolidação da memória.

Palavras-chaves: GPER1, G1, machos, consolidação, reconsolidação, memória, estradiol.

ABSTRACT

Estradiol (E2), although mostly a gonadal hormone, can be synthesized in the nervous system from cholesterol by an aromatase-dependent conversion.. Its effects will depend on hormone levels and the interaction of different estrogen receptors in neural circuits. Its mechanisms have not yet been fully clarified, but they are known to occur through the activation of intracellular estrogen receptors (ERs), ER α and ER β , which act through the induction of gene expression - and the recently characterized, G protein-coupled estrogen receptor (GPER1) related to a rapid membrane signaling, mediated by its ligand, estradiol . It is known that estradiol is involved in several functions, including neuroprotection, control of neuroinflammation, also promoting the growth of glutamatergic synapses, and with importance in mitochondrial function. These actions are essential for the maintenance of cognitive function, memory and protection against cellular damage associated with cognitive stress. These functions are very well described in the literature in relation to females, while on males are still very little explored. Therefore, it will be important to determine the physiological effects of these estrogen receptors, particularly of those of G protein-coupled receptors, during the consolidation and reconsolidation of memory, in males rats. The aim of the present study was to establish the role of GPER1 in the processes of memory consolidation and reconsolidation, in addition to investigating the temporal profile of the participation of the GPER1 on memory consolidation in adult male rats, through the systemic administration of its agonist, G-1. The subcutaneous administration of G-1 (0, 15, 75 or 150 μ g/kg), was performed at different intervals after the training session of behavioral tasks of object recognition and inhibitory avoidance. Groups that received treatment with G-1 at the highest dose, immediately after training showed improved memory in both tasks. The administration of GPER1 antagonist, G15 (100 μ g/kg), impaired object recognition memory consolidation G1 administration at 3 or 6 hours after training revealed no effects on inhibitory avoidance and recognition memory. Moreover, we did not observe any effects of G1 administration on inhibitory avoidance memory reconsolidation. Therefore, in the present work, we used pharmacological strategies through the administration of GPER1 agonist and antagonist, taking into account their temporal profile, in behavioral tests, to better understand their effects in adult male rats. Taking together the present findings indicate that GPER1 stimulation modulates early memory consolidation in male rats.

Keywords: GPER1, G1, males, consolidation, reconsolidation, memory, estradiol.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Estrogênios	11
2.2 Receptores de Estrogênio	13
2.3 GPER 1 – Receptor de estrogênio acoplado a proteína G.....	15
2.3.1 Caracterização inicial de GPER 1	15
2.3.2 GPER e seus ligantes	16
2.3.3 GPER 1, Localização e Distribuição	17
2.4 Memória	18
2.4.1 Tipos de memória	19
2.4.2 Fases da memória	22
2.5 Consolidação X Reconsolidação da memória.....	24
2.6 Estrogênio e sua interação na memória.....	28
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 HIPÓTESES.....	32
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos	33
6 RESULTADOS	33
6.1 Artigo.....	33
6.2 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	62
• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
• ANEXO I - Aprovação pela CEUA/UFRG.....	74

1 INTRODUÇÃO

A memória é a capacidade de armazenar informações, de modo que possam ser recuperadas quando buscamos recordá-las. Ocorre pela formação de conexões neuronais presentes no cérebro. Estas conexões serão responsáveis por captar informações através dos órgãos sensoriais, como no sistema visual, por exemplo, em que as informações visuais, serão encaminhadas para diferentes partes do córtex visual. O córtex frontal irá receber informações operacionais de curto prazo, como as de utilização imediata. Essas informações são encaminhadas para o hipocampo, que é responsável pela formação da memória a longo prazo e que utiliza fatores emocionais vinculados a tais informações para que estas possam ser reativadas quando necessárias. Os fatores emocionais que auxiliam no processo de memorização são formados por conexões neurais localizadas na amígdala, permitindo a ação rápida.

Os estrogênios são hormônios esteróides que são sintetizados nas gônadas e distribuídos em diversos órgãos, tais como útero, mama, ovário, pulmão e rim, além de serem encontrados nos ossos e no encéfalo. O estradiol (E2), é a forma mais potente e predominante de estrogênio, o qual possui vários efeitos sobre a cognição e a função cerebral (Bean et al. 2014; Kim et al., 2016). Os efeitos do estradiol na memória dependem dos níveis hormonais e da interação de diferentes receptores de estrogênio nos circuitos neurais. Os mecanismos subjacentes aos efeitos do estradiol ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, acredita-se que estes sejam primariamente mediados através da ativação de receptores intracelulares de estrógeno (ERs), ER α e ER β (Bean et al. 2014). O estradiol induz a transcrição gênica através dos receptores de estrogênio alfa (ER α) e beta (ER β), e a rápida sinalização da membrana mediada por um receptor de estrogênio acoplado à proteína G recentemente caracterizado, que será mais adiante aprofundado no estudo. Cada um dos receptores apresenta distribuições distintas e capacidade de influenciar a sinalização dependente de estradiol.

Estudos realizados com o uso de agonistas específicos dos receptores, propõem que todos os três receptores ativam rapidamente a sinalização de quinases e têm complexas influências dependentes da dose na memória. Pesquisas que usam camundongos *knockout* para receptores, demonstram que ER α mantém a transcrição e a memória quando os níveis de estradiol diminuem.

Nota-se, que a capacidade do estradiol para a melhora da cognição diminui com a idade avançada, juntamente com a diminuição da expressão dos receptores de estrogênio (Bean et al., 2014).

O estrogênio tem a capacidade de regular várias funções neuronais, como o aprendizado e a memória (McEwen and Alves, 1999; McEwen et al 2012), com efeitos do estrogênio observados em cérebros masculinos e femininos (Gillies and McArthur, 2010). Entretanto, se encontra muito bem consolidado na literatura, a influência do estradiol em fêmeas e seus efeitos na memória e cognição (Smejkalova and Woolley, 2010; Dumitriu et al., 2010; Srivastava and Penzes, 2011), semelhante aos seus efeitos reprodutivos, que ocorrem por meio da ligação aos receptores nucleares clássicos ER α e ER β . Esses receptores, que foram primeiramente isolados e caracterizados do útero, foram posteriormente encontrados em muitos locais do cérebro. Então a partir desse momento, muitos estudos foram realizados para caracterizar os mecanismos somente dos receptores clássicos de estrogênio (ER α e ER β). Geralmente, desenvolvidos com roedores fêmeas, podendo ou não, de acordo com a pesquisa, passar pelo procedimento de ovariectomia (Srivastava and Penzes, 2011). Com a recente identificação do receptor acoplado à proteína G (GPER1), novos trabalhos foram sendo realizados com o objetivo de elucidar seus mecanismos relacionando a função cognitiva a outros elementos, em roedores fêmeas (Alexander et al., 2017; Machado et al., 2019). Porém, ainda se há necessidade de buscar mais respostas, com relação às informações sobre este receptor acoplado à proteína G em machos.

Sendo assim, será importante para futuras pesquisas determinar qual os efeitos fisiológicos desses receptores de estrogênio, principalmente o acoplado à proteína G, durante a consolidação da memória em machos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrogênios

Os estrogênios são hormônios que derivam do colesterol e desempenham papel crucial em ambos os sexos. São responsáveis por diversos processos fisiológicos como o crescimento celular, reprodução, desenvolvimento e diferenciação sexual, bem como estão envolvidos em processos patológicos como neoplasias, inflamação, neurodegeneração (Baudry et al., 2012; Al-Sweidi et al., 2012), doenças

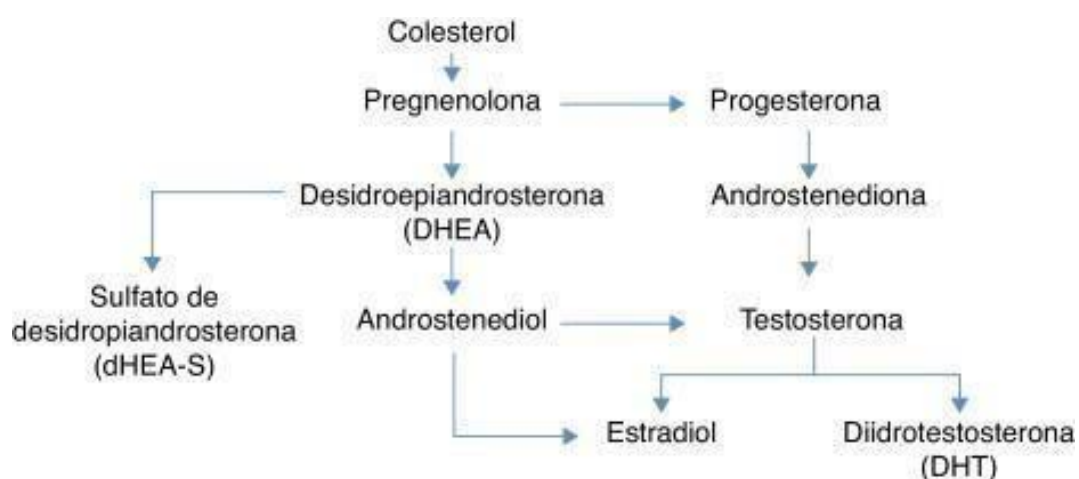
cardiovasculares (Murphy and Steenbergen, 2007) e metabólicas, além de osteoporose (Hadji, 2012). O local de síntese de estrogênios varia de acordo com o gênero e, no caso das mulheres, com a idade. Em fêmeas, o estradiol é secretado em quantidades significativas somente pelos ovários, embora quantidades mínimas também sejam secretadas pelos córtices adrenais (Baird, 1974; Aedo et al., 1980; Shoham and Schachter, 1996). Durante o período fértil da vida da mulher, os ovários representam o sítio primário de síntese do estradiol (E2), o qual é o mais predominante e potente (Colleen et al.; 2008).

Na fase folicular do ciclo menstrual, a síntese de estrógenos é realizada a partir dos folículos, enquanto na fase lútea é o corpo lúteo o responsável por essa síntese. A síntese de E2 depende de dois tipos celulares diferentes: as células da teca e da granulosa, dentro dos folículos, e as células tecais ovarianas e as granulosa-luteínicas, dentro do corpo lúteo (Shoham and Schachter, 1996). As células da teca e as tecaluteínicas obtêm o colesterol e então produzem androstenediona a qual se difunde até a camada granulosa. Nas células da granulosa, o hormônio folículo estimulante (FSH), através da via da adenilatociclase, estimula as células a produzirem aromatase (Shoham and Schachter, 1996). A aromatase é a enzima que converte a androstenediona em estrona (E1). A estrona, então, por ação da enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) é convertida em E2 (Figura 1). Uma via alternativa é a conversão da mesma androstenediona em testosterona pela 17 β -HSD e, em seguida, a conversão da testosterona em E2 pela aromatase. Há também a produção de estriol (E3) que é um estrogênio fraco; e produto oxidativo derivado do estradiol e da estrona, e a sua conversão se dá, principalmente, no fígado (Colleen et al., 2008). Nos machos aproximadamente 20% do hormônio é formado nas células de Leydig localizadas nos testículos (Dorrington et al., 1975; Payne et al., 1976; Carreau et al., 2010), o restante é formado nos tecidos periféricos pela aromatização dos andrógenos, principalmente a testosterona (Hess and Cooke, 2018). O processo de conversão da testosterona em estrogênio ocorre com a participação da enzima aromatase. A atividade da aromatase aumenta com a idade e com a obesidade (Colleen et al.; 2008).

Por mais que o estradiol seja um hormônio de produção na sua maioria gonadal, o E2 pode ser sintetizado no sistema nervoso a partir do colesterol por uma conversão dependente de aromatase (Baulieu, 1997; Compagnone and Mellon, 2000). Esses esteróides são sintetizados *de novo* por meio do colesterol ou de precursores

esteróides importados de áreas periféricas, em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral, por ambos os neurônios e glia. Estes hormônios sintetizados localmente (tecido neural) são chamados de neuroesteroides. No cérebro, o colesterol é convertido em pregnenolona (Preg) a partir do colesterol pela enzima de clivagem da cadeia lateral (P450_{scc}) na mitocôndria, como em órgãos esteroidogênicos periféricos. Em seguida, a Preg é metabolizada no retículo endoplasmático liso e convertida em progesterona, alopregnanolona (Alop), deidroepiandrosterona (DHEA) ou E2 (Sierra et al., 2003). Quando sintetizado *de novo* no tecido cerebral, E2, agora um neuroesteróide, pode alcançar altas concentrações e agir por mecanismos não genômicos rápidos que envolvem receptores de membrana E2 específicos (GPER).

Figura 1: Síntese de hormônios esteroides a partir do seu precursor, colesterol.



Fonte: Autor.

2.2 Receptores de Estrogênio

O uso de camundongos nocaute e ligantes seletivos têm servido como importante ferramenta no estudo dos subtipos de ERs, logo levando a uma melhor compreensão destes receptores (Österlund, 2009). Os receptores intracelulares clássicos, ER α e ER β , contribuem para os mecanismos que promovem o funcionamento neuronal por meio do estrogênio, sinalizando e desempenhando

um papel igualmente importante na mediação da neuroproteção por este hormônio (Zhao and Brinton, 2007).

Sendo assim, os receptores nucleares ER α e ER β , modulam a transcrição de vários genes. Ambos são considerados receptores clássicos de estrogênio e são expressos em diferentes tecidos. O ER α predomina nos tecidos reprodutivos (ovário, útero), além de estarem presentes em mamas, rins, ossos, tecido adiposo e fígado (Birzniece et al 2006; Osterlund 2008). É associado aos efeitos feminilizantes estrogênicos e, o gene que codifica para este ER está localizado no cromossomo 6. Os ER β estão presentes nos ovários, no sistema nervoso central, sistema cardiovascular, pulmões, órgãos sexuais masculinos, próstata, cólon, rins e no sistema imune. O gene que codifica para este ER está localizado no cromossomo 14. Esses receptores nucleares estão presentes principalmente no citosol e quando ligados à molécula dos estrogênios se dimerizam e translocam-se para o núcleo. A resposta transcricional dessa sinalização ocorre devido a ligação deste dímero em sequências específicas do genoma denominadas Elementos Responsivos a Estrogênio (EREs). Porém, sabe-se que os estrogênios possuem efeitos genômicos via outros elementos responsivos como AP-1 (Activator Protein-1) e CREB (cAMP response element-binding protein), entre outros fatores de transcrição (Edward, 2005).

Em adição às alterações na maquinaria de transcrição nuclear mediada pelos estrogênios, essas moléculas possuem efeitos fisiológicos rápidos e não genômicos (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007; Fu and Simoncini, 2007). Os efeitos não genômicos mediados pelos estrogênios possuem diferentes candidatos como receptores. Entre eles se destacam os receptores ER α e ER β , porém ancorados juntamente com complexos proteicos à membrana plasmática, e receptores inicialmente descritos como ER-X, Gq-mER e GPR30 capazes de ativar vias intracelulares independentes de transcrição nuclear. Foi demonstrado que o E2 é capaz de modular a resposta de receptor ionotrópico de glutamato por ação primária em outras proteínas, como por exemplo, canais de potássio retificadores de influxo (GIRK). A ativação desses canais leva a uma intensa hiperpolarização neuronal e o E2 tem a capacidade de modular negativamente essa resposta (Micevych and Kelly, 2012). Outra via de ativação da resposta não genômica por estrogênios ocorre, por meio da geração de segundos mensageiros e ativação de receptor acoplado à proteína G.

O receptor GPR30, foi caracterizado ainda nos anos 1990 por diferentes grupos de pesquisa (O'Dowd et al., 1998; Camerci et al., 1997; Owman et al., 1996) e foi recentemente renomeado pela IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) como GPER 1 (Filardo et al., 2007).

2.3 GPER 1 – Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

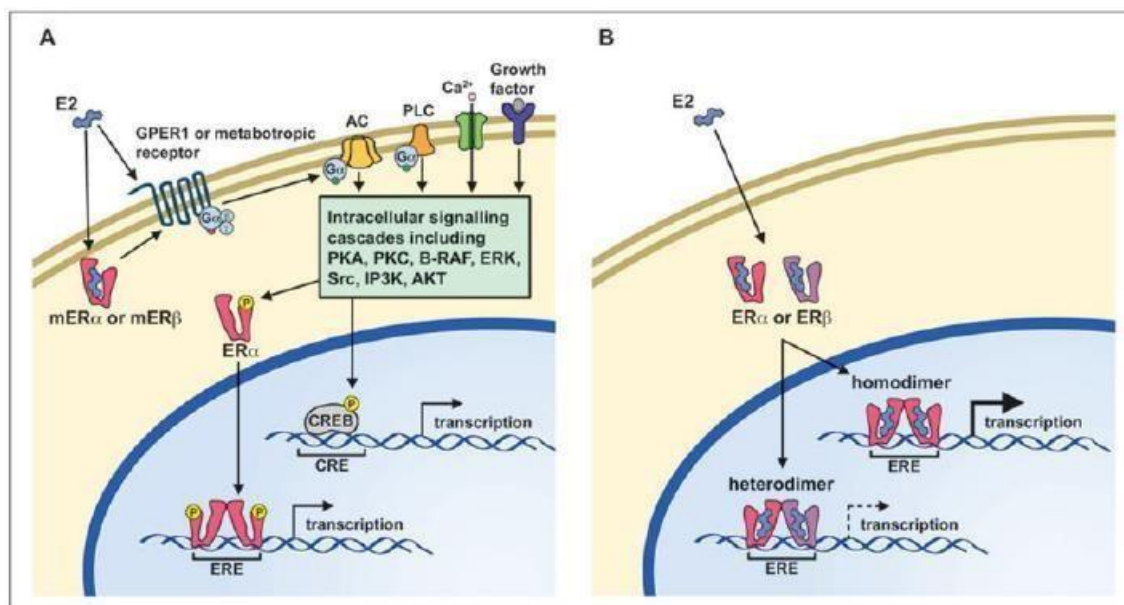
2.3.1 Caracterização inicial de GPER 1

Na década de 1990, um receptor acoplado à proteína G (GPCR) órfão, de alta afinidade com E2 e que possuía a capacidade de iniciar rápida sinalização em resposta a esse mesmo ligante da membrana plasmática, foi identificado inicialmente nas células de câncer de mama SKBR3. Este receptor, GPR30, agora chamado GPER1 pode ativar várias cascatas de transdução de sinal em resposta ao E2 (Thomas et al., 2005; Hadjimarkou and Vasudevan, 2018). O GPER 1 é um tipo de receptor de membrana com sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G as quais ativam uma variada gama de cascatas intracelulares (Figura 2). Esse receptor está ligado ao complexo heterotrimérico da proteína G composto pelas subunidades α , β e γ . Evidências apontam que o GPER está ligado tanto à proteína G_i/o quanto à G_s (Cheng et al., 2014). Com a ligação do hormônio, ocorre uma mudança conformacional no receptor, o que possibilita o desacoplamento da subunidade G_α do complexo $G\beta\gamma$. Os GPCRs são divididos em quatro famílias de acordo com o subtipo de G_α presente: *Gas*, *Gai*, *Gaq/11*, *Gα12/13*. *Gas* ativa adenilil ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc), um importante segundo mensageiro celular, que ativa a proteína cinase A (PKA). *Gai*, por outro lado, diminui os níveis de AMPc por inibir a atividade da adenilil ciclase. *Gaq/11* estimula fosfolipase $C\beta$ (PLC β) e promove a produção de outros importantes segundos mensageiros como o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). *Gα12/13* é responsável por controlar a atividade de proteínas Rho (Sladek and Song; 2012).

Segundo Filardo et al. (2000) o GPER é necessário para ativação induzida por E2 de Erk-1 e Erk-2 em células de câncer de mama. Outros estudos mostraram o envolvimento de GPER em ações de E2 em outros tipos de célula. Como macrófagos, em que GPER medeia a produção de fator de crescimento nervoso, como resposta ao E2 (Kanda and Watanabe, 2003a) e queratinócitos, em que o GPER medeia a

indução da expressão de proliferação celular induzida por Bcl-2 e E2 (Kanda and Watanabe, 2003b, 2004).

Figura 2: Modelo exemplificando as diferentes formas de atuação do estradiol (E2).



(A) Via de sinalização rápida do E2 através do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) e dos receptores de membrana ativados por estradiol (mER α ou mER β), essa sinalização rápida é dependente de diferentes cascatas intracelulares que levam a alterações fisiológicas rápidas ou levam à fosforilação do receptor de estrogênio do tipo alfa (ER α) e do fator de transcrição CREB. (B) A via de sinalização clássica ou genômica, na qual a ligação dos estrógenos aos ER α ou ER β ocorre no citoplasma ou no núcleo celular, levando a formação de um complexo homo ou heterodímero o qual se liga no elemento responsivo ao estrogênio (ERE) dentro do DNA (Bean et al.;2014)

2.3.2 GPER 1 e seus ligantes

Os receptores de estrogênios clássicos apresentam uma forte afinidade para a molécula 17- β estradiol, encontrado no organismo, em comparação com seu isômero 17 α -estradiol. Por meio de testes de ligação competitiva apresentaram similarmente, que o 17 α -estradiol não pode ligar-se ao receptor GPER 1. Outras formas fisiológicas de estrogênios, estrona e estriol, assim como outros esteróides, incluindo cortisol, progesterona e testosterona, não se ligam ao GPER 1 (Thomas et al., 2006).

Estudos comprovaram que o tamoxifeno, conhecido como um modulador seletivo de receptor de estrogênio (SERM), e ICI182,780 ligam-se de forma significativa ao GPER 1, porém, ao contrário das propriedades antagonistas que esses

compostos transmitem com respeito aos receptores de estrogênios clássicos, ambos os compostos servem como agonistas de GPER 1 (Revankar et al, 2005; Filardo et al, 2000). Como efeito mediado pela ligação tamoxifeno-GPER 1, ocorre um aumento da incidência de hiperplasia do endométrio em pacientes com câncer de mama tratadas com esse medicamento, o qual é usualmente administrado na prática clínica (Smith et al, 2007; Senkus-Konefka et al, 2004).

Um composto não esteróide, foi identificado por meio de uma combinação de triagem virtual e biomolecular para um ligante específico de GPER 1 e denominado de G-1 (Bologa et al., 2006). Pesquisas mostraram uma afinidade de ligação de G-1 com GPER de cerca de 11 nM, em comparação com 6 nM para o E2. Nenhuma ligação significativa de G-1 em concentrações de até 1 μ M pôde ser demonstrada para ER α ou ER β . A caracterização da função de G-1 apresentou uma ativação de GPER 1 seguida da mobilização de cálcio intracelular e ativação da fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K). Desde então, G-1 tem sido utilizado em muitos estudos realizados para investigação do verdadeiro papel de GPER 1 em numerosos sistemas e em estudos com células cancerosas. Há pouco tempo, foi identificado o antagonista para o receptor GPER 1, G15, o que possibilitou ampliar o conhecimento das principais funções do GPER 1 nos sistemas reprodutivo e nervoso (Dennis et al., 2009). Em seguida a essa descoberta, outro antagonista que possui menor atividade com o receptor ER α e efeitos similares ao G-15 para GPER 1 foi também identificado e nomeado G-36 (Dennis et al., 2011).

2.3.3 GPER 1, Localização e Distribuição

Muitas pesquisas, aqui comentadas, propõem a caracterização da sinalização mediada por GPER 1 em culturas celulares. O GPER 1 tem sido considerado um receptor de membrana por muitos estudos, embora sua localização na célula ainda seja discutida (Funakoshi et al., 2006). Os primeiros trabalhos demonstraram a presença do receptor na membrana plasmática em preparações *in vitro* de membrana. Contudo, hoje se sabe também que a localização celular de GPER 1 pode ser também intracelular, principalmente no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (Otto et al., 2008; Revankar et al., 2005).

A expressão do receptor GPER 1 foi identificada em diferentes tipos celulares como endotélio de pequenas artérias, em diversos tecidos como coração, rins, peritônio e trato genital, células de músculo liso e pericitos no cérebro, células principais gástricas no estômago e em células cromafins da medula das glândulas adrenais (Isensee et al., 2009). No sistema nervoso central foi identificado em subpopulações neuronais na camada II do córtex bem como no giro denteado, em populações de células do lobo intermediário e lobo anterior da hipófise (Isensee et al., 2009). A expressão do receptor GPER 1 (proteína e o mRNA), também foi encontrada, em roedores machos e fêmeas, em diversos locais do sistema nervoso central e periférico, incluindo o córtex, hipocampo, hipotálamo, núcleos específicos da ponte, núcleo trigeminal, cerebelo, na medula espinhal e no gânglio dorsal da medula (Brailoiu et al, 2007; Dun et al, 2009 ; Hazell et al, 2009). Estudos dessa expressão de GPER1, utilizaram a estratégia de co-expressão do gene para o receptor juntamente com o gene repórter lacZ em roedores machos e fêmeas.

Outros estudos ainda, realizados por meio da técnica de imunohistoquímica indicaram a expressão do receptor em diferentes áreas do prosencéfalo como na formação hipocampal (CA1-CA3), diferentes áreas do córtex, expressão pronunciada no hipotálamo (área pré óptica, núcleos supraquiasmático, PVN, SON, núcleo arqueado e ventromedial), no mesencéfalo (substância negra), núcleos pontinos e *locus coeruleus*, e algumas regiões da medula espinhal. Em complemento a estes resultados, outros estudos também apontaram a presença de GPER 1 na hipófise (lóbulos anterior, intermediário e neural), nas células cromafins da glândula adrenal, células musculares lisas da pelve renal e densa marcação nas células da granulosa dos ovários em detecção no corpo lúteo (Hazell et al., 2009).

2.4 Memória

A memória pode ser definida como a capacidade que o ser humano e os animais têm de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas quando requeridas. Dentro desta ampla capacidade, são vários os processos de memória: aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo, 2011). O primeiro deles é o processo de aquisição de informações, também chamado de aprendizado e novos aprendizados podem, ou não, ser armazenados a longo prazo, de forma que posteriormente possam ser utilizados, quando o

organismo necessitar. A qual pode durar por tempos curtos ou ainda pode ser transformada em retenção de longa duração pelo processo de consolidação da memória. O curso do tempo de consolidação da memória parece variar amplamente dependendo dos parâmetros das tarefas de aprendizado e das estruturas encefálicas envolvidas (Medina et al., 2008). E então a evocação, também chamada de recordação, lembrança ou recuperação (Izquierdo, 2011). Ou seja, apenas se “grava” em nossa memória algo que aprendemos, assim, como poderemos somente recordar de algo, quando aquilo efetivamente for aprendido.

Logo, a memória pode ser considerada como uma das principais particularidades biológicas comuns entre os seres vivos humanos e não humanos, contudo, o conteúdo existente da memória irá depender unicamente da experiência de cada indivíduo. Assim sendo, no caso dos humanos, o acervo de memórias de cada um, em conjunto com as características genéticas e comportamentais, permitirá a formação da estrutura essencial para a construção de uma personalidade própria.

2.4.1 Tipos de memória

São vários também os tipos e subtipos de memória, definidos com relação a tempo de duração ou a natureza de seu conteúdo (Izquierdo, 2011). Levando em consideração o tempo de retenção, pode-se qualificar a memória “ultra-rápida” (que dura por um curtíssimo período de tempo), a memória de curta duração e a de longa duração. Com relação à natureza podem ser classificadas em memórias implícitas (não-declarativa), explícitas (declarativa) e de trabalho.

A memória implícita é a memória dos hábitos, procedimentos e regras, a memória de representação perceptual, a aprendizagem associativa e não associativa, formas de memória que não podem ser descritas facilmente com palavras e sua avaliação geralmente é por meio de demonstração. Na pesquisa com animais não-humanos, a classificação previamente mencionada pode ser difícil de aplicar, principalmente pela forma restrita que a memória pode ser avaliada em outras espécies. A figura 3 mostra essa classificação segundo a sua natureza associativa ou não associativa e alguns exemplos de modelos comportamentais em roedores para sua avaliação.

Ao contrário, a memória explícita pode ser descrita com palavras, e consiste em um subtipo chamado episódico (a memória dos fatos que ocorrem ao longo do tempo), um chamado semântico (a memória dos conceitos atemporais) e um subtipo espacial (a memória das informações espaciais). A memória espacial envolve a habilidade de lembrar o arranjo espacial de um ambiente por meio da formação de um mapa espacial no encéfalo. Sendo assim, a memória espacial permite saber a localização de objetos, de si mesmo, além de utilizar-se destas informações para possibilitar o movimento de um lugar para outro. Finalmente, a memória de trabalho, que nos serve para utilização rápida no raciocínio e no planejamento do comportamento (Lent, 2001; Bierzniece et al., 2006; Bear et al., 2017).

Uma das características mais importantes das memórias declarativas, especificamente no caso dos humanos, é que podem ser verbalizadas. No caso de outros animais onde a informação não pode ser verbalizada, existem diferentes metodologias para avaliar a existência da memória, por meio da observação do comportamental do animal. Como exemplo, temos modelos de memória episódica em ratos (Babb and Crystal, 2006; Crystal, 2009). Logo, podemos dizer que as memórias declarativas são evocadas de forma consciente, ou seja, podemos centrar nossa atenção para recuperá-las.

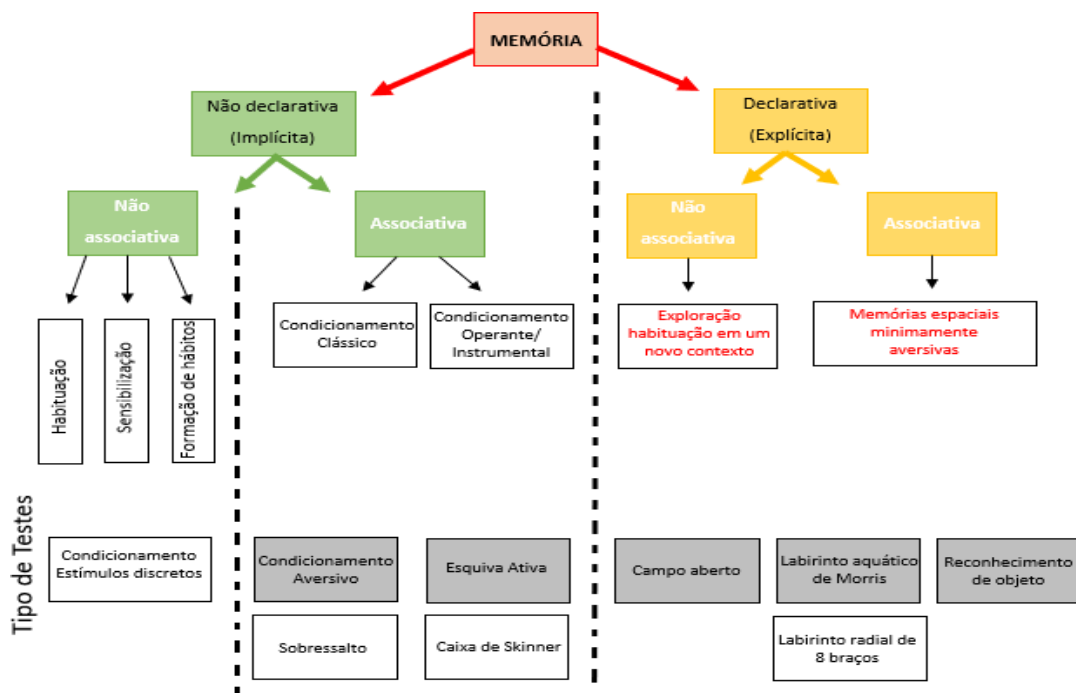
Sendo assim, a memória é uma das funções que fazem parte do termo “cognição”, em que se representa a totalidade de processamento das informações. Ou seja, a cognição é abrangente e complexa, além da memória, outras funções como atenção, padrão de reconhecimento, aprendizado, processamento de linguagem, resolução de problemas, pensamento abstrato, e ainda funcionamento intelectual mais complexo, bem como habilidades psicomotoras. A memória é considerada um aspecto crítico da cognição, caracterizada por inúmeros processos em diferentes regiões encefálicas (Sherwin and Henry, 2008).

Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos, e atualmente supõe-se que não exista um único centro de memória (Medina et al., 2008). As informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais, cada uma de acordo com a sua função: as memórias motoras no córtex motor, memórias visuais no córtex visual, e assim sucessivamente. Dessas regiões, elas podem ser mobilizadas como memória de trabalho pelas áreas pré-frontais, em ligação com áreas do córtex parietal e occipital temporal. Além de que, as memórias explícitas podem ser consolidadas no hipocampo e áreas corticais adjacentes do lobo temporal medial, em conexão com núcleos do tálamo e do

hipotálamo. Alguns estudos apontaram que, em hipocampo de ratos, células piramidais respondem quando o rato está em um local particular no ambiente. Células hipocampais de primatas parecem representar campos visuais espaciais, onde neurônios respondem seletivamente conforme o animal vê uma determinada região do meio. Logo, sugere-se o envolvimento do hipocampo com a memória das informações espaciais (Birzniece et al., 2006). Desta forma, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, principalmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdalóide do lobo temporal (Lent, 2001). O sistema límbico do encéfalo (hipocampo, amígdala, septo, córtex entorrinal) está fortemente envolvido na percepção de emoções e análise, sugerindo, portanto, uma poderosa relação entre situações emocionais e memórias mais duradouras (Birzniece et al., 2006).

Diferentes regiões do encéfalo estão envolvidas no processamento de memória, provavelmente lidando com os diferentes tipos de informação do novo material aprendido, muitos acreditam não haver razão para se visualizar a consolidação de memórias como um único evento dependendo de uma determinada região cerebral.

Figura 3: Classificação da memória segundo a natureza associativa ou não associativa.



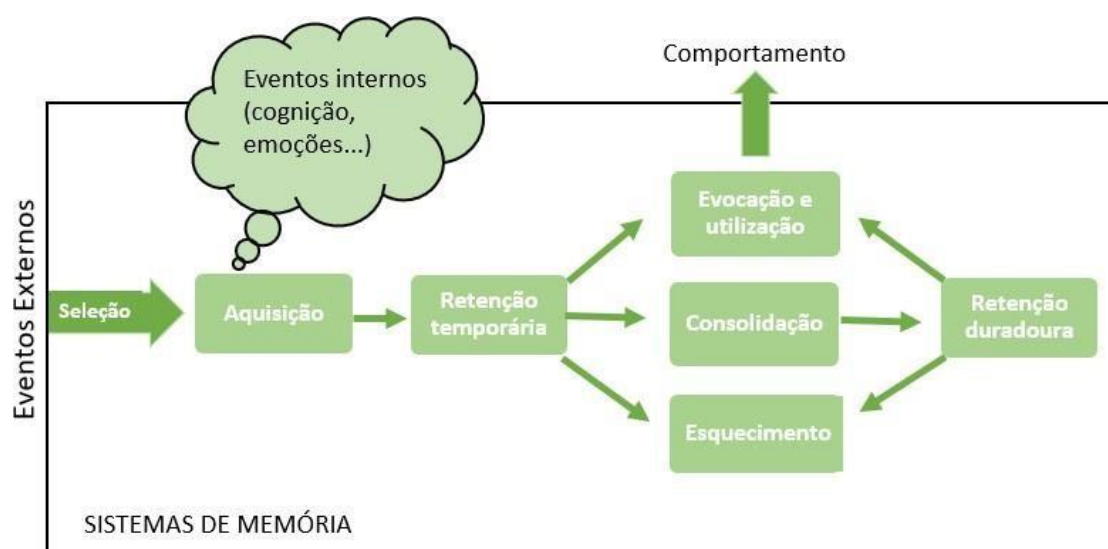
(Adaptado de Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research).

Neste trabalho, realizamos tarefas comportamentais de Esquiva Inibitória, promovendo uma memória de condicionamento aversivo e a de Reconhecimento de Objeto, de caráter neutro e exploratório.

2.4.2 Fases da memória

A memória passará por três fases iniciais que podem ser divididas em aquisição, consolidação/armazenamento e evocação (Izquierdo, 2011), como podemos observar na figura 4.

Figura 4 - Processos de memória – A aquisição de informações é seguida de retenção, que pode ser temporária ou ser consolidada.



Estas informações podem ainda ser lembradas e expressas no comportamento, ou esquecidas (adaptado de Lent, 2001; Izquierdo, 2011).

Além das fases que já conhecemos, entre a formação e evocação da memória, existem ainda outros caminhos que podem seguir a memória após seu armazenamento. A memória previamente consolidada pode passar por um processo

de esquecimento natural, em que a informação não estará mais disponível para a recuperação. Em contrapartida, como produto de um novo aprendizado, a memória pode ser extinta. A extinção não significa esquecimento, mas sim um bloqueio da memória original (Thompson, 1976; Bouton, 1993).

Então, as evocações geralmente curtas podem conduzir a reconsolidação, caracterizada pela desestabilização de uma memória previamente consolidada e posterior estabilização (Dudai and Eisenberg, 2004). Em paralelo à extinção, qualquer procedimento realizado durante a reconsolidação, vai interferir diretamente na característica original da memória (McGaugh, 2004).

A primeira fase, a **aquisição**, refere-se ao intervalo de tempo da percepção de estímulos provenientes de uma experiência até o momento em que esses estímulos são codificados em uma forma de memória em particular. Um aspecto decisivo na construção da memória durante essa fase é o nível de atenção do indivíduo (Hamann, 2001). Quanto maior a atenção durante a aquisição, maior as chances desse evento ser armazenado permanentemente na memória (Kentros et al., 2004).

A **consolidação** é o processo pelo qual uma informação adquirida se torna estável para ser armazenada como uma memória de longa duração. Esse processo é vulnerável a interferências tanto farmacológicas como comportamentais (Serota, 1971; Mah et al., 1972; Glaser et al., 2010). De forma complementar, a consolidação pode ser modulada por fatores endógenos ou neurohormonais do animal, como o nível de estresse (McGaugh, 2006; Roozendaal et al., 2009).

O processo de consolidação e a formação da memória de longa duração estão diretamente relacionados, pois uma etapa depende da outra. Na consolidação ocorre uma série de processos bioquímicos e moleculares em distintas estruturas encefálicas associadas com o armazenamento da memória, e estima-se que este processo ocorra por cerca de 6h. Entretanto, esses intervalos de tempos sofrem algumas modificações dependendo da estrutura onde acontecem (Izquierdo et al., 1997). O tempo decorrido entre a aquisição e estabilização de uma memória é chamado de “Janela de Consolidação”, sendo o momento mais propício para a realização do maior número possível de análises sobre os aspectos de formação da memória (Wallenstein et al., 2002; Berlese et al., 2005; Fulton et al., 2005; Klann and Sweatt, 2008).

Logo, a fase da **evocação**, que se trata de um processo responsável por lembrar memórias que foram consolidadas. Além disso, a evocação de memórias é um mecanismo sujeito a distorções, sendo mais eficiente na presença de “dicas” (Kandel et al., 2014).

2.5 Consolidação X Reconsolidação da memória

Logo após o aprendizado, as memórias são instáveis, ou seja, suscetíveis a interferências e traumas, mas depois são estabilizadas, de modo que não são interrompidas pelos mesmos eventos interferentes. A visão atual da consolidação é que as informações recém adquiridas ativam cascatas de sinalização intracelular, resultando em modificações pós-traducionais (modificação de proteínas após a sua biossíntese), modulação da expressão gênica e síntese de novas proteínas que alteram a eficácia sináptica, necessária para estabilizar as memórias (McGaugh, 2000; Dudai, 2004).

O aumento do interesse pelos mecanismos de formação de memórias, se deu a partir da descoberta do processo eletrofisiológico conhecido como “Potenciação de Longa Duração” (LTP, sigla dos termos em inglês, *Long-term potentiation*). A LTP consiste no aumento persistente da resposta de neurônios à curta estimulação repetida de um axônio ou um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (Napolitano et al., 1999). Por meio dessa estimulação, também pode ocorrer uma diminuição no limiar de excitabilidade da célula, permitindo que seja ativada com mais facilidade. Um processo similar, mas inibitório, também foi descoberto, a “Depressão de Longa Duração” ou LTD (sigla dos termos em inglês, *Long-term depression*). Em comparação com a LTP, a LTD pode inibir uma resposta neuronal (Stanton, 1996). Um fator em comum entre LTP e LTD era que podiam ser medidas por horas, dias ou semanas. Logo, a duração dessas mudanças levou a hipótese de que existiria uma forte relação entre LTP-LTD e as memórias de longa duração (Teyler and Discenna, 1984).

Uma das ferramentas mais utilizadas historicamente para o estudo da memória é a farmacologia. A utilização de estratégias farmacológicas após o treino permitiu estudar a influência de certos compostos no processo de consolidação da memória de uma tarefa (Izquierdo and McGaugh, 2000). Como resultado desse método, hoje conhecemos

uma boa parte das diferentes substâncias neurotransmissoras, receptores, cascatas metabólicas e sistemas moduladores que atuam na consolidação.

A consolidação sináptica envolve diferentes eventos moleculares, como a ativação de várias cascatas de sinalização em específicas regiões cerebrais. O mais estudado no processo de consolidação da memória é a ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo N- metil- D- aspartato (NMDA), que permite o influxo de Ca^{++} na célula (Collingridge et al., 1992). O receptor NMDA é complexo e extremamente regulado por co-agonistas que permitem seu normal funcionamento além da ligação do seu agonista direto glutamato ou aspartato (Cotman et al., 1988). O influxo de cálcio pelo receptor NMDA consegue modular as sinalizações intracelulares que buscam ativar cinases dependentes de cálcio, dentre elas, a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) e a cálcio-calmodulina cinase tipo II (CAMK II) (Rosenegger and Lukowiak, 2010; Wayman et al., 2011). A ativação destas cascatas no hipocampo pode ser iniciada tanto pela ativação de receptores ionotrópicos, incluindo AMPA e NMDA, quanto de receptores metabotrópicos, e receptores de BDNF e para monoaminas. A ativação destas cascatas é seguida pelo recrutamento de sistemas de segundos mensageiros e ativação de diferentes proteínas quinases e fosfatases (Izquierdo et al., 2006). O que leva à ativação de transcrição e tradução e, em última caso, à síntese de proteínas necessárias para mudanças funcionais e estruturais (Medina et al., 2008). Sendo assim, durante a formação da memória, acredita-se que a síntese proteica seja necessária para transformar a informação recentemente aprendida em modificações sinápticas estáveis.

Além disso, a nível nuclear, a fosforilação pode ser de proteínas que fazem parte da síntese proteica, como a proteína CREB. Então, a consolidação da memória é dependente de síntese proteica e sua inibição pode bloquear a consolidação de novas memórias (Stevens, 1994; O'Connell et al., 2000; Kida et al., 2002).

Em 2000, Nader e colaboradores questionaram novamente experimentos que tiveram como alvo o papel conhecido da amígdala na consolidação sináptica da associação pavloviana de um efeito sonoro, seguida por um choque (Falls et al., 1992; Duvarci et al., 2006), observando que apenas um lembrete sonoro apresentado muito tempo após a consolidação estar completa reativou a suscetibilidade temporária da memória. Desta forma então, ampliaram a visão do conceito de reconsolidação, no qual as memórias previamente consolidadas, quando então recuperadas, seriam novamente suscetíveis à amnésia.

Sendo assim, o processo pelo qual uma memória lábil é recuperada ou reativada, que se restabelece ao longo do tempo, passando por uma fase de reestabilização dependente da síntese de proteínas, é conhecido como reconsolidação de memória (Nader et al., 2000; Sara, 2000a).

Foram propostas no meio científico duas hipóteses, não excludente uma da outra, para explicar a função da reconsolidação. A primeira afirma que, a memória torna-se instável já que, por meio da reconsolidação, novas informações são adicionadas aos antecedentes do passado, permitindo desta forma que a memória seja atualizada (Lewis, 1979; Sara, 2000a; Dudai, 2004). A outra, propõe que a memória se reconsolide para se tornar mais resistente e duradoura (Sara, 2000b; Alberini 2011).

Logo, a aprendizagem de um evento relevante leva a uma memória duradoura por meio de mudanças celulares e de circuitos moleculares que evoluem ao longo do tempo (semanas em ratos). Durante os primeiros dias, a memória é interrompida por processos que interferem na síntese de diversas proteínas; contudo, após esse tempo, a memória torna-se resistente aos mesmos tratamentos amnésicos. Isso pode ser significar que a consolidação foi concluída. Entretanto, a memória ainda permanece por algum tempo em um período sensível, o qual a memória pode voltar a um estado lábil se reativada, como por meio de recuperações ou retreinamento. E enquanto a memória está neste estado frágil, sua retenção pode ser modulada. Com o passar do tempo, um gradiente de estabilização da memória se estabelece, junto com o aumento da resistência à interferência pós-recuperação (Sara, 2000b; Alberini 2011).

Uma importante questão sobre a reconsolidação, é saber quando a reativação, induzida geralmente pela apresentação do estímulo condicionado (EC), possibilitaria que a memória fosse introduzida de fato no processo de reconsolidação e não em um de extinção (Inda et al., 2011). Essa diferença, nos permite saber quando um tratamento farmacológico pode estar afetando o traço de memória original ou um novo traço paralelo como produto da extinção. Diferentes estudos comportamentais, indicaram que o tempo de reativação pode ser essencial para determinar o caminho que a memória irá seguir (Perez-Cuesta and Maldonado, 2009; Schiller and Johansen, 2009). Pequenas reativações ativam mecanismos de degradação proteica associados com o processo chamado de “labilização” que permitiria a memória voltar para um estado lábil e suscetível a modificações, precisando posteriormente uma estabilização

que seria a reconsolidação efetivamente, como podemos observar na figura 5 (Bevilaqua et al., 2008).

Figura 5 – Esquema do estado ativo e inativo da memória – As memórias são formadas rapidamente e são permanentes.



As memórias podem ser ativas, quando recém formadas ou quando reativadas ou inativas, quando armazenadas no cérebro. As memórias ativas são maleáveis e suscetíveis a perturbações, enquanto as inativas são fixas e resistentes a tratamentos amnésicos (Adaptada de Lewis, 1979).

Uma abordagem experimental bastante útil para o estudo da biologia da memória é a farmacologia comportamental, que vem buscando decifrar como os sistemas neurais participam na sua modulação. A infusão de substâncias com determinadas ações, em regiões específicas do cérebro, tem revelado as estruturas cerebrais envolvidas nos diferentes tipos de memória, assim como os sistemas de neurotransmissores envolvidos na consolidação da memória. Diferentes etapas são necessárias para a fixação da memória, e durante um certo tempo após o aprendizado a memória permanece vulnerável a interferências. A maior parte deste processo de consolidação se completa nas primeiras horas após o aprendizado. No entanto, o processo de estabilização da informação armazenada se estende por um prazo mais longo e envolve alterações contínuas na própria organização da memória. Toda vez que lembramos de algo estamos reconstruindo e adicionando alguma informação àquele arquivo de memória (Dalmaz et al., 2004).

2.6 Estrogênio e sua interação na memória

O E2 está envolvido em diversas funções de neuroproteção, como a manutenção da homeostasia da barreira hematoencefálica, proteção cerebral contra acidentes vasculares e controle da neuroinflamação. Além disso, o E2 promove, também, o crescimento de sinapses glutamatérgicas e pode influenciar a função mitocondrial. Essas ações são fundamentais para a manutenção da função cognitiva, memória e proteção contra danos celulares associados ao estresse cognitivo (Foster, 2016; Jones et. al., 2009). Mesmo a expressão do GPER (proteína e o mRNA) sendo encontrada, em roedores machos e fêmeas, em diversos locais do sistema nervoso central e periférico, incluindo o córtex, hipocampo, hipotálamo, núcleos específicos da ponte, núcleo trigeminal, cerebelo, na medula espinhal e no gânglio dorsal da medula (Brailoiu et al, 2007; Dun et al, 2009 ; Hazell et al, 2009), ainda vem sendo pouco explorada e compreendida em roedores machos e muito bem descrita com relação às fêmeas. O estradiol também é responsável por proteger o encéfalo de danos patológicos e déficit de memória. Por exemplo, foi demonstrado que o agonista G-1, atuando no receptor GPER 1, foi capaz de proteger células hipocámpais de neurotoxicidade induzida por glutamato (Gingerich et al., 2010).

A literatura já se encontra bem consolidada, com relação a importância dos estrogênios na memória. Ainda assim, cresce o interesse em caracterizar as vias responsáveis pela influência hormonal na mesma, principalmente a via relacionada a GPER 1. Porém, em pesquisa recente na base de dados PUBMED (Julho/2020), observa-se que poucos estudos caracterizam o papel do GPER1 na formação da memória. Logo, busca-se destacar a compreensão atual de como a sinalização de E2 pode afetar a função cognitiva dependente do hipocampo (Bean, 2014).

Os níveis relativos e distribuições subcelulares de ER α , ER β e GPER1, encontrados em todo o sistema nervoso, podem variar entre as regiões do cérebro (Brailoiu et. al., 2007; Mitra et al., 2003; Mitterling et. al., 2010). No hipocampo de humanos e de ratos, os níveis de ER β são bem maiores que os níveis de ER α (Foster; 2012) e ER α é mais provável de ser localizado no núcleo (Mitra et al., 2003; Mitterling et al., 2010). Já que há diferenças, na estrutura e na distribuição subcelular, sugere-

se que os receptores de estrogênio podem ter diferentes ações biológicas e efeitos diferenciais na cognição.

O hipocampo é uma estrutura límbica essencial para a formação de memória espacial, contextual e relacional e está envolvido também com o estresse (McEwen and Milner, 2007). Curiosamente, o hipocampo mostra um grau notável de plasticidade em resposta a hormônios esteróides, como estrógenos e glicocorticóides. Sendo assim, em roedores o estrogênio além da função de hormônio sexual, tem uma segunda ação fisiológica aguda que está logicamente e experimentalmente relacionada à codificação da memória: facilitando notavelmente a LTP (Foy et al., 1999; Kramar et al., 2009a). Diversas manipulações que promovem LTP são relatadas por melhorar a memória em modelos animais de indivíduos com déficits de memória. A influência de E2 no efeito de potenciação é, portanto, um fator provável nas ações já conhecidas de melhora da memória na presença desse hormônio (Harvey et al., 2005; Porrino et al., 2005).

Numerosos estudos realizados demonstraram o papel do E2 como um regulador potente de eventos celulares no hipocampo, essencial para a plasticidade sináptica e a memória. Aplicações sistêmicas, intracranianas ou *in vitro* de E2 aumentam a expressão hipocampal de proteínas sinápticas como sinaptofisina, spinofilina, sintaxina e PSD-95 (proteína da densidade pós-sináptica-95) (Brake et al., 2001; Sato et al., 2007). Além disso, neuroendocrinologistas comportamentais descobriram que E2 pode impactar muito rapidamente a função hipocampal (Fernandez et al., 2008; Zhao and Brinton, 2007) e, logo, a natureza de tarefas de aprendizagem com uma única sessão de aprendizado, torna-as particularmente úteis para a identificação dos mecanismos moleculares subjacentes à regulação hormonal para a consolidação de memória.

Cada vez mais o reconhecimento de objetos (RO) e a localização de objetos (LO) têm sido usados como tarefas para investigar o papel de E2 na regulação da formação da memória hipocampal em roedores. Utilizando assim tarefas de aprendizagem, que são ideais para o estudo e comprovação de efeitos agudos dos tratamentos hormonais em diferentes fases de memória, pois podem ser administradas durante a aquisição (pré-treinamento), consolidação (pós-treinamento) ou recuperação (pré-teste). Através desses estudos, foi demonstrada a importância do E2 no processo de formação de memória em ratos e camundongos, porém, esclarecendo que mais estudos examinando a regulação hormonal de outras regiões

cerebrais, devem ser realizados para obter uma compreensão mais completa de como os hormônios regulam a formação de memória nas tarefas de RO e LO. E até mesmo com relação às diferenças dessa influência em machos e fêmeas (Tuscher et al., 2015). Assim sendo, outra área importante na qual as tarefas de memória de objetos podem ser úteis é na compreensão da etiologia das diferenças sexuais na função cognitiva. Já que as mulheres são significativamente mais propensas do que homens desenvolverem declínio de memória relacionado à idade, doença de Alzheimer, depressão, ansiedade e transtornos de humor.

Não se sabe a razão exata para a perda dos efeitos cognitivos de E2 com a idade avançada, as evidências sugerem que ela está vinculada a mudanças relacionadas à idade na expressão e sinalização dos receptores de estrogênio (Foster; 2012). Estudos genéticos apontam que animais idosos são menos responsivos que animais jovens e de meia-idade, com a transcrição de hipocampo que seria induzida por E2, reduzida (Aenlle and Foster; 2010). Surpreendentemente, a responsividade diminuída foi observada para genes que diminuem com o avanço da idade, incluindo alguns genes ligados à regulação transcricional, de crescimento, atividade sináptica e neuroproteção. Da mesma forma, a perda de ER α devido à privação prolongada de E2 (Zhang et al., 2009) ou em camundongos ER α KO (Suzuki et al., 2009) está ligada a uma perda de neuroproteção e sinaptogênese mediada por E2. Logo, os resultados sugerem que uma baixa na expressão de ER α pode contribuir para a diminuição da responsividade de E2.

Além disso, trabalhos posteriores observaram que o E2 regula a expressão de proteínas pré e pós-sinápticas no hipocampo de ratas fêmeas (Waters et al., 2009) e hipocampo de camundongos fêmeas (Li et al., 2004; Spencer et al., 2008). Portanto, em ratos, existe a capacidade do E2 de promover novas conexões sinápticas entre as células do hipocampo por meio de botões multissinápticos conectando diferentes neurônios (Yankova et al., 2001; McEwen et al., 2012). Desta forma, a expressão dos receptores intracelulares clássicos as ERs no hipocampo é dinâmica, sugerindo uma possível função na excitabilidade / atividade do hipocampo, de acordo com os níveis oscilantes de estrogênio no ciclo ovariano e o envelhecimento (Mitterling et al., 2010; McEwen et al., 2012).

Após a identificação do receptor acoplado à proteína G, o tratamento com seu agonista, G1 (Bologa et al., 2006), demonstrou aumento da expressão de PSD-95 no hipocampo de camundongos fêmeas, cerca 48 horas após o tratamento. Outro estudo também, usou o agonista de GPER1, o G1, para abordar o papel do GPER1 nos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e para demonstrar que o GPER1 pode mediar os efeitos do estrogênio no desempenho cognitivo (Hammond and Gibbs 2011), realizado em roedores fêmeas. Desta forma, alguns trabalhos também indicaram que a ativação do receptor GPER1 é suficiente para aumentar a memória de reconhecimento espacial em ratas ovariectomizadas (Howley et al., 2014). No estudo realizado por Kim e colaboradores (2016) foi demonstrado que a infusão de G1 imediatamente após o treino no hipocampo dorsal melhorou a memória de reconhecimento de objetos e a memória espacial em camundongos fêmeas ovariectomizadas, enquanto que o G15, antagonista do GPER prejudicou a memória, sugerindo que a ativação do GPER promove a formação da memória dependente do hipocampo.

Também, em um estudo realizado previamente por nosso grupo de pesquisa, em ratas com déficits de memória relacionados à ovariectomia e sobrecarga de ferro no cérebro, a administração sistêmica aguda de G1 imediatamente após o treino, melhorou a memória de localização de objetos e de esquivas inibitórias. Além disto, foi demonstrado que os efeitos melhoradores de G1, na memória de Esquiva Inibitória e Reconhecimento de Objeto, foram prevenidos pela inibição da proteína quinase A (PKA), sugerindo o envolvimento da via cAMP/PKA/CREB (Machado et al., 2019).

Esses achados, juntamente com perfis de expressão apresentados, sugerem uma interação complexa entre os vários receptores de estrogênio para coordenar atributos rápidos e sub crônicos de sinalização de estrogênio e plasticidade sináptica. Ainda, podemos destacar que há a necessidade de novos experimentos que busquem examinar os mecanismos de mediação das ações do GPER na consolidação e reconsolidação da memória no sexo masculino.

3 JUSTIFICATIVA

Na literatura, são conhecidos os efeitos de que E2 melhora a habilidade de memória, relacionada ao reconhecimento de objetos e de memória espacial em ratas através da ativação da via da ERK na região dorsal do hipocampo. Pesquisas com

receptores de E2 são realizadas, porém sem caracterizar de forma mais aprofundada e objetiva a importância do papel específico do GPER1 e principalmente relacionada aos efeitos em machos.

É demonstrado que a ativação do GPER1 no hipocampo melhora as habilidades de reconhecimento e de memória espacial. Porém, em pesquisa recente na base de dados PUBMED (julho/2020), observa-se que há poucos estudos caracterizando o papel do GPER1 na formação da memória e correlacionando principalmente, ao sexo masculino.

Desta forma, se faz importante desenvolver pesquisas que busquem comprovar se a ativação desse receptor de maneira exclusiva pode ser capaz de auxiliar na formação da memória em um modelo experimental, tratado com o agonista do GPER1, G-1, e o seu antagonista, G15, em ratos machos, sem os efeitos indesejáveis da ativação dos demais subtipos de receptores de estrogênio.

4 HIPOTÉSES

- 1) Ratos machos adultos possuem receptor de estrogênio acoplado à proteína G, necessário para a consolidação e reconsolidação da memória.
- 2) Receptores de estrogênio acoplados à proteína G (GPER1), podem ter papel importante para a consolidação da memória, o que poderá ser verificado através de abordagens farmacológicas com a administração sistêmica de seu agonista (G1) e antagonista (G15) em ratos machos *Wistar*.
- 3) Receptores de estrogênio acoplados à proteína G (GPER1), podem ter papel importante para a reconsolidação da memória, o que poderá ser verificado através da administração sistêmica do seu agonista (G1) em ratos machos *Wistar*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Compreender os efeitos fisiológicos da ativação do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1) durante o processo de consolidação e reconsolidação da memória da memória aversiva e de reconhecimento por intermédio do uso de agonistas e antagonistas seletivos desse receptor em ratos machos adultos.

5.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o papel do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1) na consolidação da memória, por meio de estratégias farmacológicas de utilização do agonista desse receptor (G1) e do antagonista do mesmo (G15), nas tarefas de reconhecimento de objetos e de esquiva inibitória.
- Investigar o perfil temporal da participação do receptor GPER1 sobre a consolidação da memória em ratos machos adultos, através da administração sistêmica do seu agonista G1 imediatamente, 3h ou 6h após o treino nas tarefas de reconhecimento de objetos e de esquiva inibitória.
- Estabelecer o papel do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1) na reconsolidação da memória, por meio da administração sistêmica do agonista desse receptor (G1), imediatamente após a reativação da sessão de teste na tarefa de esquivainibitória.

6 RESULTADOS

6.1 Artigo

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados conforme o manuscrito submetido no periódico *Neurobiology of Learning and Memory* no dia 10 de dezembro de 2020.

Neurobiology of Learning and Memory

BRIEF REPORT

The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) regulates recognition and aversively-motivated memory in male rats

Lariza Oliveira de Souza¹, Gustavo Dalto Barroso Machado¹, Sarah Luize Camargo Rodrigues¹, Maria Paula Arakaki Severo¹, Patrícia Molz¹, José Afonso Corrêa da Silva¹, Rafael Roesler^{2,3}, Nadja Schröder^{1,4*}

¹ *Department of Physiology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

² *Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

³ *Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁴ *National Institute of Science and Technology for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil*

* Corresponding author

Nadja Schröder (ORCID 0000-0002-4227-5702)

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500 – 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: +55 51 99139-4308

Email address: nadja_s@terra.com.br

ABSTRACT

It is well known that estrogens, particularly 17 β -estradiol (estradiol, E₂), regulate memory formation. E₂ acts through its classical intracellular receptors, estrogen receptors (ER) ER α and ER β , and a recently identified G protein-coupled estrogen receptor (GPER). Although the effects of E₂ on memory have been investigated, studies examining the effects of GPER stimulation are scarce. Selective GPER agonism was shown to improve memory in ovariectomized female rats, but little information is available regarding the effects of GPER stimulation on memory in males. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of the GPER agonist, G1, on consolidation and reconsolidation of object recognition and inhibitory avoidance memory in male rats. Animals received vehicle, G1 (15, 75, 150 μ g/kg; i.p.), or the GPER antagonist G15 (100 μ g/kg; i.p.) immediately after training, or G1 (150 μ g/kg; i.p.) 3 or 6 hours after training. To investigate reconsolidation, G1 was administered immediately after retention Test 1, performed 24 h after training, and rats were tested again 48 and 72 h after training. Results indicated that G1 administered immediately after training at the highest dose enhanced object recognition and inhibitory avoidance memory consolidation, while GPER blockade immediately after training impaired object recognition. No effects of GPER stimulation were found when G1 was administered 3 or 6 h after training or after Test 1. The present findings provide evidence that GPER is involved in the early stages of memory consolidation in both neutral and emotional memory tasks in healthy male adult rats.

Keywords: GPER; estrogens; memory; males; inhibitory avoidance; object recognition

1. Introduction

It is well known that estrogens, particularly 17β -estradiol (estradiol, E_2), regulate memory formation. E_2 promotes synapse formation as well as neurogenesis in the hippocampus and enhances memory for a number of tasks when given systemically or directly into the hippocampus in female ovariectomized rats and mice (Luine & Frankfurt, 2020; Sheppard, Choleris, & Galea, 2019). E_2 induces both rapid (likely non-genomic) and classical (likely genomic) actions to alter neuronal structure and function, through activation of multiple signaling pathways and changes in gene expression (Frick & Kim, 2018; Lai, Yu, Zhang, & Chen, 2016; Sheppard et al., 2019). For many years, the effects of estrogens on brain function were thought to be mediated by only two types of intracellular estrogen receptors (ERs), $ER\alpha$ and $ER\beta$ (Fugger, Foster, Gustafsson, & Rissman, 2000). In the 1990s, the gene for a novel, orphan seven-transmembrane G-protein coupled receptor (GPCR) was cloned (Carmeci, Thompson, Ring, Francke, & Weigel, 1997; Feng & Gregor, 1997; O'Dowd et al., 1998; Owman, Blay, Nilsson, & Lolait, 1996). Initially named G-protein coupled receptor 30 (GPR30), the newly identified receptor was later characterized as an estrogen receptor predominantly located on the cell membrane and designated G protein-coupled estrogen receptor (GPER) (Alexander et al., 2013; Funakoshi, Yanai, Shinoda, Kawano, & Mizukami, 2006).

The abundance and wide distribution of GPER in neuronal membranes in the mammalian central nervous system, including brain areas such as the dorsal hippocampus, make it ideally positioned to regulate learning and memory (Brailoiu et al., 2007; Waters et al., 2015). Research on the biological functions of GPER greatly benefited from the development of a selective agonist, G1 (Bologa et al., 2006), and an antagonist, G15 (Dennis et al., 2009).

G1 mimics the enhancing effects of E₂ on spine density and increases synaptic transmission in the dorsal hippocampus, in addition to facilitating spatial and object recognition memory in ovariectomized female rodents (Gabor, Lymer, Phan, & Choleris, 2015; Kim, Szinte, Boulware, & Frick, 2016; Kumar, Bean, Rani, Jackson, & Foster, 2015; Kumar & Foster, 2020; Lymer, Robinson, Winters, & Choleris, 2017). G1 also ameliorates deficits in experimental models of memory impairment associated with neurodegeneration in female mice and rats (Kubota, Matsumoto, & Kirino, 2016; Machado et al., 2019).

The role of GPER in regulating brain function in males is much less understood. The density of GPER in hippocampal synapses is similar in male and female rats, however no evident contribution of GPER1 for hippocampal long-term potentiation (LTP) was found (Wang et al., 2018). GPER activation by G1 given during a 15-day systemic treatment was able to improve memory for contextual and cued fear conditioning as well as spatial memory assessed in the Morris water maze in middle-aged mice that show reduced expression of hippocampal GPER. These effects were blocked by co-administration of G15 and were not observed in young adult male mice (Xu, Cao, Zhou, Wang, & Zhu, 2018). G1 also ameliorated spatial memory impairment and reduced neuronal death in a model of traumatic brain injury using male rats (Wang, Pan, Xu, & Li, 2017). G15 infused into the perirhinal cortex after training has been recently shown to impair object place memory in male rats, revealing a role for GPER (Mitchnick et al., 2019). However, the involvement of GPER in modulating memory consolidation in healthy males remains poorly understood. Here, we provide the first evidence that acute systemic administration of G1 can enhance memory in healthy young adult male rats through a mechanism dependent on GPER activation.

2. Materials and method

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (290-410 g) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were allowed *ad libitum* access to standardized pellet food and water. All experiments took place between 9 AM and 6 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and were approved by the institutional animal care committee (CEUA/UFRGS #36364).

2.2. Drug administrations

G-1

(1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3Hcyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone; Cayman Chemical, Michigan, USA), a selective GPER agonist, was dissolved in sunflower seed oil (vehicle) and administered subcutaneously (s.c.) immediately, 3h or 6h after the training sessions of memory tasks at the doses of 15, 75 or 150 µg/kg. GPER selective antagonist, G-15 ((3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline; Cayman Chemical, Michigan, USA) was dissolved in sunflower seed oil and administered subcutaneously (s.c.) immediately after the training sessions of memory tasks at the dose of 100 µg/kg.

Reconsolidation experiment: G-1 dissolved in sunflower seed oil was administered subcutaneously (s.c.) immediately after inhibitory avoidance (IA) retention test 1 (reactivation session) performed 24 h after training, at the dose of 150 µg/kg.

2.3. *Object recognition*

Training and testing took place in a 40 cm x 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of plywood with a frontal glass wall. The floor was covered with sawdust. The objects used for exploration were made of plastic Duplo Lego Toys and had a height of about 10 cm. Objects presented similar textures, colors and sizes, but distinctive shapes. The different objects and their positions were counterbalanced across experiments and behavioral trials, and all objects had a height of about 10 cm. The objects were washed with a 70% ethanol solution between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws, sitting on the object was not considered exploration. General training and test procedures followed the methods described in previous reports (Dornelles et al., 2007; Jobim et al., 2012; Figueiredo et al., 2015). Rats were left to explore the empty arena for 5 minutes in the first day (habituation). Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. Animals were left to explore the objects during 5 min and the time exploring each object was recorded. On memory retention test trials given 24 h after training, rats explored the open field for 5 minutes in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. Trials were videotaped and object exploration was measured by an experimenter blind to group treatment assignments, using two stopwatches to

record the time spent exploring the objects. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose or forepaws while sniffing. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $T_N/(T_F+T_N)$ [T_F = time spent exploring the familiar object; T_N = time spent exploring the novel object].

2.4. *Inhibitory avoidance*

We used the single-trial, step-down IA conditioning as an established model of fear-motivated memory. In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports (Figueiredo et al., 2016; Silva et al., 2012). The IA apparatus was a 50x25x25-cm³ acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1-mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, rats received a mild footshock (0.4 mA) and were removed from the apparatus immediately afterwards. A

retention test trial was carried out 24 h after the training trial. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies (in seconds) on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

In experiments examining G1 effects on reconsolidation, G1 administration took place immediately after retention test 1 (reactivation session), which was performed 24 h after training. Rats that did not step down to the grid floor within 180 s during the 24-h test trial were

gently put on the grid floor for 3 s. A second test trial (Test 2) was performed 24 h after retention test 1, while a third retention test (Test 3) was performed 24 h after Test 2 (Jobim et al., 2012).

2.6. Statistics

Data from recognition indexes and latencies to step-down are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.). Statistical analyses were performed using SPSS software version 16.0. Comparisons of recognition indexes and latencies were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey *post hoc* tests were carried out when necessary. In the experiment using post-retrieval injections, latencies were analyzed using two-way ANOVA, with drug administration (vehicle or G1) and experimental sessions (training, test 1, test 2, and test 3) as fixed factors. Tukey *post hoc* test was carried out to indicate differences between sessions. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

We first examined the effects of different doses of the selective GPER agonist G1 and its antagonist G15, administered immediately after training on object recognition memory consolidation. Statistical comparisons using one-way ANOVA indicated a significant effect when comparing recognition indexes during long-term retention test ($F_{(4, 50)} = 22.98$, $p < 0.0001$, Figure 1A), but not at the training session ($F_{(4, 50)} = 1.89$, $p = 0.126$). Further *post hoc* comparisons revealed that the animals that received G1 at the highest dose (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) presented a higher recognition index than the control group, treated with vehicle ($p = 0.038$), suggesting that GPER stimulation immediately after training facilitates recognition memory.

However, no significant differences were observed when comparing the control group with the groups that received G1 at the doses of 15 or 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The group treated with the GPER antagonist G15 showed a recognition index significantly lower than the control group ($p < 0.0001$), suggesting that GPER blockade immediately after training impairs recognition memory consolidation.

We next decided to investigate the effects of GPER stimulation, when given 3 or 6 h after training, on recognition memory consolidation, using the dose that proved to affect object memory immediately after training, i.e., 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Statistical comparisons revealed no significant differences at the retention test ($F_{(3,41)} = 0.54$, $p = 0.660$; Figure 1B) performed 24h after training, nor in the training session ($F_{(3,41)} = 1.25$, $p = 0.302$), suggesting that there is a time-window for GPER participation on recognition memory consolidation.

Our next goal was to determine the effects of GPER stimulation and blockade on inhibitory avoidance. We then administered G1 at different doses and G15 immediately after inhibitory avoidance training. One-way ANOVA indicated a significant difference when comparing latencies to step-down in the long-term retention test ($F_{(4,53)} = 3.06$, $p = 0.024$), performed 24h after training, but not in the training session ($F_{(4,53)} = 2.34$, $p = 0.067$; Figure 2A). Comparison of latencies in the long-term retention test using *post hoc* tests indicated that the highest dose of G1 increased latencies to step-down in comparison with the control group ($p = 0.042$), while the doses of 15 and 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ have not affected inhibitory avoidance retention in comparison with controls. Interestingly, differently from the findings on object recognition, GPER antagonist G15 administered immediately after training had no effect on inhibitory avoidance retention, as the latency of the G15-treated group did not differ from that of the control group.

We were also interested in evaluating the effects of GPER stimulation, administering G1, at the effective dose of 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, at 3 or 6 h after training on aversive memory

consolidation. No significant effects were found when latencies to step down of the training session ($F_{(3, 57)} = 1.94$, $p = 0.133$; Figure 2B) or the long-term retention test were compared ($F_{(3, 57)} = 1.68$, $p = 0.182$; Figure 2B).

In order to examine the effects of G1 on inhibitory avoidance memory reconsolidation, rats were trained and tested 24h later (Test1) and G1 was administered immediately after Test 1. Tests 2 and 3 were performed subsequently with a 24-h interval between them. Two-way ANOVA revealed no significant main effect of G1 administration ($F_{(1, 108)} = 1.65$, $p = 0.201$, Fig. 3A), while, a significant main effect of experimental session was observed ($F_{(3, 108)} = 34.64$, $p < 0.0001$, Fig. 3A). Further analysis using Tukey's *post hoc* test indicated significant differences between training session and retention Tests 1, 2, and 3 (all p 's < 0.0001 , Figure 3A), as expected. No significant differences were observed between retention Tests 1, 2, and 3, nor were interactions observed. An additional control experiment, in which G1 administration was performed 24 h after training with no retention Test 1, indicated no main effect of drug administration on retention Test 2, performed 48 h after training or retention Test 3 performed 72 h after training ($F_{(1, 84)} = 0.15$, $p = 0.700$, Fig. 3B). A significant main effect of experimental session was revealed ($F_{(2, 108)} = 30.39$, $p < 0.0001$, Fig. 3B) and *post hoc* tests indicated that training was significantly different from Test 2 and Test 3 (both p 's < 0.0001), while Test 2 did not differ from Test 3 ($p = 0.911$).

4. Discussion

In this report, we provide the first evidence indicating that systemic manipulation of the GPER in males modulates memory consolidation. Retention of both OR and IA were enhanced by G1, whereas antagonism by G15 impaired OR. Memory modulation by estrogen signaling shows sexual dimorphism. For example, hippocampal LTP is regulated by ER α in female but

not in male rats (Wang et al., 2018). Agonist activation of ER α improves hippocampus-dependent fear memory impairment produced by the antagonist of ER receptors tamoxifen, likely by influencing the early consolidation phase (Lichtenfels et al., 2017). Sex-dependent differences regarding the role of GPER in memory are much less understood. Whereas GPER 1 activation mimicked the postsynaptic effects of E₂ in increasing excitatory postsynaptic responses in the female rat dorsal hippocampus, in males this effect was observed only when an ER β agonist was used, suggesting a lack of need of GPER in mediating hippocampal actions of E₂ (Oberlander & Woolley, 2017). However, G1 activation of GPER during 15 days was able to enhance contextual fear and spatial memory in middle-aged male mice with reduced GPER expression in the hippocampus, and the effect was blocked by G15 (Xu et al., 2018). This same antagonist given acutely into the perirhinal cortex impairs retention of object place memory (Mitchnick et al., 2019). Our results strongly support these few previous studies indicating a role for GPER in influencing memory consolidation in healthy male subjects. Importantly, our findings that G1 administration was effective when given shortly after training, but not 3 or 6 h posttraining, places GPER as a system specifically involved in regulating the early phase of memory consolidation in both tasks.

Tamoxifen, an antagonist of ER α and ER β estrogen receptors, was shown to impair fear memory reconsolidation when infused into the prelimbic cortex of male rats up to 6 h after reactivation, supporting a role for estrogen signaling in reconsolidation (da Silva, Sohn, Andreatini, & Stern, 2020). However, using a protocol previously shown to reveal crucial mechanisms for IA reconsolidation (Jobim et al., 2012), we found no effect of G1. It thus remains to be explored by further studies whether GPER plays any role in memory reconsolidation.

The signaling and molecular mechanisms mediating the actions of GPER in memory remain under investigation. Evidence suggests that the effects of G1 depend on c-Jun-N-

terminal kinase (JNK), whereas the actions of E₂ are mediated primarily by extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Kim et al., 2016). The effects of a 15-day treatment with G1 on long-term depression (LTD) in middle-aged mice involves brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tropomyosin receptor kinase B (TrkB), Akt, and mammalian target of rapamycin (mTor) (Xu et al., 2018). In female rats with memory deficits related to ovariectomy and brain iron overload, the ameliorating effects of acute systemic G1 given posttraining on IA and OR memory were prevented by protein kinase A (PKA) inhibition (Machado et al., 2019). Given the findings of the present report, further experiments aiming to examine the mechanisms mediating the actions of GPER in memory consolidation in males.

In summary, we provide the first evidence that systemic pharmacological manipulation of GPER modulates consolidation of different types of memory, namely fear-motivated and recognition memories, in healthy male animals. These initial findings could open new avenues of research on the regulation of brain function by estrogens and their G protein-coupled receptors.

Declaration of Interest

The authors declare they have no conflict of interest related to the contents of the present article.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 305656/2019-8 to N.S.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM – grant number 465458/2014-9). R.R. is supported by CNPq grant number 305647/2019-9. The funding sources were not involved in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

References

Alexander, S.P., Benson, H.E., Faccenda, E., Pawson, A.J., Sharman, J.L., McGrath, J.C., Catterall, W.A., Spedding, M., Peters, J.A., Harmar, A.J.; CGTP Collaborators, Abul-Hasn, N., Anderson, C.M., Anderson, C.M., Araiksinen, M.S., Arita, M., Arthofer, E., Barker, E.L., Barratt, C., Barnes, N.M., Bathgate, R., Beart, P.M., Belelli, D., Bennett, A.J., Birdsall, N.J., Boison, D., Bonner, T.I., Brailsford, L., Bröer, S., Brown, P., Calo, G., Carter, W.G., Catterall, W.A., Chan, S.L., Chao, M.V., Chiang, N., Christopoulos, A., Chun, J.J., Cidlowski, J., Clapham, D.E., Cockcroft, S., Connor, M.A., Cox, H.M., Cuthbert, A., Dautzenberg, F.M., Davenport, A.P., Dawson, P.A., Dent, G., Dijksterhuis, J.P., Dollery, C.T., Dolphin, A.C., Donowitz, M., Dubocovich, M.L., Eiden, L., Eidne, K., Evans, B.A., Fabbro, D., Fahlke, C., Farndale, R., Fitzgerald, G.A., Fong, T.M., Fowler, C.J., Fry, J.R., Funk, C.D., Futerman, A.H., Ganapathy, V., Gaisnier, B., Gershengorn, M.A., Goldin, A., Goldman, I.D., Gundlach, A.L., Hagenbuch, B., Hales, T.G., Hammond, J.R., Hamon, M., Hancox, J.C., Hauger, R.L., Hay, D.L., Hobbs, A.J., Hollenberg, M.D., Holliday, N.D., Hoyer, D., Hynes, N.A., Inui, K.I., Ishii, S., Jacobson, K.A., Jarvis, G.E., Jarvis, M.F., Jensen, R., Jones, C.E., Jones, R.L., Kaibuchi, K., Kanai, Y., Kennedy, C., Kerr, I.D., Khan, A.A., Klien, M.J., Kukkonen, J.P., Lapoint, J.Y., Leurs, R., Lingueglia, E., Lippiat, J., Lolait, S.J., Lummis, S.C., Lynch, J.W., MacEwan, D., Maguire, J.J., Marshall, I.L., May, J.M., McArdle, C.A., McGrath, J.C., Michel, M.C., Millar, N.S., Miller, L.J., Mitolo, V., Monk, P.N., Moore, P.K., Moorhouse, A.J., Mouillac, B., Murphy, P.M., Neubig, R.R., Neumaier, J., Niesler, B., Obaidat, A., Offermanns, S., Ohlstein, E., Panaro, M.A., Parsons, S., Pwrtwee, R.G., Petersen, J., Pin, J.P., Poyner, D.R., Prigent, S., Prossnitz, E.R., Pyne, N.J., Pyne, S., Quigley, J.G., Ramachandran, R., Richelson, E.L.,

- Roberts, R.E., Roskoski, R., Ross, R.A., Roth, M., Rudnick, G., Ryan, R.M., Said, S.I., Schild, L., Sanger, G.J., Scholich, K., Schousboe, A., Schulte, G., Schulz, S., Serhan, C.N., Sexton, P.M., Sibley, D.R., Siegel, J.M., Singh, G., Sitsapesan, R., Smart, T.G., Smith, D.M., Soga, T., Stahl, A., Stewart, G., Stoddart, L.A., Summers, R.J., Thorens, B., Thwaites, D.T., Toll, L., Traynor, J.R., Usdin, T.B., Vandenberg, R.J., Villalon, C., Vore, M., Waldman, S.A., Ward, D.T., Willars, G.B., Wonnacott, S.J., Wright, E., Ye, R.D., Yonezawa, A., & Zimmermann, M. (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview. *British Journal of Pharmacology*, *170*(8), 1449-1458.
- Bologa, C.G., Revankar, C.M., Young, S.M., Edwards, B.S., Arterburn, J.B., Kiselyov, A.S., Parker, M.A., Tkachenko, S.E., Savchuck, N.P., Sklar, L.A., Oprea, T.I., & Prossnitz, E.R. (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nature Chemical Biology*, *2*(4), 207–212.
- Brailoiu, E., Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Mizuo, K., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., & Dun, N.J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology*, *193*, 311-321.
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., & Weigel, R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, *45*(3), 607-617.
- da Silva, T.R., Sohn, J.M.B., Andreatini, R., & Stern, C.A. (2020). The role of prelimbic and anterior cingulate cortices in fear memory reconsolidation and persistence depends on the memory age. *Learning & Memory*, *27*(8), 292-300.
- Dennis, M.K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Alcon, S.N., Nayak, T.K., Bologa, C.G., Leitao, A., Brailoiu, E., Deliu, E., Dun, N.J., Sklar, L.A., Hathaway, H.J., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., & Prossnitz, E.R. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature Chemical Biology*, *5*(6), 421–427.

- Dornelles, A., de Lima, M.N., Grazziotin, M., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Roesler, R., & Schröder, N. (2007). Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(1), 137-142.
- Feng, Y., & Gregor, P. (1997). Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231(3), 651-654.
- Figueiredo, L.S., Dornelles, A.S., Petry, F.S., Falavigna, L., Dargél, V.A., Köbe, L.M., Aguzzoli, C., Roesler, R., & Schröder, N. (2015). Two waves of proteasome-dependent protein degradation in the hippocampus are required for recognition memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 120, 1-6.
- Figueiredo, L.S., de Freitas, B.S., Garcia, V.A., Dargél, V.A., Köbe, L.M., Kist, L.W., Bogo, M.R., & Schröder, N. (2016). Iron loading selectively increases hippocampal levels of ubiquitinated proteins and impairs hippocampus-dependent memory. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 6228-6239.
- Frick, K.M., & Kim, J. (2018). Mechanisms underlying the rapid effects of estradiol and progesterone on hippocampal memory consolidation in female rodents. *Hormones and Behavior*, 104, 100-110.
- Fugger, H.N., Foster, T.C., Gustafsson, J., & Rissman, E.F. Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. *Brain Research*, 883(2), 258-264.
- Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M.M., & Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3), 904-910.
- Gabor, C., Lymer, J., Phan, A., & Choleris, E. (2015). Rapid effects of the G-protein coupled oestrogen receptor (GPER) on learning and dorsal hippocampus dendritic spines in female mice. *Physiology & Behavior*, 149, 53-60.

- Jobim, P.F., Pedrosa, T.R., Christoff, R.R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G.K., & Roesler, R. (2012). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*(1), 105-112.
- Jobim, P.F., Pedrosa, T.R., Werenicz, A., Christoff, R.R., Maurmann, N., Reolon, G.K., Schröder, N., & Roesler, R. (2012). Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behavioural Brain Research*, *228*(1), 151-158.
- Kim, J., Szinte, J.S., Boulware, M.I., & Frick, K.M. (2016). 17β -estradiol and agonism of G-protein-coupled estrogen receptor enhance hippocampal memory via different cell-signaling mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *36*(11), 3309-3321.
- Kubota, T., Matsumoto, H., & Kirino, Y. (2016). Ameliorative effect of membrane-associated estrogen receptor G protein coupled receptor 30 activation on object recognition memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Science* *131*(3), 219-222.
- Kumar, A., Bean, L.A., Rani, A., Jackson, T., & Foster, T.C. (2015). Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice. *Hippocampus* *25*(12), 1556-1566.
- Kumar, A., & Foster, T.C. (2020). G protein-coupled estrogen receptor: rapid effects on hippocampal-dependent spatial memory and synaptic plasticity. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, *11*, 385.
- Lai, Y.J., Yu, D., Zhang, J.H., & Chen, G.J. (2017). Cooperation of genomic and rapid nongenomic actions of estrogens in synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*, *54*(6), 4113–4126.

- Lichtenfels, M., Dornelles, A.D.S., Petry, F.D.S., Blank, M., de Farias, C.B., Roesler, R., & Schwartsmann, G. (2017). The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, *124*(11), 1331-1339.
- Luine, V., & Frankfurt, M. (2020). Estrogenic regulation of memory: The first 50 years. *Hormones and Behavior*, *121*, 104711.
- Lymer, J., Robinson, A., Winters, B.D., & Choleris, E. (2017). Rapid effects of dorsal hippocampal G-protein coupled estrogen receptor on learning in female mice. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 131-140.
- Machado, G.D.B., de Freitas, B.S., Florian, L.Z., Monteiro, R.T., Gus, H., Schröder, N. (2019). G protein-coupled oestrogen receptor stimulation ameliorates iron- and ovariectomy-induced memory impairments through the cAMP/PKA/CREB signalling pathway. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(10), e12780.
- Mitchnick, K.A., Mendell, A.L., Wideman, C.E., Jardine, K.H., Creighton, S.D., Muller, A.M., Choleris, E., MacLusky, N.J., & Winters, B.D. (2019). Dissociable involvement of estrogen receptors in perirhinal cortex-mediated object-place memory in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, *107*, 98-108.
- Oberlander, J.G., & Woolley, C.S. (2016). 17 β -estradiol acutely potentiates glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus through distinct mechanisms in males and females. *Journal of Neuroscience*, *36*(9), 2677-2690.
- Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., & Lolait, S.J. (1996). Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *228*(2), 285-292.

- Sheppard, P.A.S., Choleris, E., & Galea, L.A.M. (2019). Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Molecular Brain*, 12(1), 22.
- Silva, P.F., Garcia, V.A., Dornelles, A. da S., Silva, V.K., Maurmann, N., Portal, B.C., Ferreira, R.D., Piazza, F.C., Roesler, R., & Schröder, N. (2012). Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience*, 200, 42-49.
- Wang, W., Le, A.A., Hou, B., Lauterborn, J.C., Cox, C.D., Levin, E.R., Lynch, G., & Gall, C.M. (2018). Memory-related synaptic plasticity is sexually dimorphic in rodent hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 38(37), 7935-7951.
- Wang, Z.F., Pan, Z.Y., Xu, C.S., & Li, Z.Q. (2017). Activation of G-protein coupled estrogen receptor 1 improves early-onset cognitive impairment via PI3K/Akt pathway in rats with traumatic brain injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 948-953.
- Waters, E.M., Thompson, L.I., Patel, P., Gonzales, A.D., Ye, H.Z., Filardo, E.J., Clegg, D.J., Gorecka, J., Akama, K.T., McEwen, B.S., & Milner, T.A. (2015). G-protein-coupled estrogen receptor 1 is anatomically positioned to modulate synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2384-2397.
- Xu, W., Cao, J., Zhou, Y., Wang, L., & Zhu, G. (2018). GPR30 activation improves memory and facilitates DHPG-induced LTD in the hippocampal CA3 of middle-aged mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 149, 10-19.

Figure captions

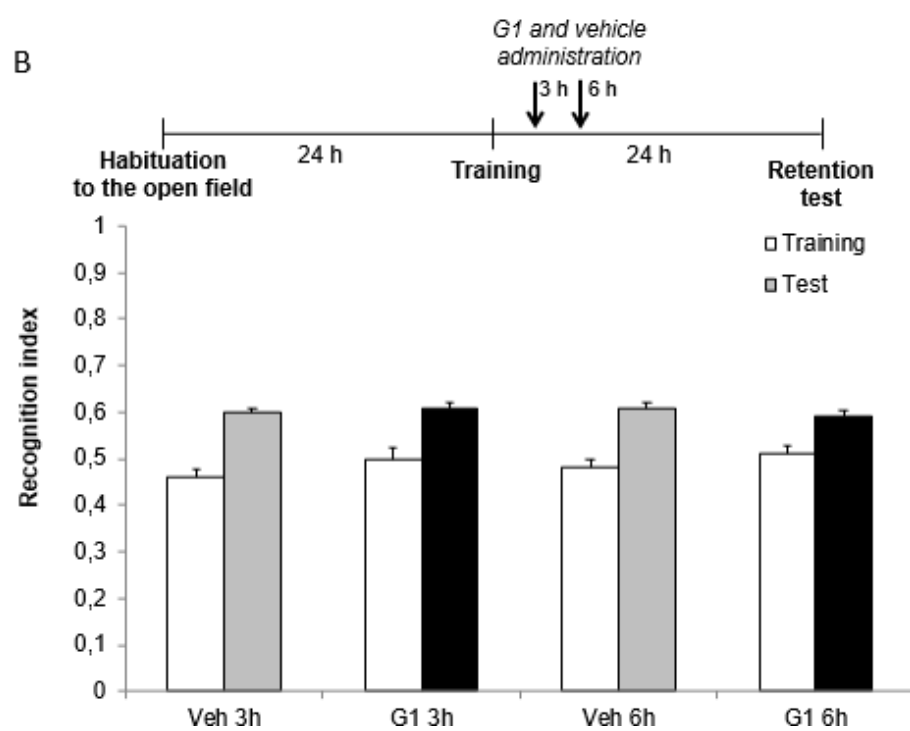
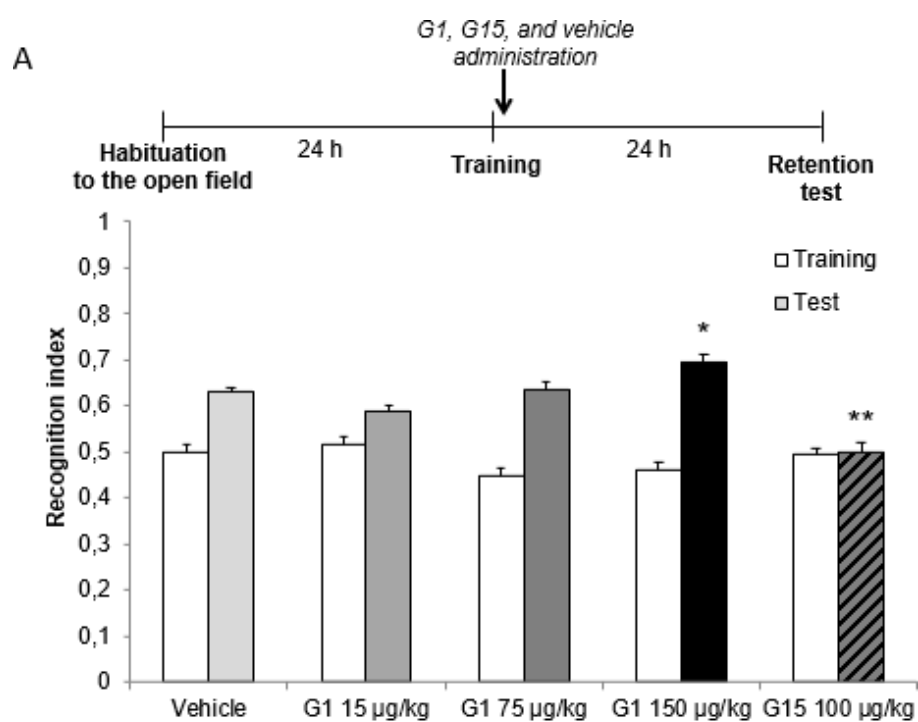
Fig. 1. Effects of G1, a GPER agonist, and G15 a GPER antagonist on object recognition memory. (A) Rats were trained in object recognition task and received vehicle (sunflower seed oil, N = 14), G1 at three different doses (15 µg/kg, N = 8; 75 µg/kg, N = 9; 150 µg/kg, N = 10; s.c.) dissolved in sunflower seed oil, or G15 (100 µg/kg, N = 14; s.c.) dissolved in sunflower oil, immediately after training. Retention test was performed 24 h after training. (B) Rats were trained in object recognition task and received vehicle or G1 (150 µg/kg, s.c.) dissolved in

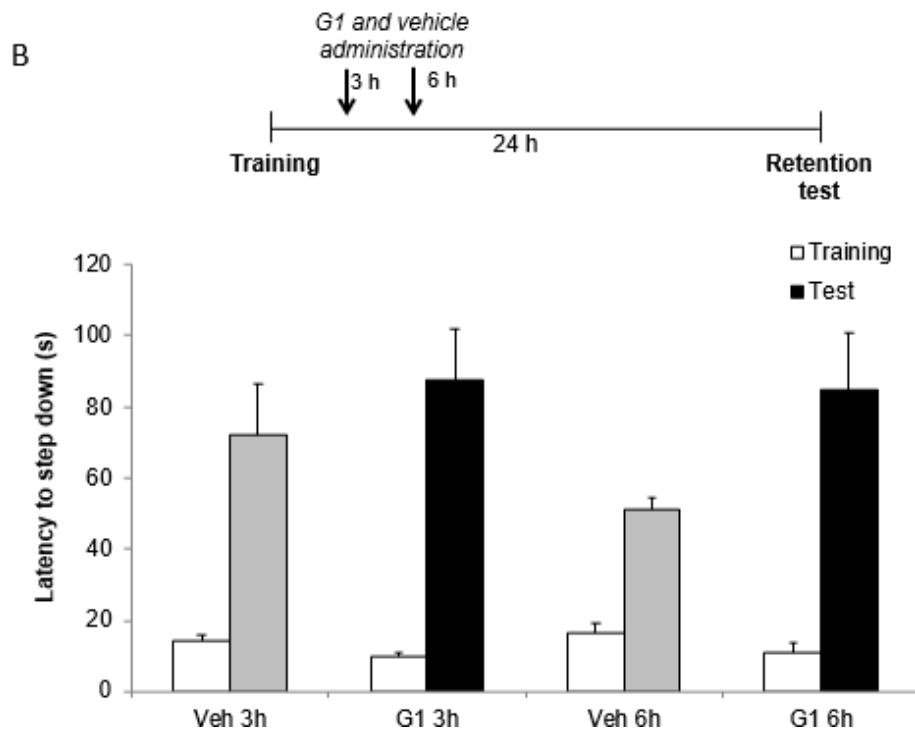
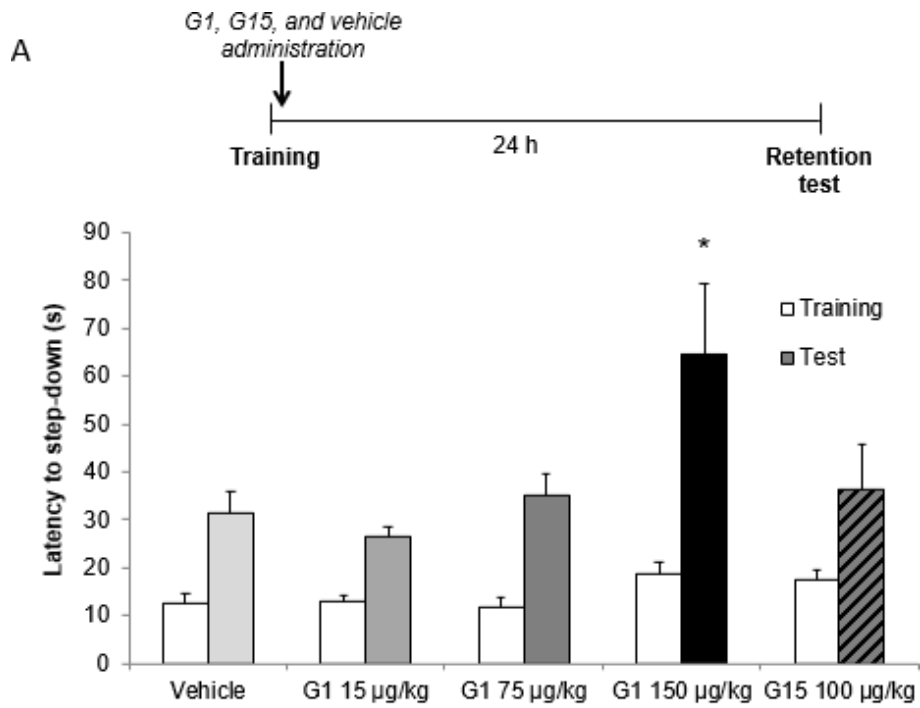
vehicle, 3 hours (Vehicle N = 12; G1 N =12) or 6 hours 3 (Vehicle N = 10; G1 N =11) after training. Retention test was performed 24 h after training. Data are expressed as mean recognition indexes \pm S.E. and was analyzed by one-way ANOVA. Significant differences between G1 or G15 in comparison to Vehicle are indicated as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$.

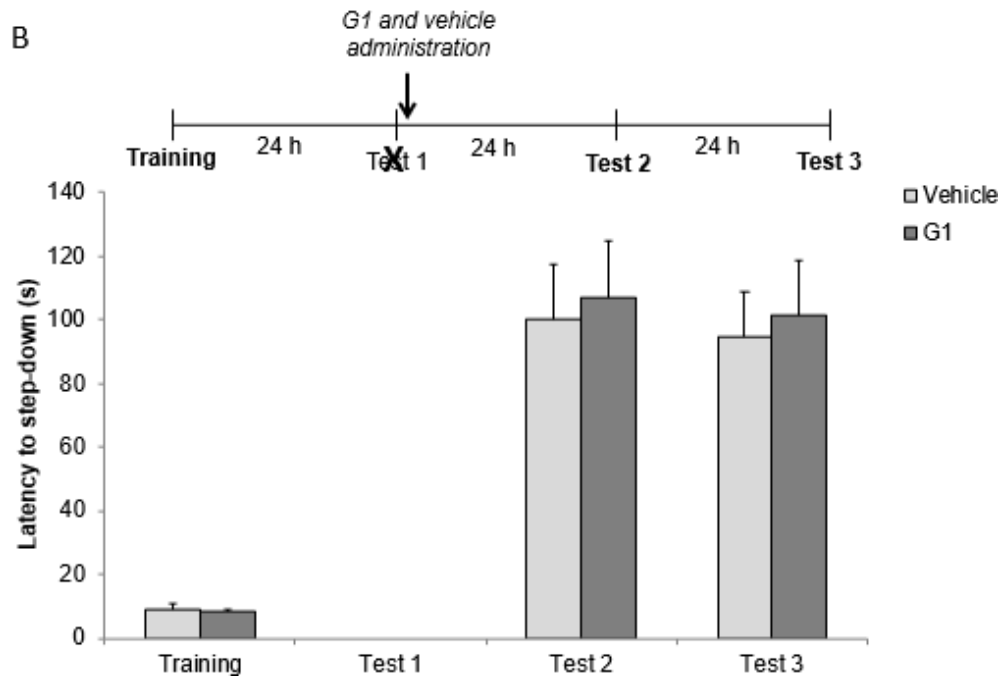
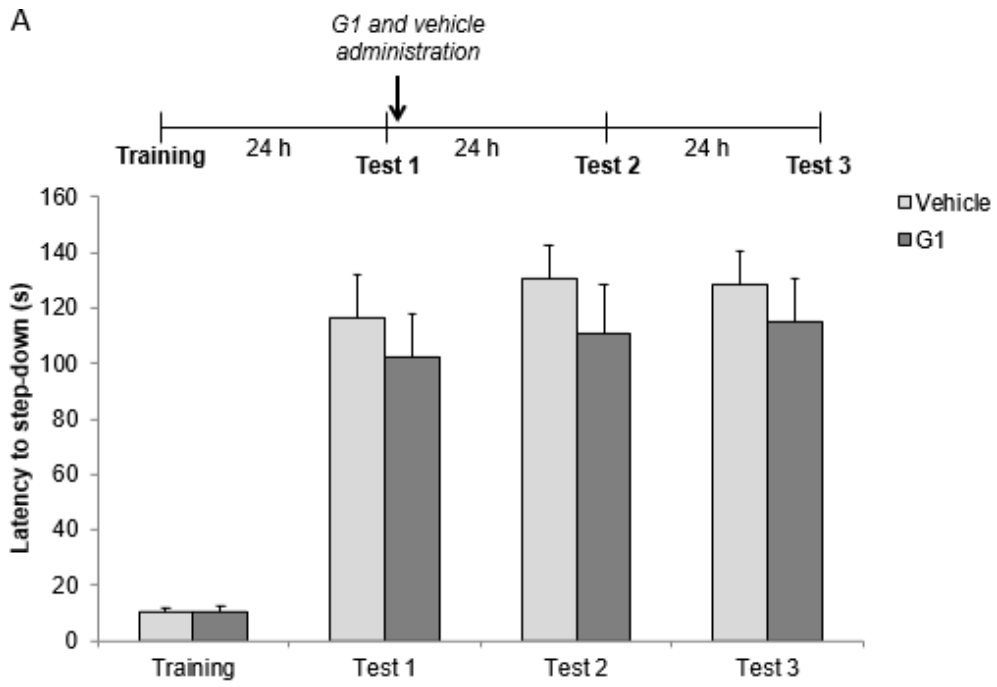
Fig. 2. Effects of G1, a GPER agonist, and G15 a GPER antagonist on IA memory. (A) Rats were trained in IA and received vehicle (sunflower seed oil, N = 14), G1 at three different doses (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N = 10; 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N= 12; 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N = 11; s.c.) dissolved in sunflower seed oil, or G15 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N = 11; s.c.) dissolved in sunflower oil, immediately after training. Retention test was performed 24 h after training. (B) Rats were trained in IA and received vehicle or G1 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) dissolved in vehicle, 3 hours (Vehicle N = 15; G1 N =15) or 6 hours (Vehicle N = 15; G1 N =16) after training. Retention test was performed 24 h after training. Data are expressed as mean latencies to step-down \pm S.E. and was analyzed by one-way ANOVA. Significant differences between G1 in comparison to Vehicle are indicated as * $p < 0.05$.

Fig. 3. Effect of GPER stimulation on IA memory reconsolidation. (A) Rats were trained in IA and tested for retention 24 h later. Immediately after the 24-h test, vehicle (N = 15) or G1 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N = 14) were administered subcutaneously. Animals were re-tested for retention 24 h later (Test 2, 48 h after training), and again 72 h after training (Test 3). No significant main effect of treatments was found. (B) No reactivation control. Rats were trained in IA and 24 h later Vehicle (N = 15) or G1 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, N = 15) were administered subcutaneously, in the absence of Test 1. Rats were tested for retention 48 h and 72 h after training. No significant main effect of drug administration was found. Data are expressed as mean latencies to step-

down \pm S.E. and was analyzed by two-way ANOVA using drug administration (Vehicle or G1) and experimental session (training, Test 1, Test 2, and Test 3) as fixed factors.







6.2 DISCUSSÃO

A descoberta de moléculas receptoras responsáveis pelas atividades biológicas induzidas pelo estrogênio e o estabelecimento de sua estrutura e localização, foram fundamentais para a compreensão inicial da função dos estrogênios em machos, assim como em fêmeas (Hess and Cooke, 2018). Estudos comprovaram que a modulação da memória por sinalização de estrogênio, apresenta diferenças dentre os sexos, além de refletir diferenças na ativação de quinases em nível sináptico. Como exemplo recentemente publicado, o fato da LTP no hipocampo ser regulada pelo receptor intracelular clássico ER α , apresentando altos níveis pós-sinápticos em ratas fêmeas, mas não em ratos machos, o que contribuiria para diferenças na codificação de tipos específicos de memórias (Wang et al., 2018).

Então, nosso estudo foi focado em ratos machos adultos, de forma que se pudesse ampliar a compreensão de seu receptor acoplado à proteína G, GPER1, a partir de sua manipulação farmacológica sistêmica. Nossos resultados mostraram que, no experimento 1, no teste comportamental de Reconhecimento de Objeto (RO); onde ocorreu a administração das diferentes doses do agonista de GPER1 o G1, imediatamente após o treino, observamos que o índice de reconhecimento do 1º dia (Treino), tem média de aproximadamente 0,5 nos grupos experimentais, demonstrando que os animais em estudo, exploraram igualmente os dois objetos idênticos na sessão de treino. No 2º dia (Teste), esse IR foi acima de 0,5 no grupo controle e nos animais tratados com G1 nas diferentes doses, comprovando que, os animais reconheceram a presença de um novo objeto e passaram mais tempo o explorando em relação ao objeto que já lhes era familiar. Ainda nesta etapa do experimento, observamos que os grupos que receberam a administração de G1 nas doses de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, não obtiveram diferença estatística comparada ao grupo veículo. Porém, o grupo que recebeu a maior dose de G1, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou diferença significativa estatisticamente com o grupo veículo; comprovando um efeito melhorador da memória neste grupo.

Também foi administrado imediatamente após o treino, em um dos grupos o antagonista de GPER1, o G15. Este grupo, tanto no dia do treino, quanto no dia do teste apresentou IR semelhantes, sugerindo que os animais não reconheceram o objeto familiar no dia do teste, apresentando um efeito amnésico sobre esses animais.

Corroborando, a pesquisa de Xu e colaboradores em 2018, que realizou a ativação de GPER1 por G1, em um tratamento crônico, apresentando melhora na memória aversiva e espacial em camundongos machos de meia-idade com expressão reduzida de GPER no hipocampo (características cerebrais típicas do envelhecimento), provavelmente por facilitar a plasticidade sináptica. Além disto, foi observado que a administração do antagonista G15, impediu esse efeito melhorador da memória.

Com relação ao teste comportamental de Esquiva Inibitória (EI), também administrados imediatamente após o treino, os dados estatísticos mostraram, que a latência de descida dos animais no 1º dia (Treino) foi breve, em média 10 segundos em todos os grupos. No 2º dia (Teste), essa latência de descida aumentara consideravelmente. Sendo assim, no dia do teste os grupos com as doses de 15 µg/kg e 75 µg/kg também não apresentaram diferença significativa estatisticamente com relação ao grupo veículo. Apenas o grupo que recebeu a maior dose, de 150 µg/kg, apresentou essa diferença estatística com o grupo veículo, demonstrando ter o efeito melhorador da memória neste grupo. Sugere-se então ser a dose ideal para ser usada nas demais etapas dos experimentos.

A partir das informações obtidas através da EI, curiosamente o grupo que recebeu o antagonista G15 imediatamente após o teste, apresentou latência de descida semelhante aos outros grupos que receberam as doses mais baixas do agonista G1 e ao grupo controle. Logo, inferimos que o G15 não proporcionou o mesmo efeito amnésico que foi observado na tarefa de RO. Provavelmente por conta da natureza das tarefas comportamentais, pois o RO é um teste de caráter neutro e exploratório, diferente do teste de EI, que se trata de um teste que provoca um estímulo aversivo e marcante para animal. Cada tarefa realizada pelo animal de estudo, possibilita a formação de um tipo de memória diferente.

Considerando os dois experimentos em conjunto, podemos concluir que a estimulação dos receptores GPER1 em ratos machos imediatamente após o treino modula a consolidação da memória, tanto em tarefa neutra, como aversiva. Estudos realizados com o antagonista G15, em um tratamento agudo no córtex perirrinal (PRh), demonstraram que o G15 interferiu na retenção da memória de localização do objeto em ratos machos adultos. O GPER1 também foi considerado necessário no PRh, uma vez que o antagonista G15 prejudicou tanto a memória de longo prazo (LTM; 24 h) quanto a memória de curto prazo (STM; 20 min). A administração intra-

PRh de E2 possibilitou o aumento tanto a LTM quanto a STM. Além disso, pelo menos um dos ERs clássicos (provavelmente ER β), bem como o GPER1, seriam essenciais para a memória de localização do objeto (OiP) de longo prazo, e a ativação do GPER1 é necessária para a memória OiP de curto prazo. A partir desses resultados, avaliou-se então a necessidade de E2 e ERs na memória de localização do objeto mediada por PRh de ratos machos, viabilizando vias de sinalização relacionadas com ERs semelhantes às existentes no hipocampo (Mitchnick et al., 2019).

Com relação ao RO realizado durante o experimento 2 e a administração de veículo e G1 3h e 6h após do treino; por meio dos dados estatísticos, observamos que no 1º dia (Treino) todos os grupos tratados, apresentaram também, IR com média cerca de 0,5 na maioria dos grupos tratados, demonstrando novamente que os animais em estudo, exploraram de forma igual ambos objetos idênticos na caixa. No dia do teste (2º dia), esse IR ultrapassou de 0,5 também em todos grupos, independente do intervalo de tempo que cada grupo foi tratado após o treino. Estatisticamente os grupos que receberam G1 3h e 6h após o treino, no 2º dia não obtiveram diferença significativa entre si e nem com relação aos grupos veículos. Apenas o grupo G1 6h, que apresentou um IR discretamente menor, porém sem diferença estatística. Assim também, como os grupos veículos de 3h e 6h, que no dia do teste também apresentaram IR em torno de 0,6, sem diferença significativa entre si, corroborando que, todos os grupos de animais reconheceram a presença de um novo objeto e também passaram mais tempo o explorando ao invés do objeto já familiar.

Em referência ao teste comportamental de Esquiva Inibitória (EI), também foi realizada a administração de G1 3h e 6h após o treino. Os conhecimentos obtidos estatisticamente mostraram que a latência de descida dos animais no 1º dia (Treino) foi breve, entre 10 a 18 segundos em todos os grupos. No 2º dia (Teste), essa latência de descida teve um aumento considerável, em comparação ao treino. Logo, conseguimos observar que os grupos que receberam veículo 3h e 6h após o treino, apresentaram latência aproximadamente de 70 segundos e 50 segundos respectivamente. Já os grupos de administração de G1 3h e 6h após o treino, mostraram latência acima dos 80 segundos, sem diferença significativa entre eles. Desta forma, podemos sugerir que o G1 administrado 3 ou 6 h após o treino não teve efeito sobre a consolidação da memória de esquiva inibitória ou reconhecimento de

objeto. No estudo realizado por Mitchnick et al. (2019) em ratos machos adultos, a administração do antagonista do GPER1 foi realizada apenas imediatamente após a sessão de treino. Assim, este é o primeiro estudo realizado com administrações mais tardias, visando investigar a participação do receptor em outros estágios da consolidação da memória. Uma vez que os resultados não indicaram efeitos significativos, podemos concluir que a atuação do GPER1 se dá nos estágios iniciais da consolidação.

Para a investigação dos efeitos do G1 sobre a reconsolidação da memória, no experimento 3, foram realizados três testes após o treino na Esquiva Inibitória (EI) e a administração de G1 foi realizada somente após o Teste 1. Tivemos um grupo experimental testado e com administração de G1 após o teste 1 e outro Grupo *no reactivation control*, no qual os animais receberam o G1, mas não foram submetidos à sessão de teste (reativação da memória), para comparação dos resultados.

Então, por meio dos dados estatísticos, observamos que no 1º dia (Treino), os grupos experimentais apresentaram dentro do esperado, breve latência. Além disso no Teste 1, realizado 24h após o treino, esses grupos não apresentaram diferença significativa entre si. Porém, com a administração somente após o Teste 1, no Teste 2 (48h após o treino) os grupos veículo e G1, indicaram um aumento na latência de descida da plataforma, mas sem diferença significativa entre si. E assim se seguiu durante a latência do Teste 3 (72h após o treino), não apresentando também diferença significativa em relação ao grupo veículo e G1.

Levando em consideração o grupo *no reactivation control*, os ratos foram treinados no 1º dia e testados quanto à retenção apenas 48 horas depois. No 2º dia (24h após o treino), o veículo ou G1 foram administrados nesses grupos, na ausência de um teste de retenção (Teste 1). Para o Teste 2, houve um aumento de latência nos grupos que receberam G1 e veículo, assim também como no Teste 3. Não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo que o G1 não apresenta efeitos sobre a reconsolidação da memória aversiva.

Não foram encontrados na literatura experimentos que tenham investigado os efeitos do GPER1 sobre a reconsolidação da memória tanto em fêmeas quanto em machos. Por fim, fornecemos a primeira evidência de que as estratégias farmacológicas sistêmicas de GPER1 promove a modulação da consolidação de diferentes tipos de memória, principalmente memórias motivadas pelo medo e de reconhecimento, em animais machos saudáveis. Essas descobertas iniciais podem

abrir novos caminhos de pesquisa, para a maior exploração dos mecanismos sobre a regulação da função cerebral pelos estrogênios e seus receptores acoplados à proteína G.

7 CONCLUSÕES

Por meio dos nossos experimentos conseguimos contribuir com o entendimento de alguns dos processos relacionados ao GPER1 em machos, os quais podem modular os mecanismos da memória durante a consolidação -, conforme descrito a seguir:

- A) Os grupos que receberam G1 imediatamente após o treino nas doses de 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ não apresentaram diferença estatística com relação ao grupo veículo, portanto sem efeito sobre a consolidação da memória em ambos os testes comportamentais. O grupo administrado com G1 na dose de 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, apresentou diferença estatística em relação ao grupo veículo em ambos os testes, promovendo o efeito melhorador da memória. Estes dados sugerem a participação do GPER1 na consolidação da memória.

- B) O grupo administrado com antagonista G15, imediatamente após o treino, apresentou efeito amnésico apenas no teste de RO, devido à natureza das tarefas comportamentais, que promovem tipos de memórias diferentes.

- C) Os grupos que receberam o G1 3h e 6h após o treino de RO, não apresentaram diferença significativa entre si e nem comparados aos grupos que receberam veículo 3h e 6h após o treino, em ambas as tarefas, sugerindo que existe uma janela temporal de atuação do GPER1 na consolidação da memória, o qual participa da modulação apenas nos estágios iniciais da consolidação.

- D) Os grupos que receberam a administração do agonista de GPER 1, o G1, após o Teste 1 de EI, para investigar a reconsolidação, não apresentaram interferência na retenção dessas memórias, durante os seguintes testes do último experimento. Aspecto observado também, no grupo *no reactivation control*, mesmo a retenção ocorrendo apenas 48h após o treino (ausência de

Teste 1), no Teste 2. Assim, podemos sugerir que a estimulação do GPER1 não interfere na reconsolidação da memória de EI em ratos machos.

● REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aedo A-R, Pedersen PH, Pedersen SC, Diczfalusy E. Ovarian steroid secretion in normally menstruating women. I. The contribution of the developing follicle. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 95:212-21.

Aenlle KK, Foster TC. Aging alters the expression of genes for neuroprotection and synaptic function following acute estradiol treatment. *Hippocampus*. 2010; 20(9):1047-60.

Alberini CM. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci*. 2011;5:12.

Alexander A, Irving AJ, Harvey J. Emerging roles for the novel estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS. *Neuropharmacology*. 2017;113(Pt B):652-660.

Al-Sweidi S, Morissette M, Di Paolo T. Effect of oestrogen receptors on brain NMDA receptors of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *J Neuroendocrinol*. 2012; 24(11):1375-85.

Babb SJ, Crystal JD (2006) Episodic-like memory in the rat. *Curr Biol* 16:1317-1321.

Baird DT. The endocrinology of ovarian steroid secretion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1974;4:31-9.

Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscience*. 2012; 239:288-294.

Baulieu EE. Neurosteroids: Of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. In P. M. Conn (Ed.). *Proceedings of the 1996 Conference of the Recent Progress in Hormone Research*. 1997:1–32.

Bean LA, Ianov L, Foster TC. Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*. 2014; 20:534-545.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências - Desvendando o sistema nervoso*. Artmed 4^a ed. 2017:824-896.

Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48-53

Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2008) Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotox Res* 14:353-358.

Birzniece V, Bäckström T, Johansson I-M, Lindblad C, Lundgren P, Iöfgrén M, Olsson T, Ragagnin G, Taube M, Turkmen S, Wahlström G, Wang M.-D, Wihlbäck A-C, Zhu D. Neuroactive steroid effects on

cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain Res Rev.* 2006; 51: 212-239.

Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006; 2:207–212.

Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med.* 2007; 25(3):139-53.

Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007; 193(2):311-21.

Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, et al. Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology.* 2001; 142:1284-9.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997; 45(3):607-17.

Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365(1546):1517–1535.

Colleen, S.; Marks, A. D.; Lieberman, M. *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica.* Porto Alegre: Artmed, 2008.

Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S (1992) The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* 164:162-171.

Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol.* 2000; 21:1-56.

Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61-80.

Crystal JD (2009) Elements of episodic- like memory in animal models. *Behav Processes* 80:269-277.

Dalmaz C, Alexandre Netto C. A memória. *Cienc. Cult.* [online]. 2004; 56(1): 30-31.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak T, Bologna C, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TO, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(6):421.

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127(3-5):358-366.

Dorrington JH, Armstrong DT. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17beta synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(7):2677–2681.

Dudai Y, Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.

Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86.

Dumitriu D, Rapp PR, McEwen BS, Morrison JH (2010) Estrogen and the aging brain: an elixir for the weary cortical network. *Ann NY Acad Sci* 1204:104–112.

Dun SL, Brailoiu GC, Gao X, Brailoiu E, Arterburn JB, Prossnitz ER, Oprea TI, Dun NJ. Expression of estrogen receptor GPR30 in the rat spinal cord and in autonomic and sensory ganglia. *J Neurosci Res.* 2009; 87:1610–1619.

Duvarci, S., Mamou, C.B., and Nader, K. (2006). Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 24, 249–260.

Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67:335–376.

Falls, W.A., Miserendino, M.J., and Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J. Neurosci.* 12, 854–863.

Fernandez SM, Lewis MC, Pechenino AS, Harburger LL, Orr PT, Gresack JE, et al. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal ERK activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci.* 2008; 28(35):8660-8667.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology.* 2007; 148(7):3236-3245.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(10):1649-1660.

Foster TC. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. *Front Neuroendocrinol.* 2016; 26(2):51–64.

Foster TC. Role of estrogen receptor α and β expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus.* 2012; 22(4):656-669.

Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol.* 1999; 81:925–929.

Fu XD, Simoncini T. Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. *Semin Reprod Med.* 2007; 25(3):178-186.

Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ, Benjamin PR (2005) A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci* 21:1347-1358.

Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 346:904-910.

Gingerich S, Kim GL, Chalmers JA, Koletar MM, Wang X, Wang Y, Belsham DD. Estrogen receptor α and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17 β -estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience.* 2010; 170(1):54-66.

Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 2010 Jun;62(2):155-98. doi: 10.1124/pr.109.002071

Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A (2010) The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:1067-1075.

Gingerich S, Kim GL, Chalmers JA, Koletar MM, Wang X, Wang Y, Belsham DD. Estrogen receptor α and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17 β -estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience.* 2010; 170(1):54-66.

Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 2010 Jun;62(2):155-98. doi: 10.1124/pr.109.002071

Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A (2010) The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:1067-1075.

Hadji P. The evolution of selective estrogen receptor modulators in osteoporosis therapy. *Climacteric.* 2012; 15(6):513-523.

Hadjimarkou MM, Vasudevan N. GPER1/GPR30 in the brain: Crosstalk with classical estrogen receptors and implications for behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;176:57-64.

Hammond R, Gibbs RB. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. *Brain Res.* 2011; 1379:53–60.

Harvey J, Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ. Leptin: a potential cognitive enhancer? *Biochem Soc Trans.* 2005; 33:1029-1032.

Hawley WR, Grissom EM, Moody NM, Dohanich GP, Vasudevan N. Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats. *Behav Brain Res.* 2014;262:68-73.

Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol.* 2009; 202: 223–236.

Hess RA, Cooke PS. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biol Reprod.* 2018;99(1):27-44.

Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM (2011) Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31:1635-1643.

Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology.* 2009; 150(4):1722-1730.

Izquierdo I. *Memória 2ª ed.* Artmed Porto Alegre, 2011 p. 136

Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 2006; 29(9):496-505.

Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 11:517-534.

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

Jones TT; Brewer GJ. Critical age-related loss of cofactors of neuron cytochrome C oxidase reversed by estrogen. *Exp Neurol.* 2009; 215(2):212-219.

Kanda N, Watanabe S. 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocytederived macrophages. *J. Invest. Dermatol.* 2003a; 121:771–780.

Kanda N, Watanabe S. 17Beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J. Invest. Dermatol.* 2003b; 121:1500–1509.

Kanda N, Watanabe S. 17Beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 123:319-326.

Kandel E. R.; Schwartz J. H.; Jessell T. M.; Sieglebaum S. A. & Hudspeth A. J. *Princípios de Neurociências*. 5a edição. Porto Alegre - RS. Artmed, 2014.

Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER (2004) Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory.

Kida S, Josselyn SA, Pena de OS, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.

Kim J, Szinte JS, Boulware MI, Frick KM. 17 β -Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell-Signaling Mechanisms. *J Neurosci.* 2016; 36(11):3309-3321.

Klann E, Sweatt JD (2008) Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 89:247-259.

Kramár EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci.* 2009a; 29:12982–12993.

Lent R. *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. São Paulo: Atheneu 2ª ed., 2001: 587-617.

Lewis, D.J., 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 86, 1054–1083.

Li C, Brake WG, Romeo RC, Dunlop JC, Gordon M, et al. Estrogen treatment alters hippocampal dendritic spine shape, enhances synaptic protein immunoreactivity and performance in a spatial working memory task in female C57Bl/6J mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101:2185–90.

Machado GDB, de Freitas BS, Florian LZ, Monteiro RT, Gus H, Schröder N. G protein-coupled oestrogen receptor stimulation ameliorates iron- and ovariectomy-induced memory impairments through the cAMP/PKA/CREB signalling pathway. *J Neuroendocrinol.* 2019;31(10):e12780.

Mah CJ, Albert DJ, Jamieson JL (1972) Memory storage: evidence that consolidation continues following electroconvulsive shock. *Physiol Behav* 8:283-286.

McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci*. 2012;126(1):4-16.

McEwen BS, Alves SE. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*. 1999;20(3):279-307.

McEwen BS, Milner TA. Hippocampal formation: shedding light on the influence of sex and stress on the brain. *Brain Res. Rev*; 2007; 55:343-355.

McGaugh JL (2004) Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical comment on Biedenkapp and Rudy (2004). *Behav Neurosci* 118:1140-1142.

McGaugh JL (2006) Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cogn Sci* 10:345-347.

McGaugh, J. L. Memory—a century of consolidation. *Science* 287, 248–251 (2000).

Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res*. 2008; 192:61-69.

Micevych PE, Kelly MJ. Membrane Estrogen Receptor Regulation of Hypothalamic Function. *Neuroendocrinology*. 2012; 96: 103-110.

Mitchnick KA, Mendell AL, Wideman CE, et al. Dissociable involvement of estrogen receptors in perirhinal cortex-mediated object-place memory in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2019; 107:98-108.

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α . 2003; 144(5):2055-2067.

Mitterling KL, Spencer JL, Dziedzic N, Shenoy S, McCarthy K, Waters EM. Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol*. 2010; 518(14):2729–2743.

Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2007;75(3):478-486.

Nader, K., Schafe, G. E. & Le Doux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726 (2000).

O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998; 47:310–313.

O'Connell C, Gallagher HC, O'Malley A, Bourke M, Regan CM (2000) CREB phosphorylation coincides with transient synapse formation in the rat hippocampal dentate gyrus following avoidance learning. *Neural Plast* 7:279-289.

Österlund, M.K. Underlying mechanisms mediating the antidepressant effects of estrogens. *Biochimica et Biophysica Acta* (2009), doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.001.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzscheier KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*. 2008;149(10):4846-4856.

Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 228:285–292.

Payne AH, Kelch RP, Musich SS, Halpern ME. Intratesticular site of aromatization in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(6):1081– 1087.

Perez VP, De Lima MNM, Silva RS, Dornelles AS, Vedana G, Bogó, MR, Bonan CD, Schröder N. Iron Leads to Memory Impairment that is Associated with a Decrease in Acetylcholinesterase Pathways. *Curr Neurovasc Res*. 2010; 7(1): 15-22.

Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2009) Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn Mem* 16:714-721.

Porrino LJ, Daunais JB, Rogers GA, Hampson RE, Deadwyler SA. Facilitation of task performance and removal of the effects of sleep deprivation by an amphetamine (CX717) in nonhuman primates. *PLoS Biol* 3. 2005; 3(9):e299.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005; 307(5715):1625-1630.

Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.

Rosenegger D, Lukowiak K (2010) The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. *Mol Brain* 3:24.

Sara S. J. (2000b). Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 212–213.

Sara, S. J. (2000a). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*, 7, 73–84.

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Beta-estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 2007; 1150:108–120.

Schiller D, Johansen J (2009) Prelimbic prefrontal neurons drive fear expression: a clue for extinction--reconsolidation interactions. *J Neurosci* 29:13432-13434.

Senkus-Konefka E, Konefka T, Jassem J. The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30:291–301.

Serota RG (1971) Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:1249-1250.

Sherwin BB, Henry JF. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: A critical review. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29:88-113.

Shoham Z, Schachter M. Estrogen biosynthesis--regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril.* 1996;65(4):687-701.

Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia-Segura LM. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci.* 2003; 18:1458–1467.

Sladek CD, Song Z. Diverse roles of G-protein coupled receptors in the regulation of neurohypophyseal hormone secretion. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24(4):554-565.

Smejkalova T, Woolley CS. Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism. *J Neurosci.* 2010;30(48):16137-16148.

Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, Prossnitz ER. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196(386):e381–389.

Spencer JL, Waters EM, Milner TA, McEwen BS. Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. *Neuroscience.* 2008; 155:1106– 19.

Srivastava DP, Penzes P (2011) Rapid estradiol modulation of neuronal connectivity and its implications for disease. *Front Endocrinol* 2:77.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol.* 2009; 30(2):201-211.

Teyler TJ, Discenna P (1984) Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. *Brain Res* 319:15-28.

Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102(1-5):175-179.

Thomas P., Pang Y., Filardo E. J., Dong J., Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells, *Endocrinology* 146 (2005) 624–632.

Thompson RF (1976) The search for the engram. *Am Psychol* 31:209-227.

Tuscher JJ, Fortress AM, Kim J, Frick KM. Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones *Behav. Brain Res.* 2015; 285:140-157.

Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM (2002) Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res* 133:159-164.

Wang W, Le AA, Hou B, et al. Memory-Related Synaptic Plasticity Is Sexually Dimorphic in Rodent Hippocampus. *J Neurosci.* 2018;38(37):7935-7951.

Waters EM, Mitterling K, Spencer JL, Mazid S, McEwen BS, Milner TA. Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus. *Brain Res.* 2009; 1290:1–11.

Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR (2011) Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium.* 2011 Jul;50(1):1-8. doi: 10.1016/j.ceca.2011.02.007.

Xu W, Cao J, Zhou Y, Wang L, Zhu G. GPR30 activation improves memory and facilitates DHPG-induced LTD in the hippocampal CA3 of middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2018;149:10-19.

Yankova M, Hart SA, Woolley CS. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3525-3530.

Zhang QG, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, et al. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor α -mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci.* 2009; 29(44):13823–13836.

Zhao L, Brinton RD. Estrogen receptor and differentially regulate intracellular Ca²⁺ dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res.* 2007; 1172:48–59.

- **ANEXO I – Aprovação pela CEUA/ UFRGS**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36364

Título: AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ACOPLADO À PROTEÍNA G (GPER1) NA CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR.

Vigência: 14/12/2018 à 31/01/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

NADJA SCHRODER - coordenador desde 14/12/2018

Lariza Oliveira de Souza - Aluno de Mestrado desde 14/12/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/02/2019 - Plenarinho - andar térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro Farroupilha PORTO ALEGRE, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 212 ratos Wistar, machos, adultos, provenientes do CREAL-UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 15 de Março de 2019

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética