

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A CONCENTRAÇÃO  
PLASMÁTICA DE HORMÔNIOS DA REPRODUÇÃO E A DENSIDADE DE  
RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE  
RATAS ADULTAS**

**CÁRMEN MARILEI GOMES**

**ORIENTADOR**

GILBERTO LUIZ SANVITTO

**CO-ORIENTADOR**

ALDO BOLTEN LUCION

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Biológicas: Neurociências

**Porto Alegre, 2005**

*Esta tese é dedicada a minha família;  
aos meus queridos amigos, pessoas  
maravilhosas que encontrei durante a  
pós-graduação e; sobretudo a uma  
pessoa muito especial que infelizmente  
não está mais entre todos nós...*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus* pela oportunidade de chegar até aqui e conseguir superar algumas dificuldades.

Aos orientadores, Professores *Gilberto Sanvito* e *Aldo Lucion* pela oportunidade concedida, pela confiança, pela compreensão e pelos ensinamentos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho desde a iniciação científica.

A minha *família* pelo apoio e incentivo em todos os períodos.

Aos professores *Janete Anselmo-Franci* e *Celso Rodrigues Franci* por disponibilizar seus laboratórios para realização de alguns experimentos. Também pelo apoio teórico que muito contribuiu para a composição desse trabalho.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Neurociências* pela oportunidade de fazer parte desse curso.

À *Sônia* e a *Ariana* da USP-RP, pelo apoio técnico.

À *Ana Lúcia* e *Márcia Breigeiron*, pela grande amizade, amor e paciência em momentos nem sempre tão bons como gostaríamos. Segundo Nietzsche: “*O amor é o estado em que o homem vê as coisas como elas realmente são*”.

Ao *Charlis Raineki* principalmente pela sua grande e sincera amizade, e pela sua simplicidade que caracterizam as melhores pessoas. Também pela contribuição com experimentos e discussões que ajudaram a compor essa tese.

Ao *Márcio Donadio*, companheiro de muitos experimentos, pela sua amizade e auxílio nas discussões sobre alguns resultados presentes neste trabalho.

À **Patrícia Ramos de Paula**, aluna de iniciação científica; pelo grande incentivo, ajuda em experimentos e, sobretudo, pela querida amiga que és.

À **Inélia**, aluna de iniciação científica; pela sua ajuda em experimentos e pela sua amizade.

À **Erica e Gabriela Severino**, pela grande amizade e coleguismo desde a graduação.

Aos meus amigos maravilhosos que amo muito; vocês fizeram parte da minha pós-graduação e fazem parte da minha vida: **Anelise, Clarice, Elisa, Fernando, Francine, Gabriela Pereira, Isabel, Luciene, Márcia Azevedo, Sara e Tatiane**.

Às colegas e amigas **Natália, Rosane e Caroline** que estão sempre dispostas a ajudar.

Aos bioteristas **Vanderlom e Diego** que cuidaram dos animais, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa de doutorado.

À **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro necessário para a realização dos experimentos.

*Não se preocupe em entender,  
viver ultrapassa todo o entendimento...*

*Clarisse Lispector*

## ABREVIATURAS

ACTH	Corticotrofina
AMe	Amígdala Medial
AMPc	Adenosina 3,5 Monofosfato Cíclico
Ang II	Angiotensina II
APOM	Área Pré-Óptica Medial
ARC	Núcleo Arqueado
ASM	Área Septal Medial
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
EM	Eminência Mediana
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPG	Hipotálamo-Hipófise-Gônada
LC	Locus Coeruleus
LH	Hormônio Luteinizante
LHRH	Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo Paraventricular
Sar	Sarcosina
SNC	Sistema Nervoso Central
VMH	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

## RESUMO

A manipulação neonatal é um modelo experimental utilizado para avaliar o modo pelo qual interferências precoces na vida do animal podem alterar funções neuroendócrinas e comportamentos na vida adulta. O procedimento de manipulação neonatal, além de alterar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) em ratos machos e fêmeas, pode causar profundas mudanças na função reprodutiva de ratas adultas. De fato, há evidências de que a manipulação neonatal diminui a atividade do eixo HPA através da redução da síntese e secreção de hormônios que são liberados quando os animais são expostos ao estresse na vida adulta e, além disso, induz à presença de ciclos anovulatórios e diminui a receptividade sexual de ratas. Considerando essas alterações induzidas pela manipulação neonatal que são relacionadas à função reprodutiva de ratas, essa tese teve por objetivo estudar as possíveis causas da alteração no comportamento sexual e ovulação induzidas pela manipulação neonatal. Para isto, além de estudar o perfil hormonal desses animais, o que incluiu os esteróides gonadais, as gonadotrofinas e a prolactina (PRL) em diferentes fases e horários do ciclo estral, o conteúdo do hormônio liberador de gonadotrofinas (LHRH) em algumas regiões do sistema nervoso central (SNC) e na eminência mediana (EM); foi avaliada a possível participação do sistema angiotensinérgico central, através da análise da densidade dos receptores de angiotensina II (Ang II) pela técnica de autoradiografia, na mediação dos efeitos da manipulação neonatal sobre a função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (eixo HPG) e do eixo HPA. O presente estudo confirmou dados obtidos em nosso laboratório sobre a redução do comportamento sexual e da ovulação em ratas manipuladas no período neonatal. Na tarde do proestro, período no qual ocorrem os eventos necessários para a ovulação na próxima fase do ciclo estral, os resultados mostram que os animais do grupo manipulado têm redução significativa da concentração plasmática de estradiol, de gonadotrofinas e de PRL, assim como um aumento no conteúdo de LHRH na área pré-óptica medial (APOM). A manipulação neonatal também reduziu a concentração plasmática de progesterona analisada após o coito que pode ser decorrente da reduzida estimulação vaginocervical recebida por essas ratas, já que houve uma redução significativa da frequência de intromissão realizada pelo macho sobre as ratas do grupo manipulado. A densidade de receptores de Ang II na APOM e no núcleo

paraventricular do hipotálamo (PVN) também foi alterada pela manipulação neonatal, pois houve redução significativa na densidade desses receptores nessas duas regiões. Em conclusão, a manipulação neonatal reduz profundamente a atividade do eixo HPG e essa alteração é causada por modificações nas concentrações de estradiol no plasma que, por sua vez, pode alterar a secreção de LHRH, de gonadotrofinas e de PRL, comprometendo dessa maneira a ovulação e a receptividade sexual. Contribuindo para os efeitos deletérios da manipulação neonatal sobre a função reprodutiva em ratas, este procedimento pode alterar a implantação do blastocisto devido à redução da secreção de progesterona observada após o coito no grupo manipulado. Alguns dos efeitos da manipulação neonatal parecem ser mediados pelo sistema angiotensinérgico central, como o aumento do conteúdo de LHRH na APOM e a diminuída resposta do eixo HPA observada em animais manipulados submetidos a situações estressantes na vida adulta.

## ABSTRACT

The neonatal handling is an experimental model used to evaluate the way through which early experiences can alter neuroendocrine functions and behavior in adult life. The procedure of neonatal handling, besides altering the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA axis) function in male and female rats, can cause severe changes in the reproductive function in adult female rats. In fact, there are evidences that neonatal handling reduces the HPA axis activity through decreased synthesis and secretion of hormones that are released when the animals are exposed to stress in adult life. Moreover, it induces anovulatory estrous cycles and reduces the sexual receptiveness in females rats. Considering the alterations induced by neonatal handling that are related with reproductive function in female rats, this thesis aimed to study the possible causes of alterations in sexual behavior and ovulation induced by neonatal handling. To reach this purpose, we evaluated the hormonal profile of these animals what included gonadal steroids, gonadotropins and prolactin (PRL) in different phases and times of estrous cycle, luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) content in some central nervous system (CNS) sites and median eminence (ME). It was also studied the possible participation of central angiotensinergic system, through the analysis of angiotensin II (Ang II) receptors density by autoradiography in modulating neonatal handling effects on hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG axis) function and HPA axis. The present study confirmed data from our laboratory about reduction in sexual behavior and ovulation in neonatal handled female rats. In the afternoon of the proestrus, period when the necessary events for ovulation in next phase of estrous cycle happen, the results showed that the neonatal handled group had a significant reduction in estradiol, gonadotrophines and PRL plasma concentrations, as well as an increase in LHRH content in the medial preoptic area (MPOA). The neonatal handling also reduced progesterone plasma concentration after coitus, what can be caused by decreased vaginocervical stimulation received by these female rats, since there was a significant reduction in intromission frequency from male rat. The Ang II receptors density in MPOA and in paraventricular nucleus (PVN) was also altered in this model, because there was a significant decrease in receptors density in these sites. In conclusion, the neonatal handling severely reduces the HPG axis activity and, this alteration is caused by changes in estradiol plasma concentration that, in turn, can alter the LHRH, gonadotrophines and PRL secretion, harming the ovulation and sexual receptiveness. Contributing to the harmful effects of neonatal handling on reproductive function in female rats, this procedure can alter the blastocyst implantation due to reduction of progesterone secretion observed after coitus in neonatal handled group. Some of neonatal handling effects seem to be mediated by central angiotensinergic system, as the increase in LHRH content in the MPOA and the decreased HPA axis response observed in neonatal handled animals when exposed to stress situations in adult life.

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese está organizada da seguinte maneira: Introdução; Objetivos; Capítulos I, II e III referentes ao artigo publicado e demais que foram submetidos à publicação, respectivamente.

A Introdução mostra o embasamento teórico, que nos levou a formular a proposta de trabalho. Os materiais e métodos e resultados, assim como as referências bibliográficas específicas, encontram-se no corpo de cada trabalho, os quais são apresentados nos capítulos I, II e III.

A seção Discussão Geral contém a interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos.

A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da tese.

A seção Perspectivas discute as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos durante a realização da tese.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências citadas na Introdução e Discussão da tese.

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1 Respostas ao Estresse

A resposta ao estresse, que permite a um organismo enfrentar situações ameaçadoras, consiste de uma rede complexa de sistemas biológicos, que incluem componentes neurovegetativos, endócrinos e comportamentais (CHARMANDARI *et al.*, 2005; CHROUSOS & GOLD, 1992). A ação coordenada desses componentes, que atuam em conjunto, providencia a sobrevivência dos seres vivos devido a manutenção de um equilíbrio complexo no organismo, dinâmico e harmonioso, denominado de homeostase. A homeostasia é ameaçada quando os organismos são expostos a situações de perigo. Nestas situações, ocorrem uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais, que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes na tentativa de restabelecer a homeostase (CHARMANDARI *et al.*, 2005; CHROUSOS & GOLD, 1992; LÓPEZ *et al.*, 1999).

A responsividade adequada do sistema de estresse é um pré-requisito crucial para a ocorrência da sensação de bem-estar e de interações sociais positivas. Em contraste, a responsividade inapropriada desse sistema pode causar uma série de alterações endócrinas, metabólicas, auto-imunes e psiquiátricas (CHARMANDARI *et al.*, 2005).

Os principais sistemas neuroendócrinos envolvidos na resposta integrada aos agentes estressores são a divisão simpática do sistema neurovegetativo e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (AXELROLD & REISINE, 1984; AYALA *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 1992; KLIMES *et al.*, 2005). A ativação do sistema nervoso simpático resulta em liberação de noradrenalina (NA) a partir de terminais simpáticos e de adrenalina a partir da medula da glândula supra-renal. Já a ativação do eixo HPA resulta na liberação de glicocorticóides, como cortisol ou corticosterona, a partir do córtex da adrenal (AXELROLD & REISINE, 1984; DRONJAK *et al.*, 2004).

Em conjunto, as ações das catecolaminas e dos glicocorticóides induzem alterações em mecanismos vegetativos, como a função cardiovascular, que dão o suporte necessário para o organismo restabelecer o equilíbrio. Também há mobilização da produção e distribuição de substratos energéticos durante a resposta ao estresse (KOPIN, 1995). Essas ações asseguram a manutenção do organismo durante situações adversas, principalmente por disponibilizar tais substratos.

A maior parte da NA central secretada em resposta ao estresse origina-se no *Locus Coeruleos* (LC). O envolvimento desse núcleo nas respostas ao estresse é reforçado por dados que demonstram que nestas situações ocorre um aumento da expressão da proteína *Fos*, usada como marcador da atividade neuronal (CECCATELLI *et al.*, 1989; CULLINAN *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2004; SABBAN *et al.*, 2004), bem como por um aumento da expressão da tirosina hidroxilase (enzima limitante da produção de NA) nesta região (MELIA & DUMAN, 1991; SABBAN *et al.*, 2004).

Conforme Passerin *et al.* (2000), a ativação de neurônios do LC em resposta a vários estressores, em conjunto com seu grande número de eferências, sugere que esse núcleo tem função essencial na mediação das respostas ao estresse. De fato, a ativação do sistema noradrenérgico central em situações nas quais há alterações da homeostasia tem uma função integrativa na adaptação dessa mudança. Essa função integrativa ocorre, principalmente, por facilitar a transmissão em regiões do sistema nervoso central (SNC) envolvidas na regulação dos componentes comportamentais e fisiológicos da resposta ao estresse (MA & MORILACK, 2004).

A secreção de glicocorticóides durante a ativação do eixo HPA é devida à secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular (PVN)

localizado no hipotálamo. Esse núcleo é um centro integrador participante de funções endócrinas, vegetativas e comportamentais (KISS & AGUILERA, 2000; SILVERMAN, 1983; SWANSON & SAWCHENKO, 1983). Fibras contendo CRH, principalmente da região dorsomedial da subdivisão parvocelular do PVN, fazem projeções para a eminência mediana (EM), afetando a função da adeno-hipófise (SAPOLSKY *et al.*, 2000; SWANSON *et al.*, 1983).

Neurônios parvocelulares contendo CRH representam o componente central de uma cascata de eventos neuroendócrinos, que culminam com a liberação de corticotrofina (ACTH) a partir da adeno-hipófise e de glicocorticóides pela adrenal, frente a uma variedade de estressores (SAPOLSKY *et al.*, 2000). A liberação do ACTH também envolve secretagogos como a vasopressina (DENT *et al.*, 2000; HERMAN *et al.*, 1990). Além dessa função endócrina, estudos têm demonstrado que o sistema neural que contém CRH também está envolvido na regulação de comportamentos decorrentes de situações de estresse (CAMPBELL *et al.*, 2004; HAMMACK *et al.*, 2003a,b).

A atividade do eixo HPA pode ser modulada por neurotransmissores e hormônios, como por exemplo, a ocitocina (WINDLE *et al.*, 2004), a serotonina (WEIDENFELD *et al.*, 2002) e os esteróides gonadais (LUND *et al.*, 2004). Quanto aos esteróides gonadais, Lund *et al.* (2004) demonstraram que ratos tratados com benzoato de estradiol apresentam uma maior resposta da corticosterona e do ACTH ao estresse de contensão quando comparados com ratos que receberam propionato de diidrotestosterona.

A secreção de ACTH frente ao estresse pode ser controlada por outras estruturas neurais além do PVN. De fato, estudos têm relacionado o complexo amigdalóide à resposta da secreção de ACTH ao estresse (ALLEN & ALLEN, 1974; BEAULIEU *et al.*, 1987;

WEIDENFELD *et al.*, 2002). Beaulieu *et al.* (1987) demonstram uma função estimulatória do núcleo central da amígdala sobre a secreção de ACTH em resposta ao estresse por imobilização. Sabe-se que há ampla distribuição de eferências desse núcleo para o hipotálamo e para regiões autonômicas do tronco encefálico que medeiam os componentes cardiovasculares e pulmonares da reação de luta ou fuga (CURTIS *et al.*, 2002; FOLKOW *et al.*, 1982; SCHWABER *et al.*, 1980). Esse efeito estimulatório da amígdala pode envolver a participação do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe, que envia projeções para o PVN (WEIDENFELD *et al.*, 2002). Lesões no LC também diminuem a resposta do ACTH e da corticosterona ao estresse de contensão (ZIEGLER *et al.*, 1999).

Estudos também têm demonstrado a participação de outras regiões do sistema nervoso central (SNC), além do complexo amigdalóide, PVN e LC, durante o estresse. Por exemplo, o córtex pré-frontal, através da participação de receptores dopaminérgicos, processa resposta para diferentes tipos de estressores (SPENCER *et al.*, 2004). Além disso, segundo STAMP & HERBERT (2001), o estresse agudo aumenta a expressão de *Fos* no septo lateral, área pré-óptica lateral, núcleo próprio da estria terminal e núcleo da rafe, sugerindo a participação dessas regiões na resposta integrada ao estresse.

Como já salientado, a resposta ao estresse, necessária para que os seres vivos possam manter a homeostasia interna, bem como possam relacionar-se de modo adequado com o meio ambiente externo, envolve a participação de diversas estruturas neurais, de sistemas de neurotransmissores e de hormônios que atuam de modo harmônico para que ocorra o sucesso desse organismo nessa situação de ameaça. Porém, nem sempre a evocação dessa resposta providencia a homeostasia necessária para a sobrevivência adequada do indivíduo.

Estudos demonstraram que a exposição de ratos neonatos à elevada concentração de glicocorticóides pode desencadear uma série de alterações no SNC desses animais, incluindo diminuição de mitose, diminuição de mielinização e de neuromorfogênese (BOHN, 1980; TANAPAT *et al.*, 1998), assim como alterações neuroendócrinas (ERKINE *et al.*, 1979). Desse modo, é de grande importância que o animal neonato mantenha algum mecanismo capaz de proteger o SNC dessas alterações deletérias.

## **1.2 Período Hiporresponsivo ao Estresse**

A principal característica da fase de desenvolvimento pós-natal do sistema de estresse, no rato, é o chamado período hiporresponsivo ao estresse. Esta fase ocorre a partir do dia 4 ao dia 14 pós-natal e é caracterizada pela baixa concentração de corticosterona basal e pela inabilidade de responder a estressores com um aumento na secreção de ACTH e de corticosterona (MARTIN *et al.*, 1977; SUCHECKI *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1986). Conforme Levine (2001), a administração de glicocorticóides em neonatos promove efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação de vários sistemas, inclusive o SNC. Assim, a manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é essencial para sua maturação normal.

Algumas hipóteses têm sido propostas como causas do período hiporresponsivo ao estresse em ratos. Essas hipóteses incluem um impedimento da síntese, secreção e transporte de CRH (GRINO *et al.*, 1989) e a inabilidade da maioria dos estressores para superar um mecanismo de retroalimentação negativa aumentada (SCHMIDT *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 1986). Entretanto, muitos estudos têm demonstrado que fatores maternos são críticos para a regulação do eixo HPA no filhote e para a manutenção do período

hiporresponsivo ao estresse (LEVINE, 2001 e 2002; SUCHECKI *et al.*, 1993; SUCHEKI *et al.*, 1995).

Conforme Levine (2001) o comportamento maternal é responsável por inibir as respostas endócrinas ao estresse de filhotes após o nascimento. Segundo este estudo, durante o desenvolvimento, os sistemas periférico e central, que são responsivos ao estresse, tornam-se capazes de serem ativados. De fato, após vinte e quatro horas de separação maternal, ratos neonatos mostram elevadas concentrações basais de corticosterona no plasma e apresentam uma resposta aumentada da corticosterona e do ACTH ao estresse. A expressão do RNA mensageiro para *c-fos* no PVN também é aumentada em filhotes que foram separados da mãe. Dent *et al.* (2001) demonstraram que o sistema noradrenérgico central, através de neurônios do LC, também participa na modulação da resposta neuroendócrina ao estresse em ratos privados do contato com a mãe durante o período de desenvolvimento.

Em condições normais de interação entre a mãe e os filhotes, essas respostas ao estresse no neonato são suprimidas (LEVINE, 2002). Conforme Schmidt *et al.* (2004), a privação maternal promove mudanças dinâmicas em todos os componentes do eixo HPA do neonato. Assim, diferentes aspectos do eixo HPA do filhote parecem responder à separação maternal em diferentes tempos.

Segundo Levine (2001 e 2002), dentre os comportamentos realizados pela mãe que contribuem para a regulação do eixo HPA durante o desenvolvimento, a estimulação tátil parece ser capaz de prevenir a maior parte das alterações no SNC que ocorrem após a privação maternal. Já a amamentação é essencial para a manutenção da não-responsividade

da glândula adrenal e reduz a sensibilidade desta ao ACTH, e o contato passivo com a ninhada suprime a resposta ao estresse.

Durante o período hiporresponsivo ao estresse, tanto estimulações aparentemente inofensivas como a manipulação neonatal, quanto os estímulos estressores como frio e choque elétrico, induzem alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (LEVINE, 1994). Assim, intervenções realizadas durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal podem modificar o padrão comportamental do animal adulto e, portanto, os mecanismos responsáveis pela regulação deste.

### *1.3 Estimulação Neonatal*

Experiências sensoriais no início da vida pós-natal podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Dentre as influências ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural estão os vários tipos de estímulos estressantes que atuam sobre o organismo em desenvolvimento (GONZÁLES *et al.*, 1990 e 1994).

A estimulação neonatal tem sido utilizada como um modelo experimental para examinar o modo pelo qual alterações ambientais no início da vida podem afetar estruturas neurais levando a modificações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (DENENBERG, 1964; LEVINE, 1962; LEVINE, 1994; MEERLO *et al.*, 1999; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004). Em ratos, a estimulação neonatal consiste da manipulação dos filhotes, geralmente por alguns minutos, durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal. Na idade adulta, esse procedimento aparentemente inofensivo realizado na infância tem como consequência uma série de alterações comportamentais e endócrinas. Essas alterações caracterizam-se basicamente por uma diminuição do medo a

ambientes novos e uma menor secreção de corticosterona frente a novos estímulos estressantes (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993; NUÑES *et al.*, 1996; PADOIN *et al.*, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004). No presente estudo, utilizamos o modelo de manipulação neonatal de um minuto durante os dez primeiros dias de vida do filhote.

Conforme Meerlo *et al.* (1999), animais adultos que foram manipulados durante as primeiras semanas de vida apresentam uma forte atenuação da ansiedade induzida pelo estresse quando comparados com o grupo controle. Em testes com labirinto em cruz elevado, por exemplo, os animais manipulados permanecem significativamente mais tempo nos braços abertos do que o grupo controle, o que é uma indicação de menor ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985; SEVERINO *et al.*, 2004).

A diferença na ansiedade induzida pelo estresse é acompanhada por mudanças consistentes na resposta neuroendócrina. De fato, a manipulação durante o período pós-natal pode induzir efeitos estáveis sobre vários sistemas neurais que controlam comportamentos e respostas neuroendócrinas (LEVINE *et al.* 1967; LUCION *et al.*, 2003; MEERLO *et al.*, 1999; PADOIN *et al.*, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que ratos manipulados no período neonatal, quando adultos, apresentam uma redução da síntese e da secreção de CRH, uma menor secreção de adrenalina, prolactina (PRL) e corticosterona em resposta ao estresse. Além disso, esses animais apresentam um retorno mais rápido às concentrações basais desses hormônios após o término do estímulo (LEVINE *et al.*, 1967; LIU *et al.*, 2000; SEVERINO *et al.*, 2004). Isso está de acordo com a redução da ansiedade comportamental (MEERLO *et al.* 1999, SEVERINO *et al.* 2004). Assim, estímulos ambientais durante o período neonatal têm efeitos duradouros sobre o

comportamento emocional e a reatividade ao estresse em animais adultos (DENENBERG, 1964; LEVINE, 1962; SEVERINO *et al.*, 2004).

Há evidências que uma menor secreção de CRH frente ao estresse é o que promove as várias diferenças fisiológicas e comportamentais observadas no rato adulto estimulado na infância (MEANEY *et al.*, 1991; PLOTSKY & MEANEY, 1993). O CRH tem uma importante função nas respostas integradas do estresse e possui uma imensa variedade de efeitos neuroendócrinos e comportamentais, sendo que muitos dos quais ocorrem diretamente no SNC (DUNN & BERRIDGE, 1990; HAMMACK *et al.*, 2003a,b; HUGIN-FLORES *et al.*, 2003).

Sabe-se que o CRH é um importante mediador da ansiedade e, além disso, interage com o sistema neurovegetativo para influenciar a liberação de catecolaminas (ASBACH *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 1992; SWIERGIEL *et al.*, 1993). Também é bem conhecida sua função de regulador da resposta da corticosterona ao estresse (DUNN & BERRIDGE, 1990). Desse modo, uma menor secreção desse hormônio em animais manipulados no período neonatal, após a exposição aos agentes estressores, poderia explicar a maioria das alterações comportamentais e neuroendócrinas em relação aos animais não-manipulados.

Estudos demonstraram que há uma elevação na concentração de receptores para corticosteróides no hipocampo e córtex frontal de ratos manipulados no período neonatal. Assim, a resposta atenuada da corticosterona pode ser consequência de um aumento da sensibilidade ao mecanismo de retroalimentação negativa (LIU *et al.*, 1997; MEANEY *et al.*, 1985 e 1994). Essa resposta atenuada da corticosterona pode proteger os animais da perda de células hipocâmpais e também pode impedir alterações cognitivas associadas com a idade (MEANEY *et al.*, 1988). Também há dados demonstrando que as concentrações

basais do RNA mensageiro para o CRH e o conteúdo de CRH no hipotálamo de animais manipulados logo após ao nascimento são menores quando comparados aos animais não-manipulados (PLOTSKY & MEANEY, 1993).

Considerando as alterações comportamentais observadas em ratos estimulados no período neonatal, Padoin *et al.* (2001) sugerem que a estimulação neonatal poderia afetar a interpretação de estímulos ambientais. Neste estudo, ratos manipulados (machos e fêmeas) logo após o nascimento foram avaliados quando adultos no teste de campo aberto. Esses animais, além de apresentarem um aumento geral da atividade de locomoção no teste de campo aberto na ausência do predador, exploraram ativamente a área quando um gato foi colocado na arena. O aumento da locomoção em um ambiente novo, que representa um fator indicativo de menos medo, é um efeito comportamental bem conhecido da manipulação neonatal (DENELSKY & DENENBERG, 1967; DENENBERG & SMITH, 1963; LEVINE *et al.*, 1967).

Considerando o resultado de Padoin *et al.* (2001) referente à atividade exploratória na área do predador, é possível concluir que nesta situação a interferência realizada pelo pesquisador durante o período neonatal causa uma redução na inibição comportamental. Desse modo, esse procedimento realizado logo após o nascimento pode colocar em risco a integridade do animal.

Padoin *et al.* (2001) também observaram um aumento do comportamento agressivo maternal em ratas lactantes que foram submetidas à estimulação neonatal. Sabe-se que o comportamento agressivo maternal tem a finalidade de proteger os filhotes contra possíveis injúrias provocadas por predadores ou intrusos que invadem a área do ninho (CLUTTON-BROCK, 1991; STERN & KOLUNIE, 1993). Assim, ao contrário do observado no teste de

campo aberto com predador no qual o animal coloca a sua vida em risco, essa alteração comportamental (aumento do comportamento agressivo maternal) pode aumentar a sobrevivência da ninhada.

O padrão de comportamento alimentar em ratos adultos também se apresenta modificado devido à estimulação neonatal. Esses animais apresentam um apetite aumentado por alimento doce que não é modificado após a administração de diazepam, sugerindo que essa alteração comportamental não é devida à ansiedade aumentada (SILVEIRA *et al.*, 2004 e 2005). Dados sugerem que, em ratos, vários agentes atuam para regular o comportamento alimentar, incluindo agonistas adrenérgicos, opióides, neuropeptídeo Y e galanina (BLUNDELL, 1991). Então, possivelmente a estimulação neonatal atua também interferindo em algum desses sistemas para modificar o padrão de ingestão alimentar nesses animais.

Além de promover alterações na atividade do eixo HPA, a estimulação neonatal, através do procedimento de manipulação ou de estimulação aversiva (exposição da ninhada à luz, à baixa temperatura ou barulho) pode causar modificações no eixo reprodutivo. De fato, machos e fêmeas que foram submetidos à estimulação neonatal apresentam uma redução do comportamento sexual (PADOIN *et al.*, 2001) e as fêmeas manipuladas por 1 minuto durante os primeiros dias após o nascimento têm ciclos anovulatórios (GOMES *et al.*, 1999). Desse modo, a estimulação neonatal pode afetar a capacidade reprodutiva desses animais, possivelmente por alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG).

Através da análise de alguns resultados apresentados em estudos de estimulação neonatal, podemos concluir que este procedimento realizado no início da vida pós-natal

pode causar efeitos deletérios na vida do animal, que são observados na idade adulta. Como citado anteriormente, ratos manipulados na fase neonatal apresentam redução da capacidade reprodutiva, maior exposição ao predador e, além disso, têm diminuição no número de células no LC (GOMES *et al.*, 1999; LUCION *et al.*, 2003; PADOIN *et al.*, 2001). Por outro lado, Rodrigues *et al.* (2004) demonstraram que a estimulação tátil durante o período neonatal, que é considerada um tipo de manipulação, exerce ação neuroprotetiva contra danos induzidos pela hipóxia e isquemia no hipocampo.

Cabe salientar que a estimulação neonatal pode alterar o funcionamento de sistemas neurais que controlam comportamentos e respostas neuroendócrinas, justamente porque é realizada em um período no qual o sistema nervoso está mais suscetível a mudanças. De fato, em mamíferos, o período próximo ao nascimento é caracterizado pela ocorrência de processos dinâmicos no sistema nervoso e no restante do organismo (MEERLO *et al.*, 1999).

Tem sido demonstrado que, em ratos, as duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural. Assim, processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem no sistema nervoso neste período (KNUSEL *et al.*, 1994; MISTRETTA & BRADLEY, 1978). Conseqüentemente, a estimulação precoce, que é um processo dinâmico (MEERLO *et al.*, 1999), atua sobre o desenvolvimento deste sistema e induz uma variedade de mudanças neuroquímicas e comportamentais no adulto (GONZÁLES *et al.*, 1990). Essas mudanças podem representar a causa do sucesso ou insucesso deste indivíduo na vida adulta.

## 1.4 A relação mãe-filhote

Muitas evidências indicam que a exposição de crianças no início da vida a eventos adversos, como a negligência e o abuso, pode aumentar a vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta (HEIM *et al.*, 1997 e 2000). Assim, cada vez mais estudos têm focalizado seus objetivos na explicação dos efeitos de influências ambientais no início da vida sobre a fisiologia e o comportamento do animal na fase adulta.

Um procedimento bastante utilizado para tais estudos é o uso da separação maternal no período neonatal, em ratos. Esse modelo serve para avaliar como eventos adversos no início da vida atuam sobre a fisiologia e o comportamento observado no animal adulto. Neste procedimento, ratos neonatos são removidos de suas mães, diariamente, por algumas horas durante as duas primeiras semanas de vida (BOCCIA & PEDERSEN, 2001; PLOTSKY & MEANEY, 1993).

Conforme Kuhn & Schanberg (1998), para muitas espécies a mãe representa fonte de alimentação, calor, proteção e educação, essenciais para o desenvolvimento de habilidades sociais normais. Desse modo, os mamíferos recém-nascidos necessitam de cuidados da mãe para que possam sobreviver. Por exemplo, ratos neonatos durante os primeiros dias de vida requerem alimentação praticamente contínua, porém os períodos de ausência maternal vão se tornando mais longos gradualmente até a maturidade.

Interações normais entre a mãe e o filhote são críticas para o crescimento normal e o desenvolvimento comportamental na maioria das espécies de mamíferos. O distúrbio dessa relação causa marcadas respostas comportamentais e fisiológicas, incluindo mudanças na temperatura corporal, atividade locomotora, frequência cardíaca e reatividade emocional (HINDE & SPENCER-BOOTH, 1971; LEVINE 1994, 2001 e 2002).

Assim, alterações ou interferências nesta relação mãe-filhote no período neonatal, como a manipulação ou a separação maternal, podem provocar um distúrbio nesta interação. Há, por exemplo, modificação no comportamento da mãe em relação a sua prole. Em geral mães de filhotes manipulados despendem mais tempo no cuidado da prole, sendo que um dos comportamentos que se alteram é o de lambar os filhotes. As mães de filhotes manipulados no período neonatal lambem mais a prole do que as mães de filhotes não-manipulados. Sabe-se que este comportamento da mãe em relação ao filhote pode alterar o desenvolvimento do SNC do recém-nascido (FRANCIS *et al.*, 1994; LEVINE, 1994; LEVINE, 2001; MEANEY *et al.*, 1993).

Há dados mostrando que, no rato, ocorrem variações naturais no cuidado maternal que alteram permanentemente o comportamento e a regulação neuroquímica dos filhotes (BREDY *et al.*, 2003; CHAMPAGNE, *et al.*, 2003; FRANCIS *et al.*, 2002). Por exemplo, há mães que naturalmente realizam os comportamentos de lambida e de dorso arqueado com maior frequência, essas mães são denominadas "high", quando comparadas com mães que naturalmente realizam esses comportamentos com uma frequência menor, mães denominadas "low" (LIU *et al.*, 2000).

Segundo Caldji *et al.* (1998), filhotes machos de mães "high" são adultos que apresentam menos medo e ansiedade quando comparados com ratos que foram cuidados por mães "low". Essa menor ansiedade pode ser devida a maior ativação do receptor benzodiazepínico na amígdala e menor ativação do receptor para o CRH no LC observadas nesses animais. Conforme Bredy *et al.* (2003), o cuidado maternal aumentado também pode influenciar a função cognitiva dos filhotes na vida adulta. Estudos demonstram que filhotes

de mães "high" apresentam uma expressão aumentada do receptor NMDA no hipocampo, assim como a sinaptogênese está aumentada nessa região (LIU *et al.*, 2000).

Tendo em vista que o procedimento de manipulação neonatal interfere na relação mãe-filhote e o conhecimento, como já citado, que mães de filhotes manipulados no período neonatal alteram o seu padrão comportamental (lambem mais seus filhotes) aproximando-se do comportamento apresentado por mães "high", postula-se que seria a perturbação nesta relação mãe-filhote que induziria o padrão comportamental e neuroendócrino observado na vida adulta do rato manipulado no período pós-natal.

## **1.5 O Ciclo Estral da Rata**

Muito do conhecimento que possuímos sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o ciclo estral da rata (FREEMAN, 1994). Este ciclo é composto por quatro fases (proestro, estro, metaestro ou diestro I, diestro II), que exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais (estrógeno e progesterona), de PRL e gonadotrofinas (o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH)) (FREEMAN, 1994; MATTHEWS & KENYON, 1984) (figura 1) e, além disso, expressam mudanças na mucosa vaginal, com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período (figura 2). Essas variações hormonais estão associadas a alterações comportamentais. Por exemplo, na noite da fase proestro a rata torna-se sexualmente receptiva ao macho (GONZALEZ-FLORES & ETGEN, 2004; PFAFF *et al.*, 1994). O proestro permanece de doze a catorze horas e precede o estro. Já essa última fase permanece de vinte e cinco a vinte e sete horas e é durante este período, mais precisamente durante a madrugada do estro, que ocorre a

ovulação. Caso não ocorra a concepção, após o estro existe um período de recuperação, denominado de metaestro ou diestro I, cuja duração é de seis a oito horas, seguido pelo diestro II, que dura de cinquenta e cinco a cinquenta e sete horas, onde se reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (FREEMAN, 1994).

Conforme Smith *et al.* (1975), o padrão de secreção da PRL, do LH e do FSH é similar durante a maior parte do ciclo estral (Figura 1). As concentrações desses hormônios permanecem baixas e não são modificadas até à tarde e início da noite do proestro. As concentrações plasmáticas de FSH e de PRL, diferente do LH, apresentam um novo aumento no estro (pico secundário) (RINGSTROM *et al.*, 1997; SZABO *et al.*, 1996; SZAWKA & ANSELMO-FRANCI, 2004). O aumento do FSH no plasma durante o estro ocorre no período da manhã, segundo Hoak & Schawartz (1980) esse pico secundário de FSH é necessário para o recrutamento de folículos para o próximo ciclo, pois o recrutamento folicular foi bloqueado quando o pico secundário de FSH foi impedido. Já o pico secundário de PRL ocorre na tarde do estro e pode estar relacionado à função luteotrófica (SZAWKA & ANSELMO-FRANCI, 2004).

Diferente do padrão de secreção da PRL e das gonadotrofinas, a concentração plasmática de estradiol aumenta no diestro I e esse aumento é mantido até à tarde do diestro II, quando a concentração de estradiol aumenta até alcançar valores de pico no proestro. Em relação à progesterona, seu padrão de secreção durante o ciclo estral consiste de dois aumentos importantes, durante o diestro e na tarde do proestro (Figura 1). A queda na concentração de progesterona no plasma durante a manhã do diestro II coincide com a regressão do corpo lúteo do ciclo (FREEMAN, 1994; SMITH *et al.* 1975).

Os esteróides gonadais secretados durante o ciclo estral têm função essencial na modulação dos processos relacionados à reprodução em fêmeas. Eles atuam no hipotálamo, hipófise e ovários para coordenar a secreção cíclica de gonadotrofinas e, portanto, a ovulação (CONNEELY, 2001; HERBISON, 1998; MAHESH & BRANN, 1998). De fato, a ovulação requer picos de gonadotrofinas e PRL no período pré-ovulatório (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; ISHIKAWA, 1992; SCHWARTZ, 2000).

A variação das concentrações dos esteróides gonadais funciona como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório desses hormônios (CONNEELY, 2001; ISHIKAWA, 1992; SCHWARTZ, 2000). Sendo assim, o aumento de estrógeno no diestro II induz a um aumento na secreção de gonadotrofinas na tarde do proestro, ou seja, a ovulação depende do mecanismo de retroalimentação positiva que os esteróides gonadais exercem sobre o eixo hipotálamo-hipófise (FREEMAN, 1994; HERBISON, 1998). A elevada concentração plasmática de estradiol durante o período pré-ovulatório parece fornecer um sinal permissivo para que ocorra o pico do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) e assim, o pico de LH (HERBISON, 1998; LEVINE, 1997; MAHESH & BRANN, 1998).

O mecanismo pelo qual o estrógeno estimula a secreção de LHRH ainda não está claro. Entretanto, muitos neurotransmissores parecem participar deste mecanismo (PETERSEN *et al.*, 2003), dentre esses a angiotensina II (Ang II) e a NA (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; HELENA *et al.*, 2002; STEELE, 1992). Dados indicam que o sistema noradrenérgico pode ser um importante mediador do mecanismo de retroalimentação positiva dos esteróides gonadais. Lesões no LC na manhã do proestro diminuem o conteúdo de NA na área pré-óptica medial (APOM) e no hipotálamo médio basal, bloqueando o pico pré-ovulatório de LH e de FSH e, portanto, a ovulação (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997).

## 1.6 Comportamento Sexual em Ratas

Em ratos, o comportamento sexual da fêmea que ocorre na noite da fase proestro inclui uma série de componentes considerados proceptivos, os quais incluem investigação dos genitais do macho, pequenas corridas e saltos, vocalizações e contatos físicos efêmeros; e a expressão do comportamento de lordose (ELLINGSEN & AGMO, 2004; GONZALEZ-FLORES & ETGEN, 2004; PFAFF *et al.*, 1994; XIAO & BECKER, 1997). A lordose é a postura receptiva da fêmea na qual há flexão dorsal da coluna vertebral quando o macho realiza o seu comportamento de monta. A expressão dessa postura é o indicativo mais proeminente de que a rata está sexualmente receptiva (PFAFF *et al.*, 1994).

Dentre os componentes do comportamento sexual da rata, é a lordose que permite a inserção peniana pelo macho e, portanto, a ejaculação. Assim, a apresentação desse comportamento pela fêmea tem extrema importância para a ocorrência do sucesso reprodutivo nesses animais. Mas para isto é necessário que o macho providencie estimulação adequada de receptores sensoriais localizados nos flancos e no períneo da rata. Desse modo, a informação a partir de neurônios sensoriais responsivos à pressão chegará na região dorsal da medula espinhal e o reflexo de lordose ocorrerá (ETGEN & MORALES, 2002; PFAFF *et al.*, 1994).

Através da inserção peniana que é facilitada pela postura receptiva da fêmea, o macho realiza a estimulação vaginocervical durante a cópula. Essa estimulação induz, na fêmea, um aumento na concentração plasmática de hormônios como a PRL e a progesterona necessários para a ocorrência do sucesso da prenhez (ADLER, 1968; ADLER *et al.*, 1970; CAMERON *et al.*, 2003; CHESTER & ZUCKER, 1970; FORCELLEDO *et al.*, 1982). Um aumento agudo na concentração de PRL plasmática ocorre vinte minutos

após a cópula, mas a função desse aumento da PRL no plasma ainda é incerta. Já os picos de PRL que ocorrem duas vezes ao dia, após a cópula, são necessários para prolongar a secreção lútea de progesterona e permitir assim o sucesso da prenhez (CAMERON *et al.*, 2003). Quanto à progesterona, múltiplas intromissões iniciam um reflexo neuroendócrino que resulta na secreção adequada desse hormônio permitindo a implantação do blastocisto (ADLER, 1968; ADLER *et al.*, 1970).

A expressão da lordose requer a atividade coordenada de neurônios localizados em várias regiões do SNC como o hipotálamo ventromedial (VMH), a amígdala medial (AMe), a área pré-óptica, o septo lateral, a substância cinzenta do mesencéfalo e o bulbo olfatório (FLANAGAN-CATO, 2001; NANCE *et al.*, 1975; NOCETTO *et al.*, 2004; PFAFF *et al.*, 1994; RAJENDREN & MOSS, 1993 e 1994; RAJENDREN *et al.*, 1991; RETTORI *et al.*, 1997). Dentre essas regiões, o VMH é considerado o principal sítio envolvido com a facilitação da lordose, cuja atividade é modulada por estrógeno e progesterona (BARFIELD *et al.*, 1982). De fato, o comportamento de lordose é regulado por interações entre estruturas neurais responsáveis pela sua expressão e os esteróides gonadais (GONZALEZ-FLORES *et al.*, 2004; PFAFF *et al.*, 1994; PFAUS *et al.*, 1996; YAMANOUCHI *et al.*, 1985).

Assim como o estrógeno e a progesterona influenciam a receptividade sexual, o pico de PRL que ocorre na tarde do proestro também exerce uma importante função na modulação do comportamento sexual de ratas. Foi demonstrado que a supressão da liberação de PRL nesta fase, devido à administração de um agonista dopaminérgico, reduz de modo acentuado a receptividade sexual na rata (WITCHER & FREEMAN, 1985). Assim o estrógeno, a progesterona e a PRL são os hormônios que atuam de modo sincronizado para a organização do comportamento sexual da fêmea que ocorre na noite do

proestro (DRAGO & LISSANDRELLO, 2000; GONZALEZ-FLORES *et al.*, 2004; PFAFF *et al.* 1994; WITCHER & FREEMAN, 1985).

Quanto à ação dos esteróides gonadais, mais precisamente em relação à participação da progesterona, estudos têm demonstrado que os receptores de progesterona podem ter uma participação mais efetiva do que o próprio esteróide na regulação do comportamento sexual. De fato, esses receptores podem ser ativados de modo independente do ligante, ou seja, na ausência da progesterona. Por exemplo, o neurotransmissor dopamina, pode ligar-se ao receptor de progesterona e exercer suas ações na mediação da expressão do comportamento sexual da rata (AUGER, 2001; BLAUSTEIN, 2003; MANI, 2001).

Além de modular a ação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores que regulam a expressão da lordose incluindo GABA, noradrenalina, opióides e óxido nítrico (ETGEN *et al.* 1999; GONZALEZ-FLORES & ETGEN, 2004) os esteróides gonadais são capazes também de desinibir o controle inibitório tônico exercido pelo prosencéfalo sobre o comportamento sexual da rata. Assim, esses hormônios facilitam a ocorrência da lordose por aumentar a atividade neural em neurônios do VMH que se projetam para a substância cinzenta do mesencéfalo (ETGEN *et al.*, 1999; PFAFF *et al.*, 1994; SATOU & YAMANOUCHI, 1999; TSUKAHARA & YAMANOUCHI, 2002).

A inibição sobre a lordose pode ser realizada por neurônios localizados no septo lateral já que a ocorrência desse comportamento é facilitada por lesões nessa região (NANCE *et al.*, 1975). Essa influência inibitória do septo lateral sobre a lordose ocorre via projeções para a substância cinzenta do mesencéfalo (KONDO *et al.*, 1993; TSUKAHARA & YAMANOUCHI, 2002). Então, conexões neurais entre o sistema límbico, incluindo o

hipotálamo e o mesencéfalo, são críticas para a regulação do comportamento sexual da fêmea (TSUKAHARA *et al.*, 2003).

## **1.7 Estresse e Função Reprodutiva em Fêmeas**

O eixo HPA quando ativado pelo estresse exerce uma influência inibitória sobre o sistema reprodutor feminino (CHROUSOS *et al.*, 1998; KALANTARIDOU *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que o CRH, a vasopressina e a  $\beta$ -endorfina inibem a secreção de LHRH (CHEN *et al.*, 1992; FERIN, 1999) e que os glicocorticóides deprimem a função do eixo gonadal em nível de hipotálamo, hipófise e útero (RABIN *et al.*, 1990; SAKAKURA *et al.*, 1975).

De fato, a administração intracerebroventricular de CRH em várias espécies, incluindo ratos e macacos, inibe a liberação de LH (CATES *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 1990), pois o CRH inibe o pulso gerador de LHRH necessário para a secreção de LH e de FSH. Já a administração central de antagonistas do CRH, reverte o efeito de supressão da liberação pulsátil de LH devido a vários estímulos estressantes (CATES *et al.*, 2004; TSUKAHARA *et al.*, 1999). Esses efeitos do eixo HPA são responsáveis pela instalação da amenorréia causada pelo estresse, que pode ser observada em mulheres durante situações de ansiedade e depressão (CHROUSOS *et al.*, 1998).

Sabe-se que terminais de neurônios CRH estabelecem contatos com neurônios catecolaminérgicos do LC (van BOCKSTAELE *et al.*, 1996) e que células imunorreativas para tirosina hidroxilase neste núcleo, expressam receptores para o CRH (SAUVAGE & STECKLER, 2001). Assim, Mitchell *et al.* (2005) considerando o fato de que o LC tem influência considerável na regulação do pulso gerador de LHRH e, portanto, sobre o pico

pré-ovulatório de LH (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1999; HELENA *et al.*, 2002), sugerem que a inervação de neurônios do LC por fibras contendo CRH tem importante função nas respostas fisiológicas normais da supressão induzida pelo estresse do pulso gerador de LHRH.

O LC faz projeções para a área pré-óptica e para o núcleo supraquiasmático, que estão envolvidos na regulação da secreção cíclica de hormônios da hipófise anterior (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; JONES & MOORE, 1977). Assim, neurônios CRH podem atuar sobre o eixo gonadal indiretamente, via neurônios noradrenérgicos do LC e diretamente, pois o CRH e a vasopressina podem agir de modo direto sobre os neurônios LHRH, inibindo-os (CHROUSOS *et al.*, 1998; RIVEST & RIVIER, 1995).

## **1.8 Manipulação Neonatal e Função Reprodutiva**

A função reprodutiva não é apenas afetada por eventos estressantes que ocorrem na vida adulta. Sabe-se que interferências no ambiente neonatal de filhotes são capazes de modificar a responsividade do eixo HPA a estímulos estressantes durante a fase adulta, como o procedimento de manipulação neonatal (DENENBERG, 1964; MEERLO, 1999), e também podem alterar o funcionamento do eixo HPG. De fato, estudos têm demonstrado que ratos, machos e fêmeas que foram manipulados na fase neonatal apresentam diminuição do comportamento sexual (PADOIN *et al.*, 2001), assim como as ratas têm ciclos anovulatórios, embora regulares (GOMES *et al.*, 1999).

Em relação ao comportamento sexual, conforme Padoin *et al.* (2001) ratos machos manipulados no período neonatal, quando adultos, têm a média da frequência de

intromissões menor do que machos não-manipulados. Assim como o número de ratos que não apresentaram o comportamento de intromissão foi maior no grupo manipulado (PADOIN *et al.*, 2001). Já em fêmeas, a redução do comportamento sexual está relacionada a uma diminuição da frequência de lordose observada quando essas são submetidas, durante o estro comportamental, a presença de um rato macho com experiência sexual e previamente selecionado.

Outros estudos também têm demonstrado a influência de alterações no ambiente precoce do animal sobre a função reprodutiva. Ward (1972) mostrou que machos submetidos ao frio durante a fase de diferenciação do sistema nervoso apresentam alterações no comportamento copulatório. Já conforme González *et al.* (1994), a manipulação neonatal é capaz de prevenir a indução do diestro constante causada pelo uso de um modelo de estresse crônico.

A instalação da puberdade também se apresenta alterada em ratas devido à manipulação neonatal. A abertura vaginal, que é um índice de maturação sexual em ratas, ocorre mais tarde nesses animais quando comparado com ratas não-manipuladas (GOMES, 2001; SIECK & RAMALEY, 1975).

Como previamente salientado esses dados referentes aos efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento sexual, ovulação e instalação da puberdade sugerem que esse procedimento realizado no início do período pós-natal não altera somente a atividade do eixo HPA, mas também altera funções relacionadas ao eixo HPG.

## **1.9 Sistema Angiotensinérgico Central: Implicações com o Estresse e Reprodução**

O octapeptídeo Ang II é conhecido como um peptídeo efector circulante do sistema renina-angiotensina, e está classicamente envolvido no controle sistêmico da pressão sanguínea e do equilíbrio hidroeletrólítico (SAAVEDRA, 1992; TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991). A Ang II circulante é diferente de outros hormônios, pois é formada no sangue através da interação com proteínas como a renina que atua sobre o angiotensinogênio para formar Ang I, e a enzima conversora de angiotensina que forma o octapeptídeo fisiologicamente ativo, a Ang II (GANONG, 1994; REID, 1977).

Além do sistema periférico, estudos têm demonstrado a existência de um sistema renina-angiotensina central. De fato, todos os componentes do sistema renina-angiotensina têm sido descritos no SNC (GONONG, 1994; LENKEI et al., 1997; PHILLIPS, 1997; REID, 1977; SAAVEDRA, 1992). A Ang II central pode atuar como neurotransmissor ou neuromodulador e, desse modo, influenciar a excitabilidade de neurônios (LI & FERGUSON, 1993; SAAVEDRA, 1992, SAAVEDRA et al., 2004).

Da mesma forma que o sistema noradrenérgico, o sistema angiotensinérgico central tem sido referido como importante modulador das funções relacionadas com a resposta do estresse, assim como no controle da secreção de hormônios envolvidos com processos reprodutivos femininos (DORNELLES e FRANCI 1998ab; DUMONT et al., 1999; FRANCI et al., 1990; STEELE, 1992; STEELE et al., 1983 e 1985; PAN, 2004 PHILLIPS, 1987; PHILLIPS et al., 1992). A Ang II também pode influenciar via amígdala medial o comportamento sexual de fêmeas (CECCONELLO, 2005) e de machos (BREIGEIRON et al., 2002). De fato, esses estudos mostraram uma ação inibitória da Ang II sobre o comportamento sexual quando microinjetada neste núcleo. Cabe salientar que todas essas

ações da Ang II no SNC ocorrem através de receptores associados à membrana (REAGAN et al., 1994).

Há dois tipos de receptores farmacologicamente classificados como AT1 e AT2 (TIMMERMANS et al., 1993), sendo que no encéfalo de adultos predomina o receptor AT1 (MURPHY et al., 1991). Receptores AT2 foram identificados no LC de animais adultos sugerindo participação na plasticidade de circuitos neurais e adaptação a respostas de estresse (DUMONT et al., 1999).

No rato e no camundongo foram identificados dois subtipos para o receptor AT1 que são denominados de AT1A e AT1B. Esses dois subtipos apresentam a seqüência de aminoácidos 95% idêntica (de GASPARO et al., 2000). Os receptores AT1 do sistema angiotensinérgico central estão relacionados a conhecidas ações centrais da Ang II no controle da pressão sangüínea e do balanço hidroeletrólítico (SAAVEDRA, 1992), adaptação ao estresse (DUMONT et al., 1999; PAN, 2004; SAAVEDRA et al., 2004) e estão envolvidos com o controle da função reprodutiva em fêmeas (DORNELLES & FRANCI, 1998b; SPETH et al., 1999).

Em relação à função da Ang II central na resposta ao estresse, conforme Saavedra (2004) a estimulação de receptores AT1 no PVN, EM, hipófise e adrenal resulta na síntese e secreção aumentada de CRH, secreção de ACTH e de corticosterona. Estímulos psicológicos e sensoriais através de vias envolvendo o córtex cerebral, complexo amigdalóide e hipocampo também atuam para que ocorra a ativação do eixo HPA em diferentes níveis.

Nishimura *et al.* (2000) demonstram que o bloqueio do receptor AT1 em regiões do sistema nervoso como o PVN impede a resposta durante o estresse. Também há várias

evidências de que os glicocorticóides regulam a expressão desses receptores no PVN (AGUILERA *et al.*, 1995; CASTRÉN & SAAVEDRA, 1988 e 1989; LEONG *et al.*, 2001). Por exemplo, a adrenalectomia reduz a expressão do RNA mensageiro para o receptor AT1 nesse núcleo e a administração de glicocorticóides reverte esse efeito (AGUILERA *et al.*, 1995).

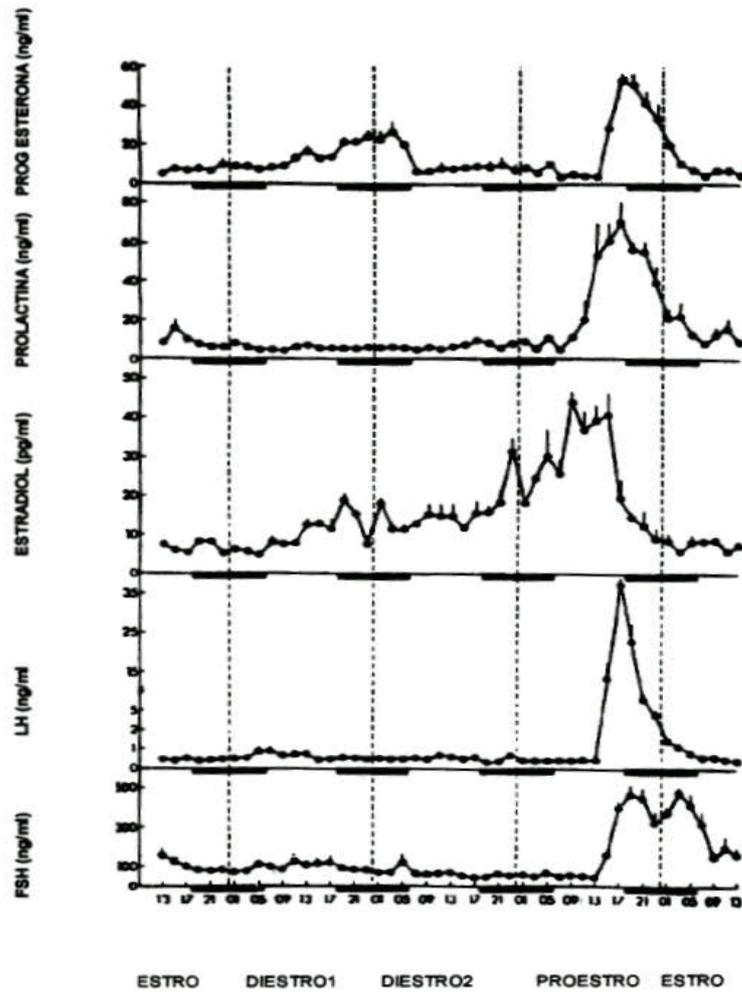
Assim como a interação da Ang II com o eixo do estresse está bem caracterizada, há vários dados sobre a relação desse peptídeo com a função reprodutiva (BREIGEIRON *et al.*, 2002; DONADIO *et al.*, 2004; DORNELLES & FRANCI, 1998ab; STEELE, 1992). O sistema angiotensinérgico central exerce função excitatória na regulação da secreção de LHRH e, portanto, de LH e inibitória sobre a secreção de PRL em ratas (DORNELLES & FRANCI, 1998ab; FRANCI *et al.*, 1990 e 1997; GANONG, 1994; STEELE, 1992).

Tem sido demonstrado que a administração sistêmica de Ang II aumenta a secreção de PRL enquanto a microinjeção intracerebroventricular (STEELE, 1992) e na MPOA (DORNELES & FRANCI, 1998a) inibe a secreção desse hormônio. Terminais nervosos contendo Ang II apresentam-se em íntima localização com corpos celulares dopaminérgicos no ARC, sendo este, provavelmente, a causa da inibição da secreção da PRL (MOUNZIH *et al.*, 1994). A queda na secreção desse hormônio pode ser reduzida utilizando bloqueadores AT1 e AT2 administrados centralmente (DORNELLES & FRANCI, 1998b; STEPHENSON & STEELE, 1992). Assim, a ação estimulatória da Ang II sobre a liberação de PRL é direta no lactotrofo enquanto a ação inibitória é indireta, via modulação de neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado (JÖHREN *et al.*, 1997). As ações centrais da Ang II sobre a função reprodutiva podem ser moduladas por estradiol e progesterona. Por exemplo, no ARC, envolvido com o controle da secreção de PRL

(DONADIO *et al.*, 2004), a expressão do RNA mensageiro para o receptor AT1A é induzida por esteróides ovarianos (JÖHREN *et al.*, 1997) e a ação do sistema angiotensinérgico central que regula a secreção de LH é modificada devido à ação desses hormônios ovarianos (STEELE, 1992; STEELE *et al.*, 1985).

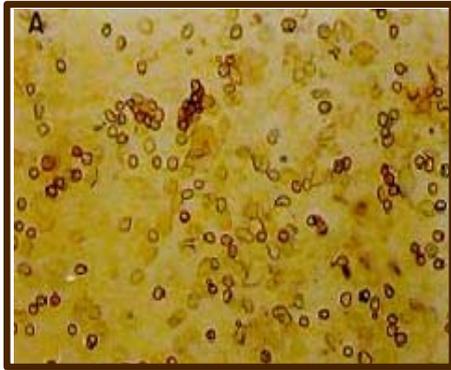
Outros dados fornecem suporte ao fato de que a Ang II central está envolvida com a secreção de LHRH e de LH na tarde do proestro, participando, desse modo, do controle do processo de ovulação em ratas. Por exemplo, estudos demonstraram que há um pico de Ang II no hipotálamo às treze horas e trinta minutos do proestro em ratas (PHILLIPS *et al.*, 1992) e que o conteúdo de Ang II hipotalâmica no proestro é maior do que quando comparado com o diestro em ratas ciclando (GHAZI *et al.*, 1994).

Assim, várias evidências indicam que o sistema angiotensinérgico central atua para manter o bem estar do organismo. Para isso, além de participar da resposta necessária para que o organismo restabeleça a homeostasia durante situações de estresse, atua em conjunto com outros sistemas para providenciar a ocorrência do sucesso reprodutivo do indivíduo.

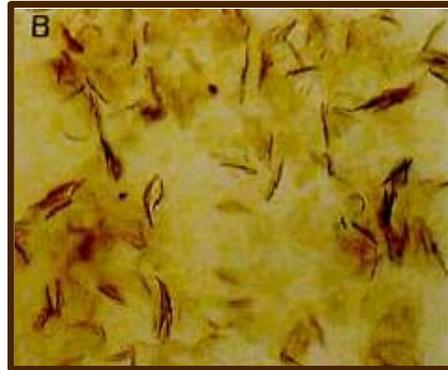


**Figura 1.** Variações hormonais nas diferentes fases do ciclo estral da rata (SMITH *et al.* 1975).

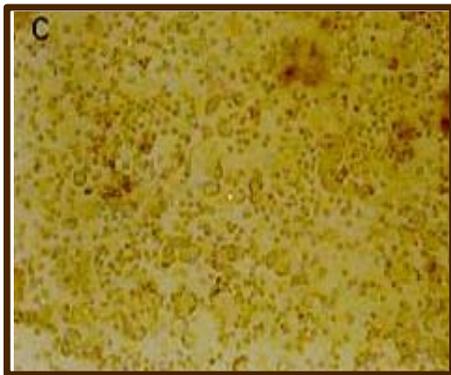
**Proestro**



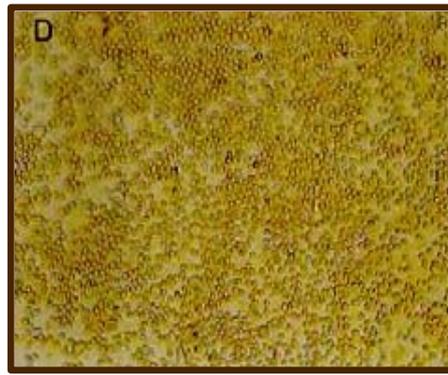
**Estro**



**Metaestro**



**Diestro**



**Figura 2.** Células coletadas através de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.

## **OBJETIVOS**

Tendo em vista que resultados prévios mostraram que ratas manipuladas no período neonatal além de apresentarem alterações na atividade do eixo HPA, têm redução do comportamento sexual e ciclos anovulatórios na vida adulta (GOMES *et al.*, 1999; PADOIN *et al.*, 2001), este trabalho teve por objetivo:

estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre a função do eixo HPG de ratas adultas;  
estudar a possível participação do sistema angiotensinérgico central na mediação dos efeitos da manipulação neonatal sobre a função do eixo HPG de ratas adultas;  
estudar a possível participação do sistema angiotensinérgico central na mediação dos efeitos da manipulação neonatal sobre a função do eixo HPA de ratas adultas.

Sendo assim, foram realizados três trabalhos:

1) Efeitos da manipulação neonatal sobre:

- . a concentração plasmática de esteróides gonadais nas seguintes fases do ciclo estral: estro, metaestro (diestro I), diestro II e proestro.
- . a concentração plasmática de estradiol, LH, FSH e PRL na tarde do proestro.
- . o conteúdo de LHRH na APOM, área septal medial (ASM) e EM na tarde do proestro.
- . a ovulação na manhã do estro.

2) Efeitos da manipulação neonatal sobre:

- . o comportamento sexual de ratas na noite do proestro.
- . concentração plasmática de estradiol e progesterona em ratas após o comportamento sexual.
- . densidade de receptores de Ang II na AMe de ratas após o comportamento sexual.

3) Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade de receptores de Ang II na APOM, PVN, ARC e LC na tarde do proestro em ratas.

## **CAPÍTULO I**

*Neonatal handling and reproductive function in female rats*

*Journal of Endocrinology 184: 435-445, 2005*

## **CAPÍTULO II**

*Neonatal handling induces alteration in progesterone secretion after sexual behavior but not in Angiotensin II receptors density in the medial amygdala: implications for reproductive success*

Este artigo foi publicado na revista Life Sciences (in press)

## **CAPÍTULO III**

*Neonatal handling reduces Angiotensin II receptor density in medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats.*

*Este artigo foi publicado na revista Brain Research*

## **DISCUSSÃO GERAL**

O período logo após o nascimento é crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso em ratos. Interferências ambientais neste período, como a realização do procedimento de manipulação neonatal, têm sido amplamente utilizadas para avaliação do mecanismo pelo qual intervenções no período neonatal podem modificar estruturas neurais que, por sua vez, alteram comportamentos e respostas neuroendócrinas que são manifestadas ao longo da vida do animal (DENENBERG, 1964; LEVINE, 1962; LUCION *et al.* 2003; MEERLO *et al.*, 1999). Dentre os sistemas alterados pela manipulação neonatal, a atividade do eixo HPA tem sido bastante estudada. Assim, vários estudos demonstraram que a manipulação no período neonatal promove alterações na atividade do eixo HPA, já que animais que foram manipulados na fase neonatal têm uma menor síntese e secreção de CRH, adrenalina, PRL e corticosterona quando submetidos à estímulos estressantes na vida adulta (LEVINE, 1993; LIU *et al.* 2000; SEVERINO *et al.*, 2004). As modificações comportamentais observadas decorrente desse procedimento incluem aumento significativo da atividade de locomoção quando ratos manipulados são colocados em um ambiente novo, como o campo aberto; e maior permanência nos braços abertos quando são testados em um labirinto em cruz elevado. Desse modo, conclui-se que a manipulação neonatal é capaz de reduzir a ansiedade induzida pelo estresse por diminuir a atividade do eixo HPA nessas condições (MEERLO *et al.*, 1999; PADOIN *et al.*, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004).

Nesta tese a intervenção neonatal utilizada foi a manipulação neonatal, no qual a ninhada composta de oito filhotes foi submetida à manipulação diária pelo pesquisador, durante um minuto, nos dez primeiros dias de vida. Através do uso do modelo de manipulação neonatal, este trabalho assim como os citados anteriormente, pretendeu explicar algumas alterações observadas na vida adulta do animal causadas por essa

intervenção precoce. Porém, diferentemente dos demais estudos, essa tese objetivou analisar as possíveis causas de alterações reprodutivas em ratas adultas provocadas pela manipulação neonatal. De fato, foi previamente demonstrado em nosso laboratório que ratas manipuladas no período neonatal apresentam, na vida adulta, ciclos anovulatórios (GOMES *et al.*, 1999) e têm redução do comportamento sexual, sendo este observado através da diminuição significativa do quociente de lordose (PADOIN *et al.*, 2001). Gonzáles *et al.* (1994) demonstraram que a manipulação neonatal preveniu a indução do diestro constante em ratas quando foi usado um modelo de estresse crônico, o que levou a sugestão de que este procedimento teria um efeito positivo. Porém, a redução da receptividade sexual e da ovulação coloca em dúvida os efeitos positivos desse procedimento realizado logo após o nascimento.

A redução na capacidade ovulatória e do comportamento sexual de ratas devido à manipulação neonatal foi confirmada neste estudo. Conforme apresentado no primeiro capítulo do presente trabalho, a mediana do número de óvulos contados no oviduto na manhã da fase estro foi significativamente menor no grupo manipulado comparado com o grupo não-manipulado, o que está de acordo com resultados obtidos anteriormente (GOMES *et al.*, 1999). Sabe-se que a ovulação é um processo complexo, envolvendo a participação de vários hormônios que têm sua secreção aumentada durante o período pré-ovulatório na tarde da fase proestro do ciclo estral da rata (FREEMAN, 1994). De fato, neste período há um aumento na secreção de esteróides gonadais, que possuem função crucial na regulação de diversos mecanismos do sistema reprodutivo da fêmea, incluindo a receptividade sexual e a ovulação. Para coordenar a liberação cíclica de gonadotrofinas e a atividade ovulatória, esses hormônios exercem suas ações atuando sobre o hipotálamo, hipófise e ovários (CONNELLY, 2001; MAHESH & BRANN, 1998). No proestro, há

também um aumento na secreção de LHRH, de LH, de FSH e de PRL que atuam em conjunto, possibilitando desse modo a ocorrência da ovulação na madrugada da fase seguinte, ou seja, no estro (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; FREEMAN, 1994; HERBISON, 1998; ISHIKAWA, 1992; KARSH *et al.*, 1997; LEVINE, 1997).

Nossos resultados apresentados na figura 4 do primeiro capítulo mostram um aumento significativo do conteúdo de LHRH na APOM, mas não na ASM e EM às dezoito horas do proestro no grupo manipulado comparado ao grupo controle. A importância da secreção de LHRH para a existência do pico pré-ovulatório de LH e portanto, para a ovulação, tem sido bem determinada (FREEMAN, 1994; HELENA *et al.*, 2002; KARSH *et al.*, 1997). Segundo Karch *et al.* (1997) o aumento na fase folicular nas concentrações de estradiol circulante, estimula a secreção do LHRH através de um mecanismo de retroalimentação positiva, sendo que o pico de LH necessita de um aumento na secreção do LHRH. Dessa maneira, no proestro esse esteróide gonadal apresenta uma influência estimulatória sobre a secreção de LH e de FSH, já durante a maior parte do ciclo estral o estradiol regula a secreção das gonadotrofinas através do mecanismo de retroalimentação negativa (HERBISON, 1998; LEVINE, 1997). Assim, a secreção de LHRH é dependente da ação estimulatória do estradiol que ocorre no proestro. As concentrações elevadas desse esteróide gonadal no período pré-ovulatório providenciam um sinal permissivo para o pico de LHRH e de LH (HERBISON, 1998; LEVINE, 1997; MAHESH & BRANN, 1998).

Tendo em vista a importância dos esteróides gonadais na contribuição para o sucesso do processo reprodutivo incluindo o comportamento sexual, a ovulação e o sucesso da prenhez, as concentrações plasmáticas desses hormônios foram avaliadas no presente estudo. Através de coleta de sangue seriada durante as quatro fases do ciclo estral, ou seja, foram usados os mesmos animais para cada uma das fases do ciclo, obtivemos os resultados

referentes à concentração plasmática de estradiol e de progesterona, conforme apresentado nas figuras 1A e 2A do primeiro capítulo. A concentração plasmática de estradiol no grupo não-manipulado permaneceu baixa no diestro e no estro, mas um aumento (pico) foi observado no proestro. A concentração plasmática de progesterona neste grupo também apresentou um pico no proestro. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, embora diferente protocolo de coleta de sangue tenha sido utilizado nesses outros trabalhos (BUTCHER *et al.*, 1974; SAVOY-MOORE *et al.*, 1980; SMITH, 1975). Já a redução da concentração de progesterona observada no metaestro em ratas manipuladas (figura 2B do primeiro capítulo) pode ser decorrente da ovulação reduzida, pois o aumento da secreção de progesterona verificado entre o metaestro e o diestro é originada a partir do corpo lúteo (FREEMAN, 1994).

O efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de estradiol especificamente ao longo da tarde do proestro está mostrado na figura 3A do primeiro capítulo. Houve uma redução significativa nas concentrações de estradiol no plasma desde as treze horas até as vinte horas do proestro em ratas manipuladas. Essa redução no grupo manipulado pode ser observada também através da análise da área abaixo da curva desse hormônio (figuras 1B e 3B do primeiro capítulo).

Através da análise dos resultados referentes às concentrações de estradiol no plasma durante o proestro e do conteúdo do LHRH nesta mesma fase, podemos inferir que o conteúdo aumentado do LHRH na APOM observado no grupo manipulado pode ser devido à redução da secreção de estradiol verificada neste grupo durante essa fase. Como citado anteriormente, o estradiol, através do mecanismo de retroalimentação positiva, pode influenciar a ocorrência da secreção do LHRH que, por sua vez, estimula a secreção de gonadotrofinas necessárias para o processo de ovulação. Assim, a redução no número de

óvulos devido à manipulação neonatal pode ser causada pela redução de estradiol plasmático. De fato, resultados que estão apresentados na figura 3 (C, D e F) do primeiro capítulo que são referentes às concentrações de gonadotrofinas no plasma na tarde do proestro de ratas manipuladas, mostram uma redução significativa das concentrações de LH a partir das dezessete horas e de FSH, este quando analisamos a área abaixo da curva. Conforme Smith (1975), às dezessete horas do proestro é o horário em que ocorre o pico pré-ovulatório de LH, o que demonstra que o grupo de animais submetidos à manipulação neonatal não apresenta esse pico pré-ovulatório e dessa forma tem a ovulação comprometida. Ao contrário, o grupo não-manipulado conforme mostrado na figura 3C do primeiro capítulo tem um aumento (pico) da concentração de LH no plasma às dezessete horas, o que está de acordo com dados da literatura (ISHIKAWA, 1992; SMITH, 1975). Em ratas, o aumento de LH na tarde do proestro é um evento essencial para a ovulação que é dependente da secreção de LHRH a partir de terminais nervosos oriundos da APOM, onde há maioria dos corpos celulares de neurônios LHRH, para a EM (ISHIKAWA, 1992; LANTOS *et al.*, 1995; LEVINE *et al.*, 1991).

Considerando a importância do pico de LH e de FSH para a ovulação (FREEMAN, 1994; ISHIKAWA, 1992) e que o grupo manipulado não apresenta o pico pré-ovulatório de LH e que há uma menor concentração plasmática de FSH no proestro, podemos concluir que possivelmente a presença de ciclos anovulatórios e/ou redução no número de óvulos previamente mostrados (GOMES *et al.*, 1999) e confirmado nesta tese, pode ser devido à ausência do aumento de gonadotrofinas no plasma causado pela ausência de pico do estradiol no proestro. Talvez devido ao estradiol estar com sua concentração reduzida, a influência estimulatória sobre a secreção do LHRH possa estar alterada. De fato, a magnitude do pico de LH é decorrente de ações combinadas do LHRH, do estradiol

(HERBISON, 1998; KARCH *et al.*, 1997; LEVINE, 1997) e também da ativação independente do ligante do receptor de progesterona na hipófise anterior (GONZÁLES *et al.*, 2000).

O aumento no conteúdo de LHRH observado na APOM no grupo manipulado no proestro pode representar uma deficiência na sua liberação (GERENDAI *et al.*, 1980; HELENA *et al.*, 2002). Assim, esse resultado poderia ser explicado devido a alterações no mecanismo de controle sobre os neurônios LHRH. Muitos estudos referem-se ao estradiol como o hormônio responsável pela síntese e secreção do LHRH, porém o mecanismo exato pelo qual ele estimula a secreção do LHRH ainda é bastante discutido, mas muitos neurotransmissores parecem participar desse mecanismo (PETERSEN *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que a influência do estradiol sobre a secreção de LHRH ocorre por mecanismos indiretos, já que receptores  $\alpha$  para estradiol não estão co-localizados em neurônios LHRH (HERBISON *et al.*, 1995). Por outro lado, Helena *et al.* (2002) discute que a expressão do receptor  $\beta$  de estradiol foi mostrada em neurônios LHRH de roedores, entretanto parece que a expressão desse receptor não é esteróide gonadal dependente. Dessa maneira, é possível que esses receptores estejam envolvidos no mecanismo de retroalimentação negativa, pois eles podem exercer efeitos opostos ao receptor  $\alpha$ .

A NA a partir do LC liberada na APOM, assim como a Ang II podem estar envolvidas com esse processo de secreção de LHRH (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; HERBISON, 1998; GAHAZI *et al.*, 1994; STEELE, 1992; STEELE *et al.*, 1983). Em relação a participação da NA, tem sido demonstrado que a lesão do LC na manhã do proestro diminui o conteúdo desta na APOM, bloqueando o pico de LH, de FSH e a ovulação (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997) e que a administração de antagonistas do receptor  $\alpha$  adrenérgico também impedem a ocorrência do pico de LH (HERBISON, 1998).

Há dados demonstrando que a manipulação neonatal é capaz de alterar a neurotransmissão noradrenérgica. Segundo Liu *et al.* (2000), a manipulação neonatal aumenta a expressão do autoreceptor  $\alpha_2$  inibitório em machos e conforme Lucion *et al.* (2003), esse modelo experimental induz uma redução estável no número de células no LC em ratos machos e fêmeas. Desse modo, essas mudanças no LC poderiam reduzir o efeito estimulatório desse núcleo sobre o hipotálamo e assim, alterar a secreção de LHRH no proestro. De fato, conforme Helena *et al.* (2002), a ação do LC sobre neurônios LHRH parece estar relacionada ao mecanismo de retroalimentação positiva no proestro.

Além do sistema noradrenérgico via LC, várias evidências demonstram a participação da Ang II central no controle da ovulação através da modulação da secreção de LHRH (GHASI *et al.*, 1994; PALMER *et al.*, 1994; PHILLIPS *et al.*, 1992; STEELE, 1992; STEELE *et al.*, 1983), sendo que essa ação da Ang II pode envolver o sistema noradrenérgico (DORNELLES e FRANCI, 1998a). Tendo em vista essas evidências de que a Ang II central influencia a ovulação, esse trabalho avaliou a possível participação do sistema angiotensinérgico central através da densidade de seus receptores em algumas áreas hipotalâmicas na mediação da ausência e/ou redução da ovulação verificada no grupo manipulado.

Conforme o resultado apresentado na figura 1A do terceiro capítulo, ratas manipuladas no período neonatal tiveram uma redução significativa da densidade de receptores de Ang II na APOM às treze horas do proestro. Essa alteração na densidade de receptores pode ser uma das causas do aumento do conteúdo de LHRH observado na tarde do proestro no grupo manipulado. De fato, conforme Dornelles e Franci (1998b) a APOM é sensível à ação da Ang II através dos receptores AT1. Dessa maneira, a Ang II participa do controle da secreção de LHRH via receptores AT1, pois o bloqueio desses devido à

administração de losartan, impede a secreção do LH. Suportando essa evidência de que a Ang II central medeia a ocorrência da ovulação em ratas, há dados que mostram um aumento no conteúdo de Ang II no hipotálamo no início da tarde do proestro antes do pico pré-ovulatório de LH quando comparado ao diestro I (GHASI *et al.*, 1994), e o bloqueio dos receptores de Ang II ou da síntese desse peptídeo no SNC abole o pico de LH em ratas intactas no proestro ou em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona (PALMER *et al.*, 1994; STEELE *et al.*, 1983).

Conforme apresentado no primeiro capítulo, há uma redução significativa da concentração de estradiol plasmático no proestro em ratas submetidas à manipulação neonatal. Essa redução pode estar mediando a alteração na densidade de receptores de Ang II na APOM do grupo manipulado. Sabe-se que a ação estimulatória do sistema angiotensinérgico central sobre a função reprodutiva depende da presença de esteróides gonadais, pois a administração intracerebroventricular de Ang II não induz a secreção de LH em ratas ovariectomizadas não repostas com estradiol e progesterona, mas é capaz de induzir o pico de LH quando há presença desses esteróides gonadais (STEELE *et al.*, 1985). O estradiol também facilita as ações estimulatórias e inibitórias da microinjeção de Ang II na APOM sobre a secreção do LH e de PRL, respectivamente (DORNELLES e FRANCI, 1998a). Desse modo, a alteração na densidade de receptores de Ang II na APOM do grupo submetido à manipulação neonatal pode ser causada pela redução do estradiol no plasma observada nesse grupo. Por outro lado, conforme mostra a figura 1C do terceiro capítulo não foi verificada mudanças na densidade de receptores para Ang II no ARC no qual é conhecida a função dos esteróides gonadais sobre a modulação da expressão dos receptores AT1 (JÖHREN *et al.*, 1997; SELTZER *et al.*, 1993). Esses resultados podem

demonstrar uma sensibilidade aumentada da APOM para os esteróides gonadais sobre a modulação da densidade de receptores de Ang II.

Alternativamente, a redução da densidade de receptores de Ang II na APOM do grupo manipulado pode ter sido causada por um efeito ainda não identificado da própria manipulação neonatal. Além disso, a APOM pode modular outras funções que não àquelas relacionadas com a reprodução, como a ingestão hídrica (SAAD *et al.*, 1993). Assim, é possível que a redução na densidade de receptores de Ang II tenha ocorrido em neurônios que não estão relacionados com a secreção de LHRH.

A redução na concentração plasmática de estradiol no proestro apresentada pelo grupo manipulado, além de estar envolvida com a alteração da secreção de LHRH na APOM e, portanto com a alteração da ovulação, pode estar mediando a redução no quociente de lordose induzida pela manipulação neonatal. O presente trabalho, conforme mostrado no segundo capítulo, confirmou resultados prévios obtidos em nosso laboratório (PADOIN *et al.*, 2001) sobre os efeitos da manipulação neonatal no comportamento sexual de ratas que foi verificado através do quociente de lordose. Sabe-se que o estradiol e a progesterona exercem marcadas influências sobre circuitos neurais que modulam o comportamento sexual (AUGER, 2001; FLANAGAN-CATO *et al.*, 2001; MANI, 2001). Assim, a rata torna-se capaz de realizar a lordose devido à ação coordenada dos esteróides gonadais em vias neurais descendentes a partir do VMH (ETGEN *et al.*, 1999; FLANAGAN-CATO, 2000; McEWEN, 1981). Talvez devido à baixa concentração de estradiol, as ratas manipuladas tenham uma redução dessa ação estimulatória dos esteróides gonadais sobre as estruturas neurais participantes da regulação da expressão do comportamento de lordose, comprometendo dessa forma a receptividade sexual desses animais.

Assim como o VMH, a AMe é uma importante região do SNC que tem sua função sobre o comportamento sexual modulada pelos esteróides gonadais. Suportando esse fato, há evidências que a cópula com intromissões realizadas pelo macho em ratas tratadas com estradiol e progesterona produzem uma indução do RNA mensageiro para *c-fos* na AMe (PFAUS *et al.*, 1996). Além disso, resultados do nosso laboratório mostraram que esse núcleo pode mediar a inibição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas via sistema angiotensinérgico central. De fato, a microinjeção de Ang II na AMe reduz o quociente de lordose em ratas (CECCONELLO, 2005) e inibe o comportamento sexual de ratos machos, sendo que essa inibição pode ser revertida pela administração de losartan ou de CGP 42112 (antagonista AT2) (BREIGEIRON *et al.*, 2002). A AMe contém Ang II (LIND *et al.*, 1985; PHILLIPS *et al.* 1993) e expressa receptores AT1 e AT2 para esse peptídeo (von BOHLEN und HALBACH & ALBRECHT, 1998; TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991). Dessa maneira, o presente estudo avaliou a possível participação da Ang II central na AMe, especificamente os receptores de Ang II, sobre a inibição do comportamento sexual apresentado por ratas manipuladas no período neonatal. Os resultados apresentados na tabela 1 do segundo capítulo, mostram que não houve alteração na densidade de receptores de Ang II na AMe quando os dois grupos estudados são comparados. Assim, a redução do quociente de lordose no grupo manipulado parece não ser mediada por mudanças na densidade de receptores para Ang II na AMe. A redução do estradiol plasmático no proestro em ratas manipuladas parece não afetar a expressão desses receptores na AMe. Não há dados na literatura relatando uma possível modulação dos receptores de Ang II nesse núcleo por esteróides gonadais.

Por outro lado, a expressão do receptor de progesterona pode estar sendo alterada pela reduzida concentração plasmática de estradiol no proestro, afetando a resposta de

lordose da rata manipulada frente à estimulação realizada pelo rato macho. Tem sido demonstrado que o estradiol induz a expressão de receptores de progesterona no hipotálamo e na hipófise principalmente no proestro, que podem ser ativados de modo independente do ligante para regular o comportamento de lordose e a secreção de gonadotrofinas (AUGER, 2001; BELLIDO *et al.*, 1999; MANI, 2001).

A PRL, além do estradiol, pode também estar mediando a redução do quociente de lordose verificada nas ratas manipuladas. Conforme os resultados mostrados na figura 3 (G e H) do primeiro capítulo, as ratas manipuladas tiveram uma redução significativa da concentração plasmática de PRL a partir das dezesseis horas da tarde do proestro. Segundo Smith (1975) às dezessete horas do proestro há um pico pré-ovulatório de PRL no plasma, o qual foi observado no grupo não-manipulado. Sabe-se que a supressão da liberação de PRL através da administração de um agonista dopaminérgico diminui drasticamente a receptividade sexual em ratas (WITCHER & FREEMAN, 1985). Além disso, Drago e Lissandrello (2000) sugerem que uma efetiva concentração de PRL é importante para a expressão do comportamento sexual. Através dos resultados sobre as concentrações de estradiol e de PRL no grupo manipulado, podemos inferir que a redução na concentração plasmática desses hormônios podem estar mediando a redução do quociente de lordose apresentada pelas ratas que foram manipuladas no período neonatal.

A diminuída frequência de lordose do grupo manipulado pode impedir a ocorrência da estimulação vaginocervical adequada realizada pelo macho e desse modo, contribuir para a redução do sucesso reprodutivo. Conforme o resultado mostrado na figura 1 do segundo capítulo, a média da frequência de intromissão foi significativamente menor sobre o grupo manipulado. De fato, a ocorrência da postura de lordose é essencial para que o macho possa apresentar inserção peniana e a ejaculação (PFAFF *et al.*, 1994) e assim,

promover a estimulação vaginocervical adequada o que induz um aumento na concentração plasmática de progesterona na rata que é necessária para o sucesso da prenhez (ADLER, 1968; ADLER *et al.*, 1970). Segundo Chester e Zucker (1970) as intromissões antes da ejaculação são necessárias para o sucesso do transporte de espermatozóides, além disso, conforme Adler *et al.* (1970), várias intromissões realizadas pelo macho iniciam um reflexo neuroendócrino que resulta em aumento da secreção de progesterona necessária para a implantação do blastocisto. Considerando esse fato, o presente estudo analisou a concentração plasmática de progesterona após o comportamento sexual. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2B do segundo capítulo e mostram uma redução significativa na concentração desse hormônio no plasma de ratas manipuladas após o coito comparado com o grupo não-manipulado. Quando as ratas manipuladas são divididas dois grupos, um grupo que apresentou freqüência de lordose acima de dez em quinze minutos de filmagem e outro que apresentou uma freqüência desse comportamento menor que dez no mesmo período; o grupo com maior freqüência de lordose não diferiu do grupo não-manipulado quanto à freqüência de intromissão recebida e quanto à concentração de progesterona no plasma. Já o grupo com baixa freqüência de lordose (aqui considerada abaixo de dez), tem redução significativa da freqüência de intromissão recebida e da concentração plasmática de progesterona após o coito quando comparado com o grupo não-manipulado e grupo manipulado com maior freqüência de lordose, (aqui considerada acima de dez). Assim, podemos observar que há ratas manipuladas que apresentam comportamento sexual normal, assim como há ratas manipuladas que têm ovulação normal (cerca de 50%), conforme discutido no primeiro capítulo. Mas esses fatos não modificam a evidência de que a manipulação neonatal causa profundas alterações deletérias sobre a função reprodutiva de ratas através da redução do comportamento sexual, redução e/ou

ausência da ovulação e redução da concentração plasmática de progesterona após o coito, que é necessária para o sucesso da prenhez.

As alterações referentes à ovulação observadas devido ao procedimento de manipulação neonatal, podem também ser devidas a um déficit do crescimento folicular que é resultante de interações entre estradiol, LH e FSH. O pico secundário de FSH do estro que é responsável pelo recrutamento de folículos destinados a crescerem e, possivelmente, serem ovulados no próximo ciclo, é estimulado pelo estradiol aumentado do proestro (HIRSHFIELD & MIDGLEY, 1978). Porém, nossos resultados mostram que o estradiol está reduzido no plasma de ratas manipuladas durante o proestro, podendo dessa forma alterar a secreção de FSH no estro.

Conforme discutido anteriormente, a Ang II central pode estar mediando uma das alterações reprodutivas causadas pela manipulação neonatal, pois houve uma diminuição da densidade de seus receptores na APOM do grupo manipulado. Os resultados apresentados na figura 1B do terceiro capítulo sugerem que a Ang II central também pode estar envolvida com a alteração da resposta ao estresse causada pela manipulação neonatal, como a diminuída secreção de ACTH e de corticosterona que ocorrem quando animais manipulados são expostos a um agente estressor na vida adulta. De fato, foi observada uma redução significativa da densidade de receptores de Ang II no PVN em ratas manipuladas. Além disso, vários estudos demonstram que a Ang II central participa da resposta ao estresse através da estimulação da secreção de CRH e de ACTH devido à ação sobre neurônios no PVN via receptores AT1 (PHILLIPS, 1987; RIVER & VALE, 1983; SAAVEDRA *et al.*, 2004). Esses receptores têm a expressão regulada por glicocorticóides (CASTRÉN & SAAVEDRA, 1988 e 1999; GUO *et al.*, 1995), porém várias evidências demonstraram que a manipulação neonatal não altera a concentração basal de

glicocorticóides (ADER *et al.*, 1969; LEVINE *et al.*, 1967; MEERLO *et al.*, 1999; NUÑEZ *et al.*, 1996) apesar de poucos estudos discutirem que a manipulação neonatal reduz a concentração basal de corticosterona (PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004; PAPAIOANNOU *et al.*, 2002). Assim, possivelmente a alteração na densidade de receptores de Ang II no PVN que pode estar mediando a atividade diminuída do eixo HPA durante o estresse em animais manipulados, não é induzida por glicocorticóides. Através dos nossos resultados, não podemos descartar a hipótese de que as mudanças na densidade de receptores de Ang II no PVN possam ter ocorrido em neurônios magnocelulares que são responsáveis pela secreção de vasopressina e ocitocina (SWANSON & SAWCHENKO, 1980). Já no LC, que expressa receptores AT1 e AT2 e está implicado com o controle da secreção de LHRH e com a resposta ao estresse, não foram observadas mudanças na densidade de receptores para a Ang II. Pouco é conhecido sobre a regulação dos receptores AT2 que estão presentes em alta concentração neste núcleo (SPETH *et al.*, 1991) e medeiam respostas relacionadas ao estresse (PASARIN *et al.*, 2000).

Baseado nos resultados apresentados neste estudo e conforme discutido nos três capítulos dessa tese, a manipulação neonatal pode estar alterando sistemas neurais que medeiam a modulação da função não apenas do eixo HPA mas, também do eixo HPG. Desse modo, essa intervenção precoce na vida do animal compromete o sucesso reprodutivo deste, e conforme discutido no terceiro capítulo, através de resultados obtidos pela técnica de auto-radiografia, o sistema angiotensinérgico central parece ser um dos sistemas afetados e, assim estar participando das alterações induzidas pela manipulação neonatal sobre o eixo HPG e HPA via APOM e PVN, mas não através do ARC, da AMe e do LC.

Conforme Schwartz (2000), o ciclo reprodutivo de uma fêmea é decorrente de uma série de eventos que incluem a ovulação, a cópula, a fertilização, a prenhez, o parto e a capacidade de cuidar dos filhotes. Assim, mais estudos são necessários para a elucidação completa dos efeitos da manipulação neonatal sobre a reprodução e os mecanismos envolvidos na redução da função reprodutiva em ratas submetidas à manipulação neonatal.

**CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

A manipulação neonatal além de alterar a atividade do eixo HPA em machos e fêmeas conforme classicamente documentado na literatura, altera a função do eixo HPG em ratas. Essa alteração na atividade do eixo HPG foi evidenciada através da confirmação de resultados previamente mostrados em nosso laboratório, como a redução do comportamento sexual observado através de diminuição significativa do quociente de lordose e redução e/ou ausência de ovulação no grupo submetido à manipulação neonatal.

A redução na concentração plasmática de estradiol no proestro devido à manipulação neonatal pode comprometer o mecanismo de retroalimentação positiva exercida por esse esteróide gonadal sobre os neurônios LHRH e, dessa forma, afetar o processo de síntese e/ou secreção deste. Assim, o conteúdo aumentado de LHRH observado na APOM na tarde do proestro em ratas manipuladas no período neonatal pode ser causado pela redução da concentração de estradiol no plasma desses animais.

A ausência de pico de LH e a redução de FSH plasmático na tarde do proestro em ratas manipuladas no período neonatal pode estar relacionado ao conteúdo aumentado de LHRH na APOM desses animais.

A redução e/ou ausência de ovulação no grupo manipulado deve ser resultado da redução da secreção de gonadotrofinas e PRL observadas neste grupo na tarde do proestro.

A alteração na ovulação induzida pela manipulação neonatal pode afetar a secreção de progesterona produzida pelo corpo lúteo.

A redução da densidade de receptores de Ang II na APOM possivelmente causada pela diminuída secreção de estradiol no proestro pode estar mediando a alteração no conteúdo de LHRH na APOM do grupo manipulado e, portanto a redução da ovulação.

A Ang II central, através dos seus receptores no ARC e LC parece não estar envolvida com as alterações reprodutivas causadas pela manipulação neonatal em ratas.

A redução do estradiol e da PRL no plasma do grupo manipulado pode ser responsável pela diminuição da receptividade sexual apresentada por este grupo.

O sistema angiotensinérgico central através dos seus receptores na AMe parece não estar mediando a redução da receptividade sexual em ratas manipuladas.

A baixa frequência de lordose observada em ratas manipuladas no período neonatal reduz a frequência de intromissão realizada pelo rato macho sobre essas fêmeas e, desse modo, há uma estimulação vaginocervical inadequada que resulta em menor secreção de progesterona, mas não de estradiol, após o coito.

Além de redução na receptividade sexual e alteração da ovulação, as ratas pertencentes ao grupo manipulado podem ter uma redução no sucesso de implantação do blastocisto decorrente de uma menor secreção de progesterona após o coito.

A diminuída atividade do eixo HPA em animais submetidos à manipulação neonatal, quando são expostos na vida adulta a um agente estressor, pode ser causada pela redução da densidade de receptores de Ang II no PVN, mas não no LC.

**PERSPECTIVAS**

Dando continuidade ao estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre a função reprodutiva em fêmeas seria pertinente uma abordagem que estudasse o ovário desses animais, desse modo uma questão inicial deve ser esclarecida:

A manipulação neonatal promove alterações morfológicas e funcionais no ovário?

Para responder a essa questão deverá ser avaliado:

O peso ovariano.

A análise do desenvolvimento folicular incluindo a presença de folículos do tipo pré-antral, antral, atrético, pré-cístico e cístico.

Número de corpos lúteos.

Avaliação da espessura das camadas da teca e da granulosa.

Presença de cistos ovarianos.

Caso constatada alguma alteração ovariana, seria importante uma avaliação de uma possível alteração do sistema renina-angiotensina ovariano como um fator participante na gênese da disfunção ovariana do animal manipulado. Assim será realizado:

Imunohistoquímica para angiotensina II no ovário.

Análise do conteúdo de Ang II no ovário após hCG.

Avaliação dos receptores de Ang II no ovário.

Dando continuidade ao estudo da participação do sistema angiotensinérgico central sobre os efeitos da manipulação neonatal na função reprodutiva em fêmeas, seria importante a

avaliação do conteúdo de Ang II em regiões hipotalâmicas envolvidas com o controle da ovulação e do comportamento sexual.

Tendo em vista a alteração observada na secreção de estradiol induzida pela manipulação neonatal seria pertinente avaliar a concentração de receptores de progesterona em áreas hipotalâmicas envolvidas com o controle do comportamento sexual de ratas e com a ovulação.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADER, R. & GROTA, L.J. Effects of early experiences on adrenocortical reactivity. *Journal of Physiology and Behavior* 4: 303-305, 1969.

ADLER N.T. Effects of the male's copulatory behavior in the initiation of pregnancy in the female rat. *The Anatomical Record* 160: 305, 1968.

ADLER, N.T.; RESKO, J.A. & GOY, R.W. The effect of copulatory behavior on hormonal change in the female rat prior to implantation. *Physiology & Behavior* 5: 1003-1007, 1970.

AGUILERA, G.; KISS, A. & LUO, X. Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *Journal of Neuroendocrinology* 7: 775-783, 1995.

ALLEN, J.P. & ALLEN, C.F. Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. *Neuroendocrinology* 15: 220-230, 1974.

ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & McCANN, S. M. Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research* 767: 289-296, 1997.

ANSELMO-FRANCI, J. A., ROCHA-BARROS, V. M.; FRANCI, C. R. & McCANN, S. M. Locus Ceruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Brain Research* 833: 86-92, 1999.

ASBACH, S.; SCHULZ, C. & LEHNERT, H. Effects of corticotropin-releasing hormone on locus coeruleus neurons in vivo: a microdialysis study a novel bilateral approach. *European Journal Endocrinology* 145: 359-363, 2001.

AUGER, A.P. Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behavior. *Reproduction* 122: 847-855, 2001.

AXEROLD, J. & REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459, 1984.

AYALA, A.R.; PUSHKAS, J.; HIGLEY, J.D.; RONSAVILLE, D. GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P.; PACAK, K.; CALIS, K.A. GERALD, M.; LINDELL, S., RICE, K.C.

& CIZZA, G. Behavioral, adrenal, and sympathetic responses to long-term administration of an oral corticotropin-releasing hormone receptor antagonist in a primate stress paradigm. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 5729-5737, 2004.

BARFIELD, R.J.; RUBIN, B.S.; GLASER, J.H. & DAVIS, P.G. Sites of action of ovarian hormones in the regulation of oestrous responsiveness of oestrous responsiveness in rats. Em: BALTHAZART, J; PROVE, E. & GILLES, R. *Hormones and Behaviour in Higher Vertebrates*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag pp: 2-18, 1982.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; CÔTÉ, J. & BARDEN, N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology* 45: 37-46, 1987.

BELLIDO, C.; GONZALEZ, D.; AGUIAR, R. & SÁNCHEZ-CRIADO, J.E. Antiprogesterin RU 486 suppress basal and LHRH-stimulated FSH and LH secretion at pituitary level in the rat in an oestrus cycle stage-dependent manner. *Journal of Endocrinology* 163: 79-85, 1999.

BLAUSTEIN, J.D. Progesterin receptors: neuronal integrations of hormonal and environmental stimulation. *Annual New York Academy of Sciences* 1007: 238-250, 2003.

BLUNDELL, J. Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences* 12: 147-157, 1991.

BOCCIA, M.L. & PEDERSEN, C.A. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 26: 657-672, 2001.

van BOCKSTAELE, E.J.; COLAGO, E.E. & VALENTINO, R.J. Corticotropin-releasing factor containing axon terminals synapse onto catecholamine dendrites and may presynaptically modulate other afferents in the rostral pole of the nucleus locus coeruleus in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 364: 523-534, 1996.

von BOHLEN und HALBACH, O. & D. ALBRECHT, D. Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides* 32: 241-245, 1998.

BOHN, M. C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience* 5: 2003-2012, 1980.

BREDY, T.W.; GRANT, R.J.; CHAMPAGNE, D.L. & MEANEY, M.J. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *European Journal of Neuroscience* 18: 2903-2909, 2003.

BREIGEIRON, M.K.; MORRIS, M.; LUCION, A.B. & SANVITTO, G.L. Effects of Angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Hormones and Behavior* 41: 267-274, 2002.

BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; SPIESS, J.; RIVIER, C. RIVIER, J. & VALE, W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology* 11: 928-931, 1992.

BUTCHER, B.L.; COLLINS, W.E. & FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17  $\beta$  throughout the 4-day estrus cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708, 1974.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOSTKY, P.M. & MEANEY, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adulthood in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 5335-5340, 1998.

CAMERON, N.M.; HA, G.K. & ERSKINE, M.S. Effect of adrenalectomy on mating-induced prolactin surges and pseudopregnancy in the female rat. *Neuroendocrinology* 78:138-146, 2003.

CAMPBELL, B.M.; MORRISON, J.L.; WALKER, E.L. & MERCHANT, K.M. Differential regulation of behavioral, genomic, and neuroendocrine responses by CRF infusions in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77: 447-455, 2004.

CASTRÉN, E. & SAAVEDRA, J.M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 122: 370-372, 1988.

CASTRÉN, E. & SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ and pituitary gland of hypophysectomized, adrenalectomized and vasopressin-deficient rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 725-729, 1989.

CATES, P.S.; LI, X.F. & O'BYRNE, K.T. The influence of 17 $\beta$ -oestradiol on corticotropin-releasing hormone (CRH) induced suppression of luteinizing hormone (LH) pulses and the role of CRH in hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile LH secretion in the female rat. *Stress* 7: 113-118, 2004.

CECCATELLI, S.; VILLAR, M. J.; GOLDSTEIN, M. & KÖKFELT, T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter characterized neurons after stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 9569-9573, 1989.

CECCONELLO, A.L. A microinjeção de angiotensina II na amígdala medial reduz o comportamento sexual em ratas. *Dissertação* (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. & MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior* 79: 359-371, 2003.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C. & CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response 1. *Annual Review of Physiology* 67: 259-284, 2005.

CHEN, M.D.; O'BYRNE, K.T.; CHIAPPINI, S.E.; HOTCHKISS, J. & KONOBIL, E. Hypoglycemic "stress" and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: role the ovary. *Neuroendocrinology* 56: 666-673, 1992.

CHESTER, R.V. & ZUCKER, I. Influence of male copulatory behavior on sperm transport, pregnancy and pseudopregnancy in female rats. *Physiology & Behavior* 5: 35-43, 1970.

CHROUSOS, G. P. & GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders - Overview of physical and behavioral homeostasis. *The Journal of the American Medical Association* 267: 1244-1252, 1992.

CHROUSOS, G. P.; TORPY, D. J. & GOLD, P. W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Annals of Internal Medicine* 129: 229-240, 1998.

CLUTTON-BROCK, T.H. *The evolution of parental care*. New Jersey: Princeton University Press, 1991.

CONNELLY, O.M. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 142: 2194-2199, 2001.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKOL, H. & WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 111: 477-505, 1995.

CURTIS, A.L.; BELLO, N.T.; CONNOLLY, K.R. & VALENTINO, R.J. Corticotropin-releasing factor neurones of the central nucleus of the amygdala mediate locus coeruleus activation by cardiovascular stress. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 667-682, 2002.

DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review* 71: 335-351, 1964.

DENENBERG, V.H. & SMITH, S.A. Effects of infantile stimulation and age upon behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 56: 307-312, 1963.

DENESLSKY, G.Y. & DENENBERG, V.H. Infantile stimulation and adult exploratory behaviour; effects of handling upon visual variation-seeking. *Animal Behaviour* 15: 568-573, 1967.

DENT, G.W.; OKIMOTO, D.K.; SMITH, M.A. & LEVINE, S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 71: 333-342, 2000.

DENT, G.W.; SMITH, M.A. & LEVINE S. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Brain Research Developmental Brain Research* 127: 23-30, 2001.

DONADIO, M.V.F.; SAGAE, S.C.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. & SANVITTO, G.L. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. *Brain Research* 1006: 59-65, 2004.

DORNELLES R.C.M. & FRANCI C.R. Alpha- but not beta-adrenergic receptors mediate the effect of angiotensin II in the medial preoptic area on gonadotropin and prolactin secretion. *European Journal of Endocrinology* 138: 583-586, 1998a.

DORNELLES R.C.M. & FRANCI C. R. Action of AT<sub>1</sub> subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides* 32: 51-55, 1998b.

DRAGO, F. & LISSANDRELLO, C.O. The “low-dose” concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *European Journal of Pharmacology* 405: 131-137, 2000.

DRONJAK, S. GAVRILOVIC, L.; FILIPOVIC, D. & RADOJCIC, M.B. Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior* 81: 409-415, 2004.

DUMONT, E.C.; RAFRAFI, S.; LAFOREST, S. & DROLET, G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience* 93: 877-884, 1999.

DUNN, A.J. & BERRIDGE, C.W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Review* 15: 71-100, 1990.

ELLINGSEN, E. & AGMO, A. Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77: 431-445, 2004.

ERKINE, M. S.; GELLER, E. & YUWILER, A. Effects of neonatal hydrocortisone treatment on pituitary and adrenocortical responses to stress in young rats. *Neuroendocrinology* 29: 191-199, 1979.

ETGEN, A.M.; CHU, H.P.; FIBER, J.M.; KARKANIAS, G.B. & MORALES, J.M. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. *Behavioural Brain Research* 105: 93-103, 1999.

ETGEN, A.M. & MORALES, J.C. Somatosensory stimuli evoke norepinephrine release in the anterior ventromedial hypothalamus of sexually receptive female rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 213-218, 2002.

FERIN, M. Stress and the reproductive cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84: 1768-1774, 1999.

FLANAGAN-CATO, L. M. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21: 309-329, 2000.

FLANAGAN-CATO, L.M.; CALIZO, L.H. & DANIELS, D. The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behaviour. *Hormone and Behaviour* 40: 178-182, 2001.

FOLKOW, B.; HALLBACK-NORDBLÄNDER, M.; MARTNEV, J. & NORDBORG, C. Influence of amygdala lesions on cardiovascular responses to alerting stimuli on behaviour and blood pressure development in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 116: 133-139, 1982.

FORCELLEDO, M.L.; MORALES, P.; VERA, R.; QUIJADA, S. & CROXATTO, H.B. Role of ovarian and adrenal progesterone in the regulation of ovum transport in pregnant rats. *Biology of Reproduction* 27: 1033-1041, 1982.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & MACCANN, S.M. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23: 899-901, 1990.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. The hypothalamic angiotensinergic neurons play a physiologically significant inhibitory role to suppress plasma prolactin, growth hormone and TSH, but not ACTH by central action in ovariectomized rats. *Peptides* 18: 971-976, 1997.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J. R. & MEANEY, M. J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 745: 136-152, 1994.

FRANCIS, D.D.; YOUNG, L.J.; MEANEY, M.J. & INSEL, T.R. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 349-353, 2002.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. Em: *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil, E. & Neill, J. New York: Raven Press, 1994.

GANONG, W.F. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 205: 213-219, 1994.

de GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W. & UNGER, TH. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews* 52: 415-472, 2000.

GERENDAI, I.; WENGER, T. & SCAPAGNINI, U. Increase in the LHRH content of the organum vasculosum of the lamina terminalis and the medio-basal hypothalamus six hours after injection of kainic acid into the rat medial preoptic area. *Neuroscience Letters* 17: 249-252, 1980.

GHAZI, N.; GROVE, K.L.; WRIGHT, J.W.; PHILLIPS, M.I. & SPETH, R.C. Variations in Angiotensin-II release from the rat brain during the estrous cycle. *Endocrinology* 135: 1945-1950, 1994.

GOMES, C. M. Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. *Dissertação* (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

GOMES, C. M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A. & LUCION, A. B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1239-1242, 1999.

GONZÁLES, D.; BELLIDO, R.A.; GARRIDO-GARCIA, J.C.; HERNÁNDEZ, G.; ALONSO, R. & SÁNCHEZ-CRIADO, J.E. Luteinizing hormone secretion elicited in a ligand-independent activation of progesterone receptor manner at pituitary level in the rat: differential effect of two selective estrogen receptor modulators. *Neuroscience Letters* 289: 11-114, 2000.

GONZÁLES, A.S.; RODRIGUES-ECHANDIA, E.L.; CABRERA, R. & FÓSCOLO, M.R. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females. *Physiology & Behavior* 86: 591-595, 1994.

GONZÁLES, A.S.; RODRIGUES-ECHANDIA, E.L.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M.R. & FRANSCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology & Behavior* 86: 591-595, 1990.

GONZALEZ-FLORES, O. & ETGEN, A.M. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Hormones and Behaviour* 45: 50-57, 2004.

GONZALEZ-FLORES, O.; SHU, J.; CAMACHO-ARROYO, I. & ETGEN, A.M. Regulation of lordosis by cyclic 3',5'- guanosine monophosphate, progesterone, and its 5 alpha-reduced metabolites involves mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 145: 5560-5567, 2004.

GRINO, M.; YOUNG, W.S. & BURGUNDER, J.M. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in the rat. *Endocrinology* 124: 60-68, 1989.

GUO, D.F.; UNO, S.; ISHIHATA, A.; NAKAMURA, N. & INAGAMI, T. Identification of a cis-acting glucocorticoid responsive element in the rat angiotensin II type 1a promoter. *Circulation Research* 77: 249-257, 1995.

HAMMACK, S.E.; PEPIN, J.L.; DESMARTEAU, J.S.; WATKINS, L.R. & MAIER, S.F. Low doses of corticotropin-releasing hormone injected into the dorsal raphe nucleus block the behavioral consequences of uncontrollable stress. *Behavioural Brain Research* 147: 55-64, 2003a.

HAMMACK, S.E.; SCHID, M.J.; LOPRESTI, M.L.; DER-AVAKIAN, A.; PELLYMOUNTER, M.A.; FOSTER, A.C.; WATKINS, L.R. & MAIER, S.F. Corticotropin releasing hormone type 2 receptors in the dorsal raphe nucleus mediate the behavioral consequences of uncontrollable stress. *The Journal of Neuroscience* 23: 1019-1025, 2003b.

HEIM, C.; EHLERT, U. & HELLHAMMER, D.H. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25: 1-35, 2000.

HEIM, C.; OWENS, M.J., PLOTSKY, P.M. & NEMEROFF, C.B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor system due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology Bulletin* 33: 185-192, 1997.

HELENA, C.V.V.; FRANCI, C.R. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in under locus coeruleus control in females rats. *Brain Research* 955: 245-252, 2002.

HERBISON, A.E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews* 19: 302-330, 1998.

HERBISON, A.E.; HORVATH, T.I.; NAFTOLIN, F. & LERANTH, C. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurones containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 61: 1-10, 1995.

HERMAN, J.P.; STANLEY, J.W.; WEIGAND, J.S. & WATSON, J.S. Regulation of basal corticotropin-releasing hormone and arginine-vasopressin messenger ribonucleic expression in the paraventricular nucleus: Effects of the selective hypothalamic deafferentation. *Endocrinology* 127: 2408-2416, 1990.

HINDE, R.A. & SPENCER-BOOTH, Y. Effects of brief separation from mother on rhesus monkeys. *Science* 173: 111-118, 1971.

HIRSHFIELD, A.N. & MIDGLEY, A.R.J. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction* 19: 606-611, 1978.

HOAK, D.C. & SCHWARTZ, N.B. Blockade of recruitment of ovarian follicles by suppression of the secondary surge of follicle-stimulating hormone with porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 4953-4956, 1980.

HUGIN-FLORES, M.E.; STEIMER, T.; SCHULZ, P., VALLOTTON, M.B. & AUBERT, M.L. Chronic corticotropin-releasing hormone and vasopressin regulate corticosteroid receptors in rat hippocampus and anterior pituitary. *Brain Research* 976: 159-170, 2003.

ISHIKAWA, J. Luteinizing hormone requirements for ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 46: 1144-1150, 1992.

JÖHREN, O.; SANVITTO, G.L.; EGIDY, G. & SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT1A receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. *Journal of Neuroscience* 17: 8283-8292, 1997.

JOHNSON, E.O.; KAMILARIS, T.C.; CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience Biobehavior Review* 16: 115-130, 1992.

JONES, B.E. & MOORE, R.Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. Autoradiographic study. *Brain Research* 127: 289-296, 1977.

KALANTARIDOU, S.N.; MAKRIGIANNAKIS,A.; ZOUMAKIS, E. & CHROUSOUS, G.P. Stress and the female reproductive system. *Journal of Reproductive Immunology* 62: 61-68, 2004.

KARSCH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P. & MOENTER, S.M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biology of Reproduction* 56: 303-309, 1997.

KISS, A. & AGUILERA, G. Role of alpha-1-adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. *Cell and Molecular Neurobiology* 20: 683-694, 2000.

KLIMES, I.; WESTON, K.; GASPERIKOVA, D.; KOVACS, P.; KVETNANSKY, R.; JEZOVA, D.; DIXON, R.; THOMPSON, J.R.; SEBOKOVA, E. & SAMANI, N.J. Mapping of genetic determinants of the sympathoneural response to stress. *Physiological Genomics* 20: 183-187, 2005.

KNUSEL, B.; RABIN, S.J.; HEFTI, F. & KAPLAN, D.R. Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *Journal of Neuroscience* 14: 1532-1554, 1994.

KONDO, Y.; KOIZUMI, T.; ARAI, Y.; KAKEYAMA, M. & YAMANOUCHI, K. Functional relationships between mesencephalic central gray and septum in regulating lordosis in female rats. *Brain Research Bulletin* 32: 635-638, 1993.

KOPIN, I. L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771: 19-30, 1995.

KUHN, C.M. & SCHANBERG, S.M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience* 16: 261-270, 1998.

LANTOS,T.A.; GORCS, T.J. & PALKOVITS, M. Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premamillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Research Reviews* 20: 209-249, 1995.

LEE, H.J.; LEE, B.; CHOI, S.H.; HAHM, D.H.; KIM, M.R.; ROH, P.U.; PYUN, K.H.; GOLDEN, G. & YANG C.H. Electroacupuncture reduces stress-induced expression of c-fos in the brain of the rat. *American Journal of Chinese Medicine* 32: 795-806, 2004.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P. & CORTES, C.L. Expression of angiotensin type-1 and type-2 receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 383-439, 1997.

LEONG, D.S.; TERRÓN, J.A.; FALCÓN-NERI, A.; ITO, I.A.T.; JÖHREN, O.; TONELLI, L.H.; HOE, K.L. & SAAVEDRA, J.M. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin AT1A, AT1B and AT2 receptors. *Neuroendocrinology* 75: 227-240, 2001.

LEVINE J.E. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surge in rats. *Biology of Reproduction* 56: 293-302, 1997.

LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 135: 795-799, 1962.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697: 61-69, 1993.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 275-293, 1994.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior* 73: 255-260, 2001.

LEVINE, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research* 4: 557-564, 2002.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.G. & DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior* 2: 55-59, 1967.

LEVINE, S., HUCTION, D.M., WIENER, S.G. & ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant. *Developmental Psychobiology* 24: 547-558, 1991.

LI, Z. & FERGUNSON, A.V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *American Journal of Physiology* 256: R 302-R309, 1993.

LIND, R.W.; SWANSON, L.W. & GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40: 2-24, 1985.

LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 5-12, 2000.

LIU, D.; DIORIO J.; TANNENBAUM, B.; CALDJII, C.; FRANCIS D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid, and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Science* 277: 1659-1662, 1997.

LÓPEZ, J. F.; AKIL, H. & WATSON, S. J. Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry* 46: 1461-1471, 1999.

LUCION, A.B.; PEREIRA, F.M.; WINKELMANN, E.C.; SANVITTO, G.L. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience* 117: 894-903, 2003.

LUND, T.D.; MUNSON, D.J.; HALDY, M.E. & HANDA, R.J. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 272-278, 2004.

MA, S. & MORILACK, D.A. Induction of Fos expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 124: 963-972, 2004.

MAHESH, V.B. & BRANN, D.W. Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63: 616-629, 1998.

MANI, S. Ligand-independent activation of progestin receptors in sexual receptivity. *Hormones and Behaviour* 40, 183-190, 2001.

MARTIN, C. A.; CAKE, M. H.; HOLBROOK, N. J. Relationship between fetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. *Acta Endocrinology* 84: 167-176, 1977.

MATTHEWS, M. K. & KENYON, R. Four-versus five-day estrous cycle in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology & Behavior* 33: 65-67, 1984.

McEWEN, B. S. Neural gonadal steroid actions. *Science* 211: 1303-1311, 1981.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; BERKEL, C.V.; BHATNAGAR, S. & SALPOLSKY, R.M. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 239: 766-768, 1988.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; BODNOFF, S.R.; INY, L.J.; TATAREWICZ, J.E. & SAPOLSKY, R.M. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavioral Neuroscience* 99: 765-770, 1985.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D. & SMYTHE, J.W. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 260-273, 1994.

MEANEY, M.J.; MITCHELL, J.B.; AITKEN, D.H.; BHATNAGAR, S.; BODNOFF, S.R.; INY, L.J. & SARRIEAU, A. The effect of neonatal handling on the development of adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16: 85-103, 1991.

MEANEY, M.J.; SEMA, B.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.W.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hipotalamic pituitary-adrenal stress response. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697: 70-85, 1993.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B. & KOOLHAAS, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioral stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology* 11: 925-933, 1999.

MELIA, K. R. & DUMAN, R. S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 8382-8386, 1991.

MISTRETTA, Ch.M. & BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. In: *Studies on the development of behavior and nervous system*. New York: Academic Press, pp. 215-246, 1978.

MITCHELL, J.C.; LI, X.F.; BREEN, L.; THALABARD, J-C. & O'BYRNE, K.T. The role of the locus coeruleus in corticotropin-releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology* 146: 323-331, 2005.

MOUNZIH, K.; GROVE, K.L.; SPETH, R.C.; STEELE, M.K. & GANONG, W.F. Further studies of the site at which angiotensin II acts in the central nervous system to inhibit the secretion of prolactin. *Endocrinol Journal* 2: 41-46, 1994.

MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R. W.; GRIENGLING, K.K.; RUNGE, M.S. & BERNSTEIN, K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Nature* 315: 233-236, 1991.

NANCE, D.M.; SHRYNE, J. & GORSKI, R.A. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Hormones and Behavior* 6: 59-64, 1975.

NISHIMURA , Y.; ITO, T.; HOE, K.L. & SAAVEDRA, J.M. Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT1 receptor antagonist Candesartan blocks brain AT1 receptors. *Brain Research* 871: 29-38, 2000.

NOCETTO, C.; CRAGNOLINI, A.B.; SCHIOTH, H.B. & SCIMONELLI, T.N. Evidence that the effect of melanocortins on female sexual behavior in preoptic area is mediated by the MC3 receptor: participation of nitric oxide. *Behavioural Brain Research* 31: 537-541, 2004.

NUÑEZ, J.F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, R.M.; TOBEÑA, A. & FERNANDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiology & Behavior* 60: 1355-1359, 1996.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS, H.M. & LUCION A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience* 115: 1332-1340, 2001.

PALMER, A.A.; STEELE, M.K.; SHACKELFORD, R.L. & GANONG, W. Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 205: 263-266, 1994.

PAN, H.L. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *The Neuroscientist* 10: 422-431, 2004.

PANAGIOTAROPOULOS, T.; PAPAIOANNOU, A.; PONDIKI, S.; PROKOPIOU, A. STYLIANOPOULOU, F. & GEROZISSIS, K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology* 79: 109-118, 2004.

PAPAIOANNOU, A.; GEROZISSIS, K.; PROKOPIOU, A.; BOLARIS, S. & STYLIANOPOULOU, F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animals's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behavioural Brain Research* 129:131-139, 2002.

PASSERIN, A.M.; CANO, G.; RABIN, B.S.; DELANO, B.A.; NAPIER, J.L. & SVED, A.F. Role of locus coeruleus in foot shock-evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience* 101: 1071-1082, 2000.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-167, 1985.

PETERSEN, S.L.; OTTEM E.N. & CARPENTER, C.D. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biology of Reproduction* 69: 1771-1779, 2003.

PFAFF, D.W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S.; McCARTHY, M.M. & KOW, L.M. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. Em: KNOBIL & E.; NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*, vol. 2, New York, Raven Press, pp. 107-220, 1994.

PFAUS, J.G.; MARCANGIONE, C.; SMITH, W.J.; MANITT, C. & ABILLAMAA, H. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Research* 741: 314-330, 1996.

PHILLIPS, M.I. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annual Reviews of Physiology* 49: 413-435, 1987.

PHILLIPS, M.I., SPEAKMAN, E.A. & KIMURA, B. Levels of angiotensin and

molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory Peptides* 43: 1-20, 1993.

PHILLIPS, M.I.; WANG, H.; KIMURA, B.; REJTMAN, M.; KODURI, P. & KALRA, P. Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132: 1637-1642, 1992.

PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research* 18: 195-200, 1993.

RABIN, D.S.; JOHNSON, E.O.; BRANDON, D.D.; LIAPI, C. & CHROUSOS, G.P. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biology of Reproduction* 42: 74-80, 1990.

RAJENDREN, G.; DUDLEY, C.A. & MOSS, R.L. Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiology & Behaviour* 50: 705-710, 1991.

RAJENDREN, G. & MOSS, R.L. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neural system. *Brain Research* 617: 81-87, 1993.

RAJENDREN, G. & MOSS, R.L. Vomeronasal organ-mediated induction of *fos* in the central accessory olfactory pathways in receptively mated female rats. *Brain Research Bulletin* 48: 173-183, 1994.

REAGAN L.P.; FLANAGAN-CATO, L.M.; YEE, D.K.; MA, L.; SAKAI, R.R. & FLUHARTY, S.J. Immunohistochemical mapping of angiotensin type 2 (AT<sub>2</sub>) receptors in rat brain. *Brain Research* 662: 45-59, 1994.

REID, I.A. Is there a brain renin-angiotensin system? *Circulation Research* 41: 147-153, 1977.

RETTORI, V.; CANTEROS, G.; RENOSO, R.; GIMENO, M. & McCANN, S.M. Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2741-2744, 1997.

RINGSTROM, S.J.; SZABO, M.; KILEN, S.M.; SABERI, S.; KNOX, K.L. & SCHWARTZ, N.B. The antiprogestins RU 486 and ZK98299 affect follicle-stimulating hormone secretion differentially on estrus, but not on proestrus. *Endocrinology* 138: 2286-2290, 1997.

RIVEST, S. & RIVIER, C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocrine Reviews* 16: 177-199, 1995.

RIVIER, C. & VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305: 325-327, 1983.

RODRIGUES, A.L.; ARTENI, N.S.; ABEL, C.; ZYLBERSZTEJN, D.; CHAZAN, R.; VIOLA, G.; XAVIER, L.; ACHAVAL, M. & NETTO, C.A. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research* 1002: 94-99, 2004.

SAAD, W.A.; LUIZ, A.C.; CAMARGO, L.A.; MENANI, J.V.; RENZI, A. & SILVEIRA, J.E. Central angiotensin converting enzyme-blockade and thirst. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 999-1007, 1993.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews* 13: 329-386, 1992.

SAAVEDRA, J.M.; ANDO, H.; ARMANDO, I.; BAIARDI, G.; BREGONZIO, C.; JEZOVA, M. & ZHOU, J. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018: 76-84, 2004.

SABBAN, E.L.; HEBERT, M.A.; LIU, X.; NANKOVA, B. & SEROVA, L. Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems. *Annual New York Academy of Sciences* 1032: 130-140, 2004.

SAKAKURA, N.; TAKEBE, K. & NAKAGAWA, S. Inhibition of luteinizing hormone secretion induced by synthetic LHR by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 40: 774-779, 1975.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M. & MUNK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Review* 21: 55-89, 2000.

SATOU, M. & YAMANOUCI, K. Effect of direct application of estrogen aimed at lateral septum or dorsal raphe nucleus on lordosis behavior: regional and sexual differences in rats. *Neuroendocrinology* 69: 446-452, 1999.

SAUVAGE, M. & STECKLER, T. Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei-potential implication for arousal and attention. *Neuroscience* 104: 643-652, 2001.

SAVOY-MOORE, R.T.; SCHAWARTZ, N.B.; DUCAN, J.A. & MARSHALL, J.C. Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209: 942-944, 1980.

SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; van WOEZIK, J.H.G.; LEVINE, S.; de KLOET, E.R. & OITZL, S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 52-57, 2004.

SCHMIDT, M.; LEVINE, S. OITZL, M.S.; van der MARK; MÜLLER, M.B.; HOLSBOER, F. & de KLOET, E.R. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology* 146: 1458-1464, 2005.

SCHWABER, J.S.; KAPP, B.S. & HIGGINS, G. The origin and extent of direct amygdala projections to the region of the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience Letter* 20: 15-20, 1980.

SCHWARTZ, N.B. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. Em: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Editores: CONN, P.M. & FREEMAN, M.E. New Jersey: Humana Press, pp. 135-146, 2000.

SELTZER, A. TSUTSUMI, K, SHIGEMATSU, K. & SAAVEDRA, J.M. Reproductive hormones modulate angiotensin II AT1 receptors in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology* 133: 939-941, 1993.

SEVERINO, G.S.; FOSSATI, I.A.M.; PADOIN, M.J.; GOMES, C.M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G.L.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & LUCION, A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior* 81: 489-498, 2004.

SIECK, G. & RAMALEY, J. A. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiology & Behavior* 15: 487-489, 1975.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K.; CLEMENTE, Z. & DALMAZ, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not anxiety-like behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23: 93-99, 2005.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K.; CLEMENTE, Z.; BASSANI, E.; TABAJARA, A.S.; GAMARO, G.D.; DANTAS, G.; TORRES, I.L.S.; LUCION, A.B. & DALMAZ, C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiology & Behavior* 80: 739-745, 2004.

SILVERMAN, A.J. Magnocellular neurosecretory system. *Annual Review of Neuroscience* 6: 357-380, 1983.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E. & NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.

SPENCER, S.J.; EBNER, K. & DAY, T.A. Differential involvement of rat medial prefrontal cortex dopamine receptors in modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to different stressors. *European Journal of Neuroscience* 20: 1008-1016, 2004.

SPETH, R.C.; DAUBEN, D.L. & GROVE, K.L. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regulatory Peptides* 79: 25-40, 1999.

SPETH, R.C.; GROVE, K.L. & ROWE, B.P. Angiotensin II and the locus coeruleus. *Progress in Brain Research* 88: 217-226, 1991.

STAMP, J. & HERBERT, J. Corticosterone modulates autonomic responses and adaptation of central immediate-early gene expression to repeated restraint stress. *Neuroscience* 107: 465-479, 2001.

STEELE M.K. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3: 295-301, 1992.

STEELE, M.K.; GALLO, R.V. & GANONG, W.F. A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *American Journal of Physiology* 245: R805-R810, 1983.

STEELE, M.K.; GALLO, R.V. & GANONG, W.F. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. *Neuroendocrinology* 40: 210-216, 1985.

STEPHENSON, K.N. & STEELE, M.K. Brain angiotensin II receptor subtypes and the control luteinizing hormone and prolactin secretion in female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 4: 441-447, 1992.

STERN, J.M. & KOLUNIE, J.M. Maternal aggression of rats is impaired by cutaneous anesthesia of the ventral trunk, but not by nipple removal. *Physiology & Behavior* 54: 861-868, 1993.

SUCHECKI, D; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P. & LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57: 204-212, 1993.

SUCHECKI, D.; NELSON, D.Y.; van OERS, H. & LEVINE, S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20: 169-183, 1995.

SZABO, M.; KNOX, K.L.; RINGSTROM, S.J.; PERLYN, C.A.; SUTANDI, S. & SCHWARTZ, N.B. Mechanism of the inhibitory action of RU486 on the secondary follicle-stimulating surge. *Endocrinology* 137: 85-89, 1996.

SWANSON, L.W. & SAWCHENKO, P.E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31: 410-417, 1980.

SWANSON, L.W. & SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience* 6: 269-324, 1983.

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVER, J. & VALE, W.W. Organization of ovine corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36: 165-186, 1983.

SWIERGIEL, A.H.; TAKAHASHI, L.K. & KALIN, N.H. Attenuation of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing factor receptors in the central amygdala in the rat. *Brain Research* 623: 229-234, 1993.

SZAWKA, R.E. & ANSELMO-FRANCI, J.A. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. *Life Sciences* 75: 911-922, 2004.

TANAPAT, P.; GALEA, L.A.M. & GOULD, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *International Journal of Developmental Neuroscience* 16: 235-239, 1998.

TIMMERMANS, P.B.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINI, D.J.; LEE, R.J.; WEXLER, R.R.; SAYE, J.A. & SMITH, R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacology Review* 45: 205-51, 1993.

TSUKAHARA, S.; EZAWA, N. & YAMANOUCHI, K. Neonatal estrogen decreases neural density of the septum-midbrain central gray connection underlying the lordosis-inhibiting system in female rats. *Neuroendocrinology* 78: 266-233, 2003.

TSUKAHARA, S.; TSUKAMURA, H.; FOSTER, D.L. & MAEDA, K.I. Effect of corticotropin-releasing hormone antagonist on oestrogen-dependent glucoprivic suppression of luteinizing hormone secretion in female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 11: 101-105, 1999.

TSUKAHARA, S. & YAMANOUCHI, K. Sex difference in septal neurons projecting axons to midbrain central gray in rats. A combined double retrograde tracing and ER-immunohistochemical study. *Endocrinology* 143: 285-294, 2002.

TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *American Journal of Physiology* 261: R209-R216, 1991.

WALKER, C. D.; PERRIN, M.; VALE, W. & RIVER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: Role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118: 1445-1451, 1986.

WARD, I. L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175: 82-84, 1972.

WEIDENFELD, J.; NEWMAN, M.E.; ITZIK, A.; GUR, E. & FELDMAN, S. The amygdala regulates the pituitary-adrenocortical response and release of hypothalamic serotonin following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Neuroendocrinology* 76: 63-69, 2002.

WILLIAMS, C.L.; NISHIHARA, M.; THALABARD, J.C.; GROSSER, P.M.; HOTCHKISS, J. & KONOBIL, E. Corticotropin-releasing factor and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. Electrophysiological studies. *Neuroendocrinology* 52: 133-137, 1990.

WINDLE, R.J.; KERSHAW, Y.M.; SHANKS, N.; WOOD, S.A.; LIGHTMAN, S.L. & INGRAM, C.D. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamus-pituitary-adrenal activity. *The Journal of Neuroscience* 24: 2974-2982, 2004.

WITCHER, J.A. & FREEMAN, M.E. The proestrous surge of prolactin enhances receptivity in the rat. *Biology of Reproduction* 32: 834-839, 1985.

XIAO, L. & BECKER, J.B. Hormonal activation of the striatum and the nucleus accumbens modulates paced mating behavior in the female rat. *Hormones and Behavior* 32: 114-124, 1997.

YAMANOUCHI, K., MATSUMOTO, A. & ARAI, Y. Neural and hormonal control of lordosis behavior. *Zoological Science* 2: 617-627, 1985.

ZIEGLER, D.R.; CASS, W.A. & HERMAN, J.P. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *Journal of Neuroendocrinology* 11: 361-369, 1999.