

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PPG CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NEUROCIÊNCIAS

**A MICROINJEÇÃO DE ANGIOTENSINA II NA AMÍGDALA MEDIAL
REDUZ O COMPORTAMENTO SEXUAL EM RATAS**

Dissertação de Mestrado

Ana Lúcia Cecconello

**Porto Alegre
2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PPG CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NEUROCIÊNCIAS

**A MICROINJEÇÃO DE ANGIOTENSINA II NA AMÍGDALA MEDIAL REDUZ O
COMPORTAMENTO SEXUAL EM RATAS**

Ana Lúcia Cecconello

Orientador

Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Neurociências

**Porto Alegre
2005**

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Gilberto Luiz Sanvitto pela orientação, confiança e compreensão.

Ao Prof. Dr. Aldo Lucion pela contribuição para o meu aprendizado.

Ao meu pai e minha mãe (*in memoriam*) pelo apoio que contribuiu infinitamente para minha formação e crescimento pessoal.

À doutoranda e amiga Carmem pelos ensinamentos, tanto do ponto de vista intelectual como de vida.

Aos amigos Charlis e Márcio pela alegria, carinho e dedicação.

À Prof. Dra. Matilde Achaval pela contribuição para minha formação e também pelo carinho.

À Márcia Breigeiron, Rosane e Erica pelo apoio técnico e intelectual.

Aos bolsistas de iniciação científica, Paulinho e Luiz Felipe pela pronta ajuda em momentos necessários.

À Angela (bioterista) pelo seu excelente trabalho de manutenção dos animais.

Ao biólogo Toninho pelo apoio técnico.

Aos meus irmãos Ernesto e Filomena pelo constante incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1 Comportamento sexual	2
1.2 Amígdala medial	5
1.3 Sistema angiotensinérgico e função reprodutiva	7
2. Hipótese	11
3. Objetivo	11
4. Material e métodos	12
4.1 Animais	12
4.2 Seleção dos animais utilizados	12
4.3 Verificação do ciclo estral	13
4.4 Cirurgia estereotáxica	13
4.5 Administração dos fármacos	17
4.6 Registro comportamental	17
4.7 Parâmetros comportamentais utilizados	18
4.8 Contagem de óvulos	19
4.9 Verificação do local da injeção	19

4.10	Desenho experimental	21
4.11	Expressão dos resultados	23
4.12	Análise estatística	23
5.	Resultados	24
	Quociente de lordose	25
	Frequência de monta	26
	Frequência de locomoção	27
	Duração de locomoção	27
	Número de óvulos	28
6.	Discussão	29
7.	Conclusões	34
	Referências Bibliográficas	35

ABREVIATURAS

Ang II – angiotensina II

ASO – sistema olfatório acessório

AOB – bulbo olfatório acessório

AMPO – área pré-óptica

AT – receptor de angiotensina

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

GABA – ácido γ -aminobutírico

GAD – ácido glutâmico descarboxilase

ivc - intracerebroventricular

LH – hormônio luteinizante

LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante

LC – locus coeruleus

MeA – núcleo medial da amígdala

NA - noradrenalina

VMH – núcleo hipotalâmico ventromedial

pg - picogramas

LISTA DE FIGURAS

Material e métodos

Figura 1 (Esquema em corte coronal do encéfalo de rato)	15
Figura 2 (contágem de óvulos)	18
Figura 3 (Fotomicrografia – local da microinjeção)	20

Resultados

Figura 4 (quociente de lordose)	25
Figura 5 (freqüência de montas)	26
Figura 6A (freqüência de locomoção)	27
Figura 6B (duração de locomoção)	27
Figura 7 (número de óvulos)	28

RESUMO

A Angiotensina II (Ang II) é um octapeptídeo que exerce múltiplas ações centrais e periféricas, entre as quais a modulação de alguns tipos de comportamentos. Estudos prévios demonstram que microinjeções de Ang II na amígdala medial (MeA) diminui o comportamento sexual em ratos machos. Para testar a hipótese de que a Ang II central está envolvida na modulação do comportamento sexual em fêmeas, este peptídeo foi injetado na MeA em ratas. Para isto foram utilizadas ratas Wistar adultas nas quais foram implantadas cânulas guias bilateralmente na amígdala medial por estereotaxia. Após a cirurgia estereotáxica, as ratas foram divididas em seis grupos experimentais: salina - controle (n = 11), 10 pg de Ang II (n = 10), 25 pg de Ang II (n = 11), 50 pg de Ang II (n = 11), 100 pg de Ang II (n = 11) e 200 pg (n = 11) . As microinjeções (0,3 µl) na amígdala medial foram realizadas na noite do proestro, quinze minutos antes do registro de comportamento sexual. O registro comportamental consistiu na observação da fêmea em proestro junto a um macho adulto por 15 minutos. Os parâmetros comportamentais analisados foram: quociente de lordose (número de lordose/número de montas), frequência e duração de locomoção. Na manhã seguinte ao registro comportamental foi contado o número de óvulos destas fêmeas. Os resultados mostraram uma redução significativa no quociente de

lordose nos grupos que receberam as doses de 100 e 200 pg de Ang II , enquanto que os demais grupos não apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle. Este efeito parece não ser devido a uma inibição comportamental geral, pois tanto a frequência como a duração de locomoção não demonstraram alterações significativas. Estes dados sugerem que a Ang II participa da modulação do comportamento sexual em ratas via MeA.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) is a regulatory peptide well known for its role in the control of fluid balance and cardiovascular function. Previous studies showed that the microinjection of this peptide intraventricular or into the medial amygdala (MeA) decreased sexual behavior in male rats. To test the hypothesis that brain Ang II is involved in the modulation of sexual behavior in female rats, this peptide was injected into the medial amygdaloid nucleus (MeA). The sexual behavior of female adult rats (lordosis reflex) was evaluated, 15 min after bilateral microinjection (0,3 μ l) of saline - control and 5 doses of Ang II: 10, 25, 50, 100 and 200 pg. Data (means \pm SEM) were analyzed using a one-way ANOVA test. Pos hoc analyzes was performed using the Newman-Keuls test. Statistic significance was defined as $p < 0,05$. The doses of 100 and 200 pg Ang II caused inhibition of lordosis quotient – LQ (number of lordosis/ number of mouts). However, this peptide no had effects on the frequency and duration of general locomotor behaviour or on ovulation as compared to saline group. These data suggest that Ang II, in MeA, could exert a neuromodulatory effects on sexual behaviour in female rats.

1. INTRODUÇÃO

A angiotensina II (Ang II) exerce múltiplas ações no organismo, seja por um efeito periférico direto sobre o tecido-alvo, seja indiretamente pela Ang II circulante, mediando funções do sistema nervoso central (SNC) através dos órgãos circumventriculares, ou pela Ang II produzida no próprio SNC. As ações mais estudadas da Ang II são o controle da pressão arterial e o equilíbrio hidro-eletrolítico (PAN, 2004). Por outro lado, a hipertensão tem sido associada à disfunção sexual em humanos, como também tem sido demonstrada uma relação do tratamento anti-hipertensivo com inibição da função sexual (FERRARIO & LEVY, 2002; DUSING, 2003).

Além disso, a existência de síntese de Ang II dentro do SNC permite que este peptídeo atue diretamente em vários circuitos neurais modulando uma série de eventos, entre eles a função reprodutiva (SAAVEDRA, 1992; PAN, 2004). Existem evidências demonstrando que a Ang II exerce efeito inibitório sobre o comportamento sexual em ratos machos agindo diretamente na amígdala medial (MeA), um núcleo da região límbica (BREIGEIRON *et al*, 2002). Por outro lado, pouco se sabe sobre a influência deste peptídeo neste núcleo sobre o comportamento sexual em fêmeas.

1.1 Comportamento sexual:

Os processos reprodutivos desde a instalação da puberdade até a execução do comportamento sexual, são primariamente controlados pelos esteróides gonadais (PFAFF *et al.* 1994; WHITE & UPHOUSE, 2004). Os circuitos que integram o comportamento sexual apresentam diferenças anatômicas e neuroquímicas entre machos e fêmeas, sendo que o padrão básico da morfologia desta circuitaria é o de fêmea, enquanto que o padrão do macho se estabelece durante um período crítico perinatal e depende da presença de testosterona. Isto pode ser evidenciado por dados experimentais que demonstram que ovariectomia no período perinatal em fêmeas exerce pouca influencia no comportamento sexual do animal adulto tratado com hormônios gonadais femininos; enquanto a castração perinatal do macho levará a uma alteração permanente na execução de tais comportamentos na fase adulta, mesmo na presença de níveis adequados de hormônios gonadais masculinos. Desta forma, durante um período crítico do desenvolvimento, a exposição do SNC a hormônios gonadais determina mudanças irreversíveis na organização morfológica dos circuitos neurais envolvidos na organização dos comportamentos reprodutores, enquanto que no adulto tais hormônios parecem modular estes circuitos de forma transitória (CANTERAS, 1999; GORSKI, 2000). Os hormônios gonadais podem afetar a morfologia de neurônios em ratos adultos, por exemplo, no núcleo amigdalóide medial (MeA) que possui receptores para estes hormônios e é uma área sexualmente dimórfica em ratos (RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Além disso, a área pré-óptica e o hipotálamo ventromedial, que junto com a amígdala medial fazem

parte da circuitaria envolvida no comportamento sexual, também apresentam dimorfismo sexual (KARTHA & RAMAKRISHNA 1996; CANTERAS, 1999, MADEIRA *et al* 2001). Neurônios sensíveis ao estrógeno foram encontrados predominantemente na área pré-óptica medial (APOM) , hipotálamo, amígdala, parte do mesencéfalo, bulbo olfatório e córtex cerebral (KATO & VILLE, 1967; PFAFF & KEINER, 1973; SIMERLY *et al*, 1990; SHUGHRUE *et al.*, 1997, SHIMA *et al* 2003). Além disso, foi demonstrado que a concentração de RNAm para receptores de estrógeno muda durante o ciclo estral, assim como ocorre expressão diferencial no sistema nervoso (SHUGHRUE *et al.*, 1992).

No estudo do comportamento sexual dos mamíferos, o de roedores tem sido o mais investigado (SACHS & MEISEL, 1988). Portanto, neste trabalho será focalizado basicamente o que se sabe nestas espécies. Deve-se, contudo, lembrar que comparações entre espécies muitas vezes não podem ser válidas, particularmente no caso de seres humanos, onde diversos fatores cognitivos exercem influencia na execução desta categoria comportamental (CANTERAS, 1999). Em roedores, a característica mais proeminente do comportamento de receptividade sexual é a postura para a cópula assumida pela fêmea, denominada reflexo de lordose, a qual refere-se à flexão dorsal da coluna vertebral, quando o macho monta na mesma. Este comportamento auxilia na intromissão peniana do macho. Na ausência da lordose a intromissão e ejaculação não serão possíveis. Existem receptores sensoriais nos flancos e no períneo da fêmea que, quando estimulados, levam a informação através de neurônios sensoriais responsivos à pressão até a parte dorsal da medula espinhal. A partir daí a informação segue até

a formação reticular e mesencéfalo. O hipotálamo ventromedial governa o componente motor do reflexo de lordose incluindo as seguintes projeções: do hipotálamo ventromedial – substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo - formação reticular bulbar – corno ventral da medula espinhal – músculos envolvidos com a lordose. O comportamento de lordose, assim como todo comportamento de receptividade sexual em fêmeas, é um processo dependente de estrógeno e progesterona (PFAFF *et al.* 1994; PFAUS, *et al.*, 1993; HOLSTEGE, *et al.*, 1997; WHITE & UPHOUSE, 2004). Cabe ressaltar que os receptores de progesterona parecem ser mais importante do que o próprio esteróide, pois estes podem ser ativados independente da presença de progesterona, induzindo a receptividade sexual da fêmea. Estudos demonstram que neurotransmissores como a dopamina, por exemplo, podem ativar receptores de progesterona de maneira independente desta (MANI, 2001; AUGER, 2001).

Está bem estabelecido existência de uma via dependente de estrógeno e progesterona a qual exerce um efeito estimulatório para o reflexo de lordose e inclui o sistema olfatório acessório -ASO, núcleo medial da amígdala - MeA e hipotálamo ventromedial – VMH (ROWE & ERSKINE, 1993; DUDLEY *et al* 1996; FLANAGAN-CATO *et al* 2001). O ASO é composto pelo órgão vomeronasal (uma região quimicamente sensível aos feromônios localizada dentro da cavidade nasal), pelo bulbo olfatório acessório (AOB) e projeções do bulbo olfatório acessório, as quais são enviadas para o núcleo MeA (RAJENDREN & MOSS, 1994) e este, por sua vez, envia axônios para o VMH (KRETTEK & PRICE, 1978). Durante a execução do comportamento sexual estas regiões apresentam aumento

no número de células imunorreativas para Fos, indicando aumento de atividade neuronal (RAJENDREN & MOSS, 1993; ROWE & ERSKINE, 1993). Por outro lado, a remoção de qualquer um dos componentes desta via não permite que ocorra o reflexo de lordose, induzido pelo macho, mesmo em presença de níveis adequados de estrógeno e progesterona (RAJENDREN *et al.*, 1990, 1991; RAJENDREN & MOSS, 1993, 1994).

Evidências têm demonstrado aumento da atividade de neurônios produtores de LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante), predominantemente no septo medial, órgão vasculoso da lâmina terminal, área pré-óptica e área hipotalâmica anterior, durante a ativação de regiões envolvidas no comportamento sexual. Além disto, a atividade desses neurônios se mostra diminuída nos casos de destruição de áreas envolvidas no reflexo de lordose, sugerindo a participação deste hormônio neste comportamento (RAJENDREN & MOSS, 1993).

1.2 Amígdala medial

O núcleo medial da amígdala pertence ao complexo amigdalóide, o qual está localizado dentro do lobo temporal e integra parte do sistema límbico (SAH, *et al.*, 2003). Localiza-se imediatamente ao lado ventrolateral do tracto óptico e seus bordos são pouco definidos (OLMOS *et al.*, 2004). Trata-se de uma complexa estrutura que tem sido dividida, baseado em critérios morfológicos e funcionais, em quatro subnúcleos: anterodorsal, anteroventral, posterodorsal e posteroventral (OLMOS *et al.*, 2004; CANTERAS *et al.*, 1995).

A amígdala medial exerce um importante papel sobre o comportamento sexual tanto em fêmeas como em machos (MASCÓ & CARRER, 1990; RASIA-FILHO *et al*, 1999; RAJENDREN & MOSS, 1993; VEENING & COOLEN, 1998; WOOD, 1997; MARTIN, 1998). Este núcleo age como um centro processador de informações vindas do AOS e enviadas a outros núcleos como o VMH e área pré-optica medial permitindo a execução do comportamento de lordose em ratas (CANTERAS *et al* 1995; OLMOS *et al*, 2004).

Na MeA são produzidos uma serie de neuropeptídeos, entre eles a Angiotensina II, sendo que o subnúcleo posterodorsal parece ser responsável por grande parte da produção desta, apresentando densa distribuição de neurônios sintetizadores deste peptídeo (OLMOS *et al*, 2004). Mapeamentos imunistoquímicos demonstram densa expressão da imunorreatividade à Ang II principalmente na amígdala medial posterodorsal (LIND *et al* 1985; OLMOS *et al*, 2004). Além disso este núcleo também apresenta receptores angiotensinérgicos do tipo AT₁ e AT₂ (von BOHLEN, *et al* 1998 a, b; BREIGEIRON *et al*, 2002). Por outro lado, existem evidências indicando que na MeA ocorre síntese de de GABA (ácido γ -aminobutírico) demonstrado pela presença de GAD - enzima conversora de glutamato em GABA (ESCLAPEZ *et al*, 1993) e também por apresentar neurônios marcados por imunistoquímica para GABA (SUN & CASSELL, 1993).

1.3 Sistema angiotensinérgico e função reprodutiva:

Além de um sistema renina-angiotensina periférico, envolvido com regulação da função cardiovascular, sede, apetite por sal e liberação de vasopressina (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991), a Ang II é, também, um peptídeo produzido dentro do sistema nervoso central agindo como neurotransmissor ou modulador para influenciar a neurotransmissão e excitabilidade do neurônio. (LI & FERGUSON, 1993).

Tem sido demonstrada a existência de um sistema renina-angiotensina central (NARUSE, *et al*, 1985), evidenciado pela presença de RNAm para os componentes deste sistema no hipotálamo, cerebelo, sistema límbico entre outras regiões do SNC, sugerindo a produção endógena da Ang II nestes locais (WRIGHT & HARDING 1992; LENKEI *et al*, 1997). O angiotensinogênio, a molécula precursora da Ang II é localizada tanto no meio extracelular (MORRIS & REID, 1978) como em astrócitos associados com capilares e oligodendrócitos associados com neurônios (RICHOUX *et al*, 1988; DESCHEPER *et al*, 1986), como também em algumas populações neuronais (IMBODEM *et al*, 1987). Além disso, a presença de RNAm para angiotensinogênio principalmente em astrócitos, demonstra a importância destas células para a síntese do precursor para Ang II (STORNETTA *et al*, 1988). Já a renina, enzima que converte angiotensinogênio em Ang I, está presente em alta concentração nos terminais nervosos (PAUL *et al*, 1985) podendo ser liberada por despolarização da membrana neuronal (MOFFETT *et al*, 1987). Quanto à enzima conversora de angiotensinogênio (ECA),

enzima que cataliza a hidrólise do decapeptídeo Ang I, transformando-o no octapeptídeo Ang II, encontra-se em alta concentração no plexo coriário e órgãos circumventriculares. Estudos imunoistoquímicos no órgão subfornicial revelam esta enzima associada à membrana neuronal próxima à vesículas secretoras de Ang II (PAUL *et al*, 1985; PICKEL *et al*, 1986). Já a Ang II tem sido localizada apenas em neurônios e não em células da glia (LIND *et al* 1985).

A Ang II central parece contribuir para a regulação fina dos processos fisiológicos. A distância entre o sítio de liberação dessa e o seu receptor é consideravelmente menor quando comparada com a Ang II na circulação periférica, o que permite que a ação da Ang II central seja mais rapidamente ajustada (PHILLIPS, 1987). As concentrações deste peptídeo no tecido nervoso são relativamente baixas e difíceis de serem mensuradas (PHILLIPS, 1987), variando, em ratos, de 590 fmol/g de tecido no hipotálamo a 15 fmol/g de tecido no córtex (PAN, 2004)

A Ang II produz seus efeitos através de seus receptores do tipo 1 (AT1) ou do tipo 2 (AT2) (BUMPUS *et al* 1991). No encéfalo de adultos o tipo de receptor predominante é o AT1 (MURPHY *et al*, 1991), embora em algumas áreas coexistam tanto AT1 quanto AT2 como, por exemplo, na MeA (BRIGERON, 2002). Este dois tipos de receptores são acoplados à proteína G, sendo que o mecanismo de transdução do AT1 envolve fosfolipase C, geração de inositol trifosfato e mobilização de Ca^{++} (RICHARDS *et al*, 1999). Quanto ao AT2, pouco

se sabe sobre o seu mecanismo de transdução de sinal, mas talvez envolva fechamento de canais de K^+ (ZHU *et al.*, 1998, 2000)

A interação da Ang II com os hormônios que controlam a reprodução está bem caracterizada. A administração intracerebroventricular (icv) de Ang II afeta a liberação do hormônio luteinizante (LH) de modo dependente dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona (STEELE, 1992). De fato, em ratas ovariectomizadas não tratadas com esteróides gonadais, este peptídeo inibe a liberação pulsátil de LH. Ao contrário, em animais com reposição hormonal ela estimula esta liberação (STEELE *et al.*, 1985). O estímulo da Ang II central para secreção de LH não ocorre diretamente no gonadotrofo (STEELE, 1992). A ação indireta da Ang II ocorre presumivelmente através da liberação de noradrenalina (NA) endógena no locus coeruleus (LC) que por sua vez atua sobre receptores alfa-adrenérgicos da APOM facilitando a secreção de LHRH ou diretamente sobre neurônios LHRH (GITLER & BARRACLOUGH, 1987; FRANCI *et al.*, 1990; STEELE, 1992; GANONG, 1993; DORNELLES & FRANCI, 1998;).

Sabe-se que há aumento do conteúdo de Ang II hipotalâmica no proestro quando comparado com o diestro em fêmeas intactas (GHAZI *et al.*, 1994). Conforme Steele *et al.* (1983) a administração icv de Ang II em ratas, durante a manhã do proestro, aumenta a secreção de LH. Já a microinjeção icv de saralasiãna, um antagonista AT_1/AT_2 , durante a tarde do proestro, inibe o pico de

LH e bloqueia a ovulação, demonstrando a importância da Ang II no controle da ovulação.

Por outro lado, evidências demonstram que a Ang II central inibe o comportamento sexual em machos. Estudos mostram que injeções icv de Ang II diminuem o comportamento sexual em ratos machos (CLARK, 1989; KEATON & CLARK, 1998). Além disso, microinjeções de Ang II na MeA também diminui o comportamento sexual em ratos machos (BREIGEIRON *et al.*, 2002)

Considerando que a MeA: 1) exerce um importante papel no comportamento sexual tanto em machos como em fêmeas (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; VEENING & COOLEN, 1998); 2) que possui sítios específicos de ligação para Ang II (VON BOHLEN *et al.*, 1998 a, b; SAAVEDRA, 1992); 3) a existência de dimorfismo sexual nesta área; 4) que pouco se sabe sobre os efeitos da Ang II neste núcleo sobre o comportamento sexual de fêmeas, propomos avaliar o influencia da Ang II na MeA sobre o comportamento sexual em ratas.

2. HIPÓTESE

Ang II participa da modulação do comportamento sexual em fêmeas via MeA.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo:

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito da microinjeção de diferentes doses de Angiotensina II na MeA sobre o comportamento sexual em ratas.

3.2 Verificar:

- ◆ A Ang II tem efeito modulatório sobre o comportamento sexual em fêmeas através da MeA?
- ◆ A microinjeção da Ang II na MeA afeta a ovulação?

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas adultos, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Estes animais foram mantidos sob ciclo de claro-escuro de 12 h, com ciclo escuro iniciando às 18 horas. Neste ambiente a temperatura foi mantida entre 20 e 24° C e todos os animais receberam ração e água *ad libitum*.

4.2 Seleção dos animais utilizados:

Foram utilizadas fêmeas adultas que apresentaram no mínimo 3 ciclos estrais regulares antes da cirurgia de estereotaxia.

Os machos foram testados quanto ao seu desempenho sexual. Este teste consistiu em avaliar, durante dez minutos, o comportamento sexual do macho perante uma fêmea adulta, a qual foi ovariectomizada e recebeu reposição hormonal (benzoato de estradiol - benzo-ginoestril ap® 5mg-SARSA na dose de 20 µg/rata e 48 horas depois, injeções de progesterona-Sigma na dose de 2,5 mg/rata mais benzoato de estradiol na dose de 20 µg/rata). Somente os machos que obtiveram mais de seis montas em dez minutos foram considerados

sexualmente ativos (GOMES, 2001) e separados para serem submetidos ao experimento de avaliação da receptividade sexual da fêmea na noite do proestro.

4.3 Verificação do ciclo estral:

Fêmeas adultas tiveram o acompanhamento do ciclo estral através de esfregaço vaginal realizado diariamente às 11 horas da manhã e feita análise através de um microscópio. Aquelas que apresentaram no mínimo 3 ciclos regulares foram submetidas à cirurgia esterotáxica. Após a cirurgia retornaram ao acompanhamento do ciclo estral e somente as que tiveram no mínimo 1 ciclo regular foram incluídas no experimento na fase do proestro.

4.4 Cirurgia estereotáxica:

A cirurgia constitui-se da canulação estereotáxica bilateral da MeA. Para localização precisa, foi utilizado o atlas de cérebro de ratos (PAXINOS & WATSON, 1986) , como demonstrado na figura 1, onde foram retiradas as medidas para o acesso cirúrgico e feita as devidas adaptações para correta localização do núcleo desejado. As coordenadas utilizadas foram:

- ◆ antero-posterior: - 2,7 mm
- ◆ lateral: $\pm 3,5$ mm
- ◆ vertical: - 6,5 mm

Todas as medidas foram consideradas a partir do bregma como ponto zero. A medida da coordenada vertical foi considerada a partir das membranas meníngeas. A cânula, verticalmente colocada, ficou dois milímetros acima do núcleo da MeA, e o acesso ao interior do núcleo foi realizado com uma agulha injetora que atingiu a medida vertical de 8,5 mm no cérebro.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com Xilazina (50mg/kg) seguida de Cloridrato de Cetamina (100mg/kg). As cânulas foram introduzidas com auxílio do aparelho estereotáxico de David Kopf onde a cabeça, colocada reta no aparelho, e a mandíbula do animal, foram fixadas de maneira firme, com pinos colocados em seu conduto auditivo externo e uma presilha em seus dentes incisivos.

Após terem sido anestesiadas e fixadas no estereotáxico, as ratas foram submetidas a uma incisão longitudinal na pele, na linha média da região superior do crânio, expondo o perióstio, onde foi realizada a técnica de trepanação, utilizando-se uma broca, com largura adequada para a passagem das cânulas de maneira perpendicular ao cérebro. As cânulas tiveram comprimento de 13 mm e diâmetro externo de 0,6 mm. Depois de introduzidas as cânulas, seguindo as coordenadas acima citadas, essas foram fixadas com polímero sintético (acrílico) e com auxílio de um pequeno parafuso acoplado ao tecido ósseo.

Terminado este procedimento, as ratas foram retiradas do estereotático e mantidas aquecidas sob uma lâmpada de 60 watts incandescente, até recuperação anestésica, que dura em torno de 2 à 4 horas. Após a recuperação da anestesia as ratas foram acondicionadas em suas caixas de origem e mantidas no biotério de experimentação.

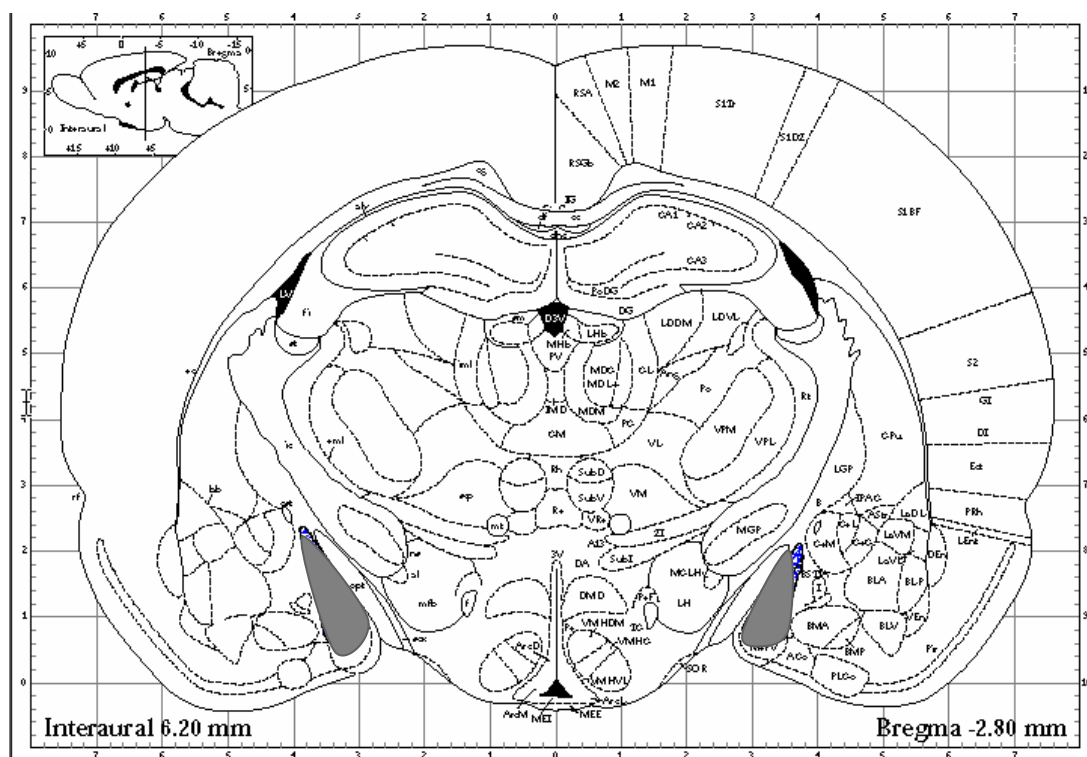


Figura 1: Esquema em corte coronal de encéfalo obtido do atlas de cérebro de ratos, Paxinos & Watson (1986). As áreas (MeA esquerda e direita) onde foram realizadas as canulações estão assinaladas em cinza.

4.5 Administração de salina e diferentes doses de Ang II:

Quinze minutos antes do início do registro de comportamento foi injetado, via cânula, doses de Angiotensina II humana - Sigma (10, 25, 50, 100 e 200 pg) e solução salina como controle. As injeções foram realizadas com auxílio de uma seringa de Hamilton de 10 μ l, onde em sua extremidade foi acoplado um tubo de polietileno de 30 cm e uma agulha de anestesia odontológica descartável de 15 mm de comprimento. O volume injetado para cada dose foi de 0,3 μ l administrado durante 1 minuto. A agulha injetora foi retirada lentamente após 30 segundos do término da administração da dose.

4.6 Registro Comportamental:

Para o registro do comportamento sexual, os animais foram colocados em caixas de observação com dimensões de 70 x 70 x 35 cm com paredes de aço e parede frontal de vidro, o que permite ampla visualização dos animais. O chão das mesmas foi coberto com maravalha.

A sala foi mantida com sonoridade controlada. Em todo o experimento, o registro foi realizado de uma a três horas após início da fase escura.

Inicialmente, o macho foi retirado da caixa onde estava ambientado e colocado na caixa de observação por um período de dez minutos para adaptação ao novo

ambiente. Após este intervalo, a fêmea foi colocada junto ao macho iniciando-se, imediatamente a seguir, a sessão de registro do comportamento sexual que dura 15 minutos para o comportamento de monta executado pelo macho e os comportamentos de lordose e locomoção exibidos pela fêmea.

O registro consiste em filmar os animais com uma filmadora de vídeo. O filme foi visualizado, com o auxílio de um aparelho de vídeo, por um observador treinado que digitou num microcomputador, usando o programa de análise comportamental “The Observer” (Noldus Information Technology), uma tecla selecionada para cada comportamento à medida que este ocorreu.

4.7 Parâmetros comportamentais analisados:

- ◆ Freqüência do comportamento de lordose (toda vez que a fêmea eleva a parte traseira do dorso na presença da monta pelo macho)
- ◆ Freqüência de monta (toda vez que o macho usa as patas dianteiras para agarrar a fêmea pelos flancos, independente de lordose da fêmea)
- ◆ Quociente de lordose: número de lordose divididos pelo número de montas
- ◆ Freqüência de locomoção da fêmea (toda vez que esta caminha na caixa)
- ◆ Duração de locomoção da fêmea (tempo de deslocamento desta)

4.8 Contagem de óvulos:

Na manhã seguinte ao registro comportamental, entre 09:00 e 09:30 h, as ratas foram mortas e seus ovidutos retirados para posterior contagem de óvulos com o auxílio de um microscópio óptico, como mostra a figura 2.

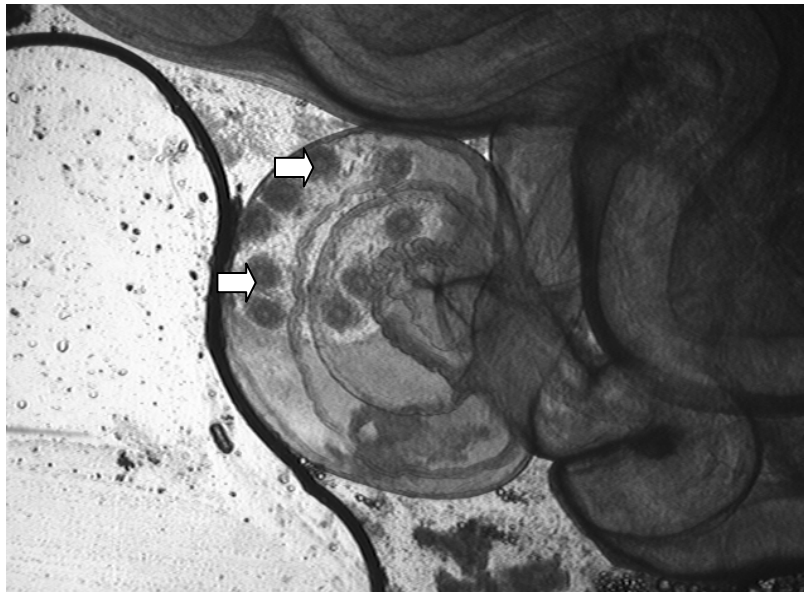


Figura 2: Óvulos no oviduto indicados pelas setas. Imagem capturada por IMAGE PRO-PLUS 4.1

4.9 Verificação do local de microinjeção:

No mesmo momento em que os ovários foram retirados, o cérebro também foi retirado e fixado em solução formalina 4%. Os cortes histológicos, com

espessura de 100 μm , foram feitos com o auxílio de um vibrátomo e analisados ao microscópio óptico para verificação da posição da cânula e local de microinjeção como mostra a figura 3. Somente os animais que tiveram a localização correta da injeção (amígdala medial) bilateralmente foram incluídos na análise. O índice de acerto foi de 85%.

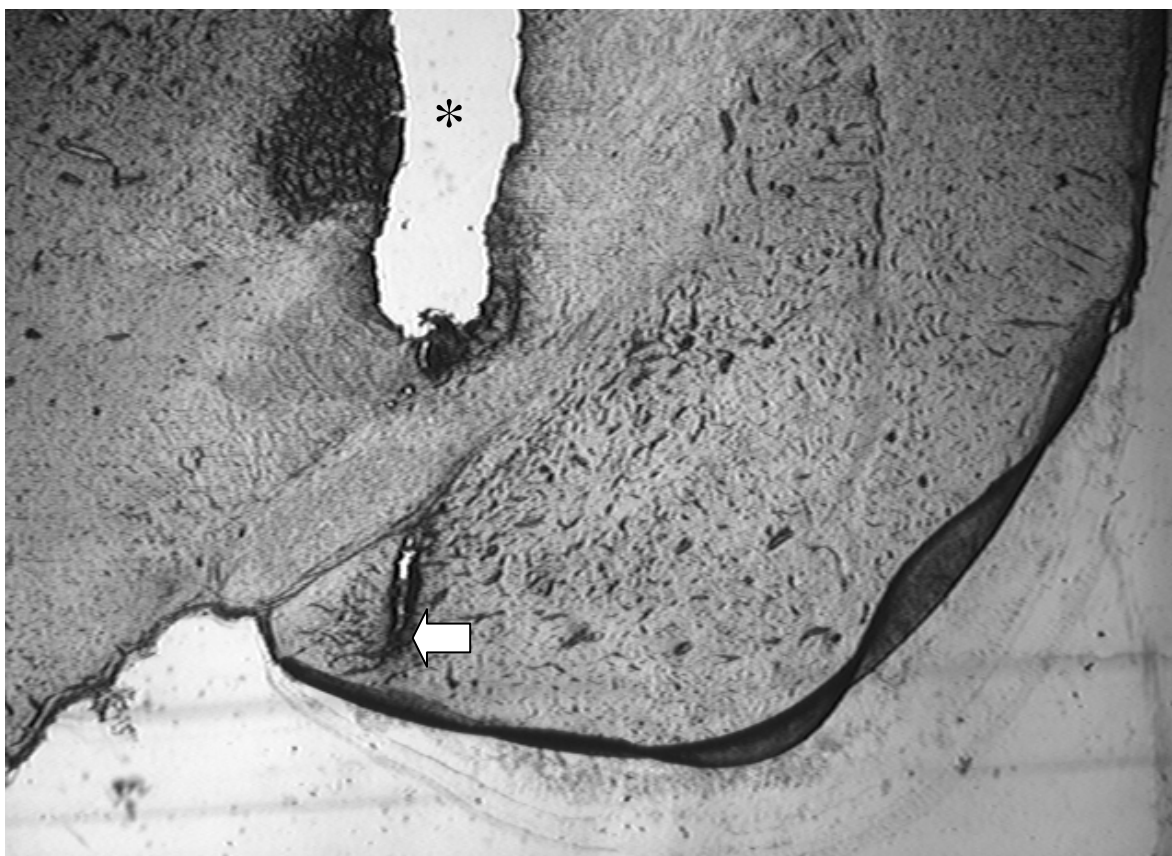


Figura 3: Corte histológico representando a técnica de canulação da amígdala medial (MeA). O asterisco representa a lesão da cânula e a seta a lesão da agulha injetora. Imagem capturada por IMAGE PRO-PLUS 4.1

4.10 Desenho experimental:

◆ **Cirurgia:**

Ratas com no mínimo 3 ciclos estrais regulares tiveram cânulas guias implantadas bilateralmente na amígdala medial por estereotaxia. Somente fêmeas que tiveram pelo menos um ciclo estral regular após a cirurgia foram incluídas no experimento.

◆ **Grupos experimentais:**

No início do período escuro (às 18 horas), na noite do proestro, os animais foram levados para a sala de filmagem onde permaneceram por pelo menos uma hora com o objetivo de se adaptarem ao novo ambiente. Passada este período foi feita a administração de Ang II ou salina na amígdala medial, dentro de seus respectivos grupos experimentais. Após 15 minutos foi, então, iniciado o registro comportamental. As fêmeas foram divididas em seis grupos experimentais:

Grupo 1: salina (n = 11, comportamento; n = 9, número de óvulos)

Grupo 2: Ang II 10 pg (n = 10, comportamento; n = 9, número de óvulos)

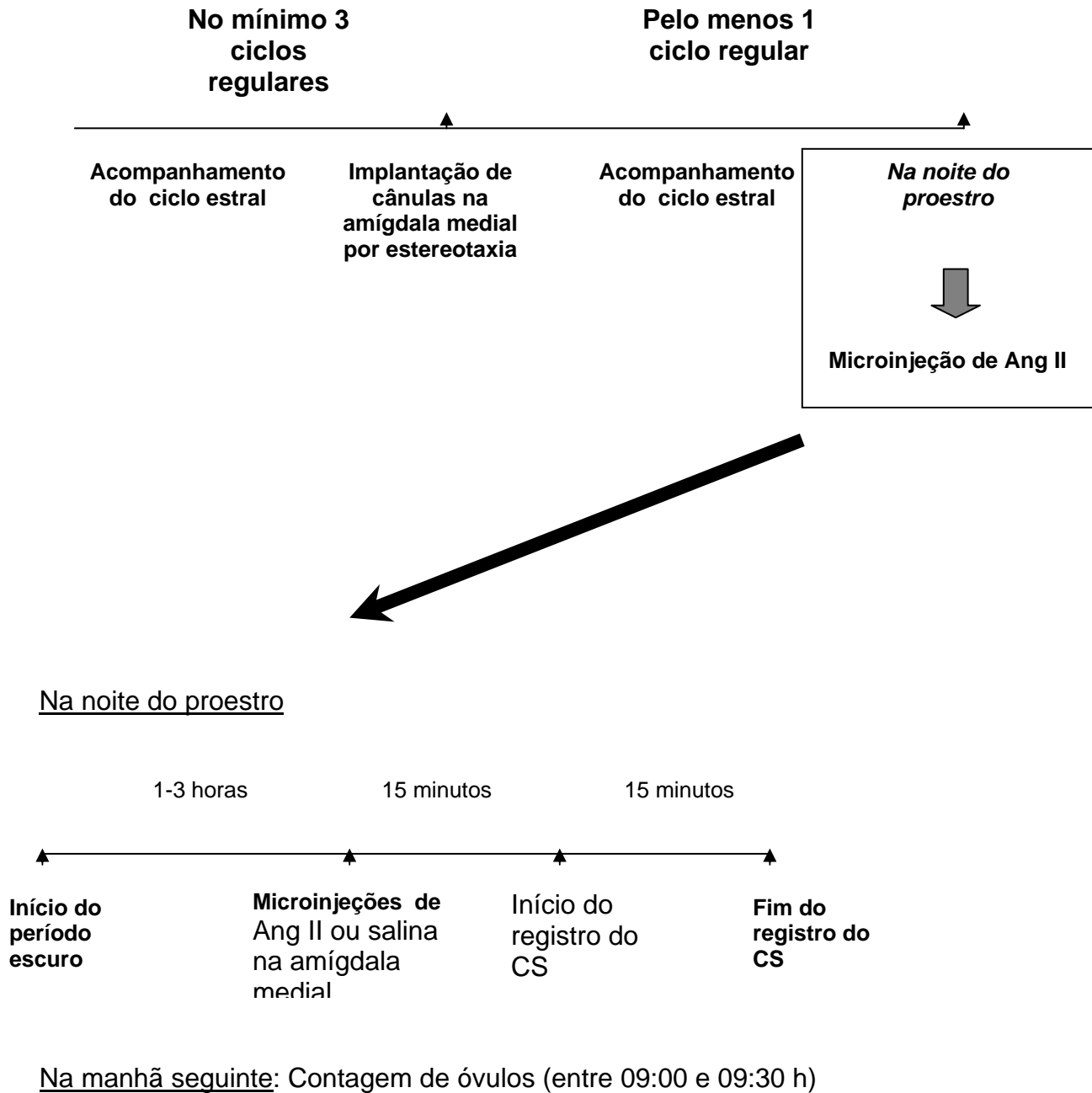
Grupo 3: Ang II 25 pg (n = 11, comportamento; n = 9, número de óvulos)

Grupo 4: Ang II 50 pg (n = 11, comportamento; n = 9, número de óvulos)

Grupo 5: Ang II 100 pg (n = 11, comportamento; n = 10, número de óvulos)

Grupo 6: Ang II 200 pg (n = 11, comportamento; n = 10, número de óvulos)

Representação esquemática do desenho experimental:



4.11 Expressão dos resultados:

Os resultados estão expressos numericamente em frequência e duração dos comportamentos.

Os valores relativos à frequência estão expressos como a média (\pm EPM) do número de vezes que cada comportamento ocorre em um intervalo de 15 minutos (900 s).

Os valores relativos a duração estão expressos em segundos como a média (\pm EPM) das durações individuais de cada ocorrência do comportamento em um intervalo de 15 minutos.

4.12 Análise estatística

Todos os dados foram analisados através do teste da ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$.

5. Resultados

O resultados encontrados nas avaliações comportamentais e contagem do número de óvulos de ratas submetidas a microinjeções de Ang II, comparados entre os grupos e com solução salina (grupo controle), são os seguintes:

Quociente de lordose (L/M): A figura 4 mostra uma redução significativa no quociente de lordose nos grupos que receberam 100 e 200 pg de Ang II quando comparados com o grupo controle. Já os grupos que foram submetidos às doses mais baixas de Ang II não apresentaram diferença significativa no quociente de lordose quando comparados com o controle - $F(5,64) = 15.52, P < 0.05$.

Freqüência de monta: A figura 5 mostra que houve diferença significativa na freqüência de monta, a qual as fêmeas foram submetidas, apenas no grupo das que receberam 200 pg de Ang II, quando comparadas com o controle e doses menores de Ang II - $F(5,64) = 6.18, P < 0.05$.

Freqüência e duração de locomoção: As figuras 6A e 6B demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos tanto na freqüência quanto na duração de locomoção - **A)** $F(5,64) = 1.08, P > 0.05$ **B)** $F(5,64) = 1.46, P > 0.05$.

Número de óvulos: A figura 7 demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de óvulos - $F(5,55) = 0.79, P > 0.05$.

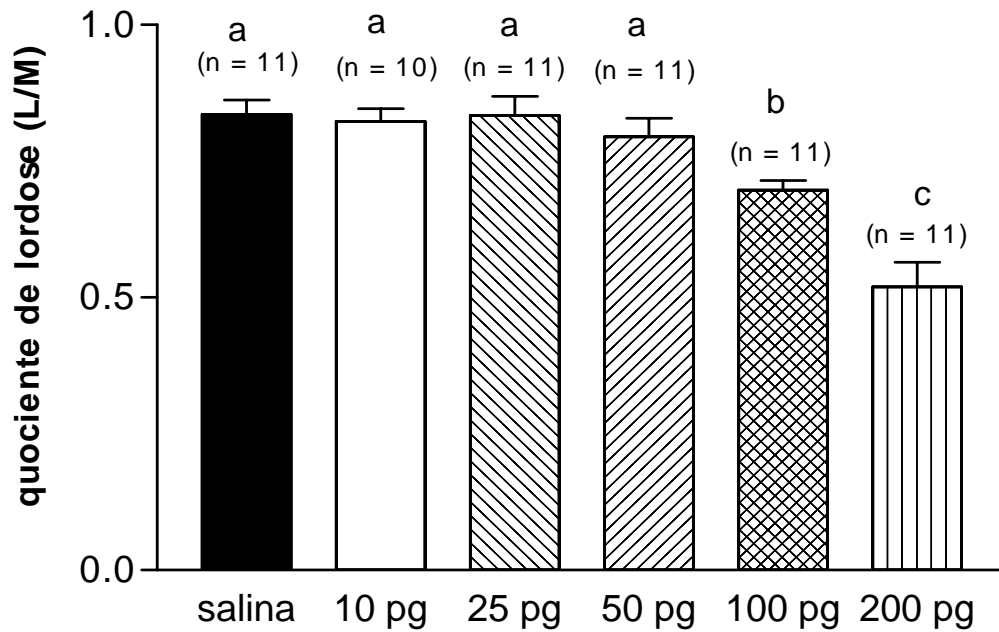


FIGURA 4: Efeito da microinjeção de doses crescentes de Ang II na amígdala medial sobre o comportamento sexual de ratas. Quociente de lordose (L/M) de ratas obtido em sessões de observação comportamental após microinjeções de Ang II, em diferentes doses, na amígdala medial. Os valores são expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls ($F(5,64) = 15.52, P < 0.05$); letras diferentes indicam $p < 0.05$.

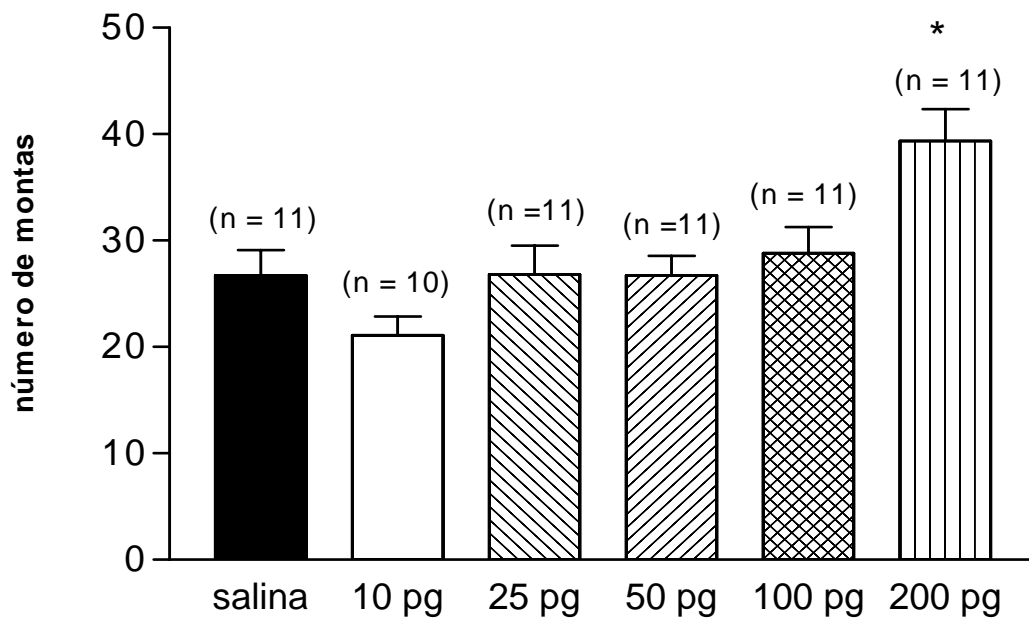


FIGURA 5: Freqüência de monta. Freqüência de monta dos machos obtido em sessões de observação comportamental junto as fêmeas que receberam microinjeções de Ang II, em diferentes doses, na amígdala medial . Os valores são expressos como média (\pm EPM). Os dado foram analisados através do teste da ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls ($F(5,64) = 6.18, P < 0.05$). * $p < 0,05$.

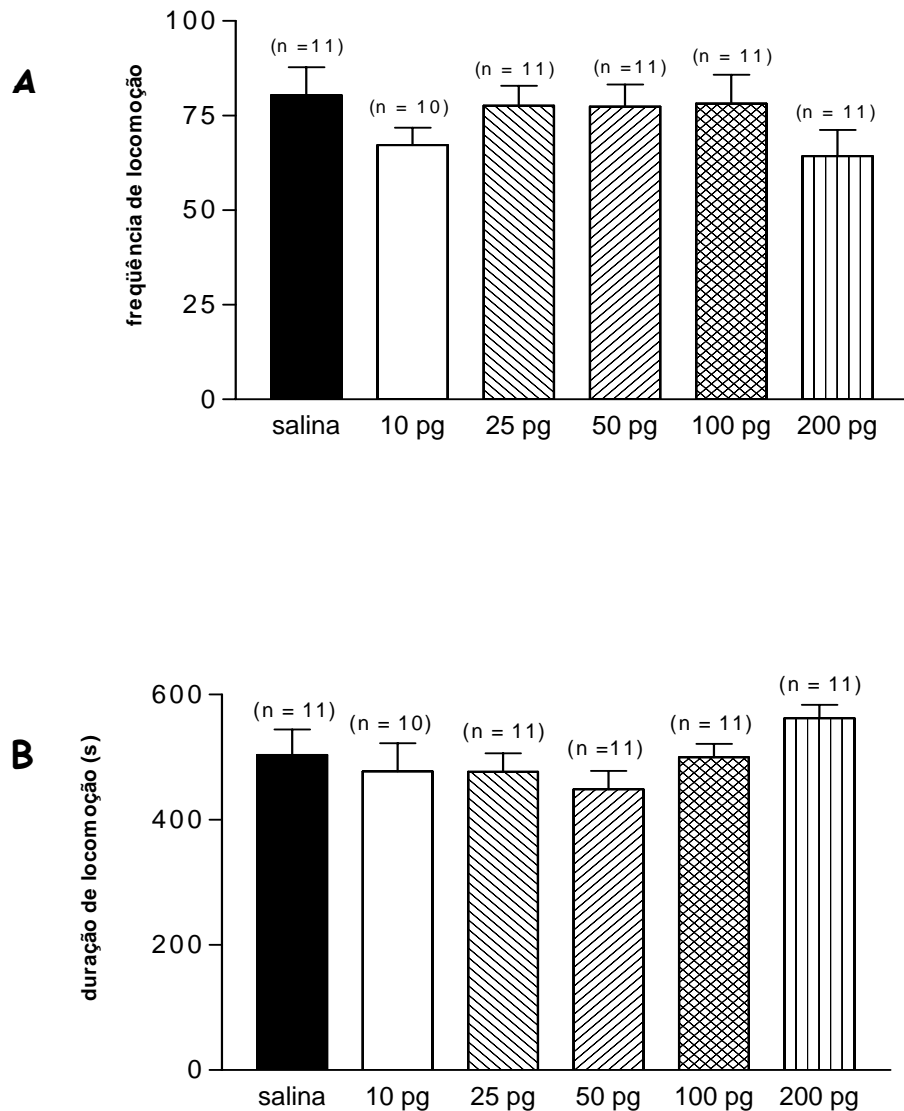


FIGURA 6: Frequência e duração de locomoção. **A)** Frequência de locomoção **B)** Duração de locomoção. Dados obtidos em sessões de observação comportamental após microinjeções de Ang II, em diferentes doses, na amígdala medial em ratas. Os valores são expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls. **A)** $F(5,64) = 1.08, P > 0.05$ **B)** $F(5,64) = 1.46, P > 0.05$.

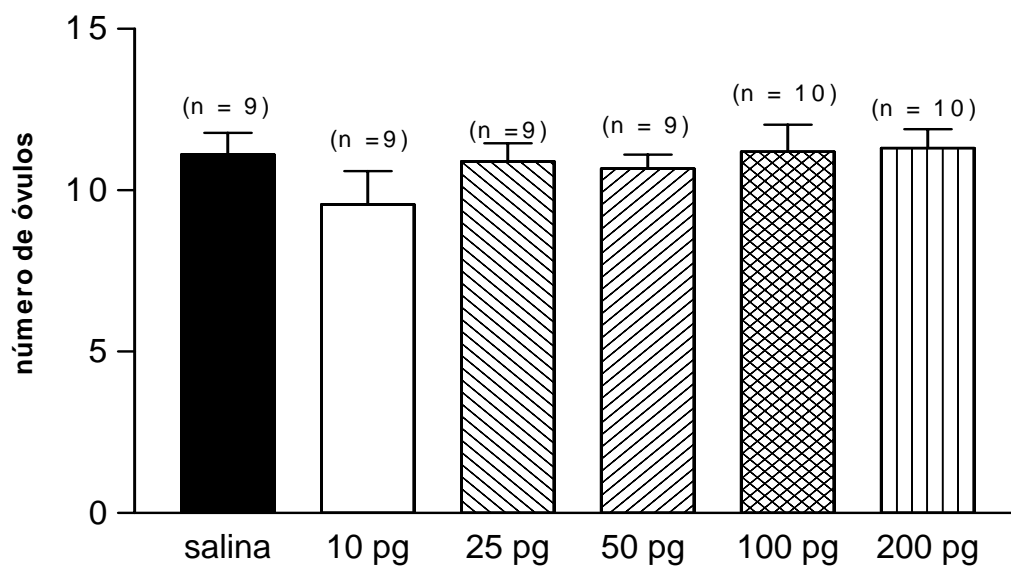


FIGURA 7: Número de óvulos. Número de óvulos observado em ratas que receberam microinjeções de Ang II, em diferentes doses, na amígdala medial e tiveram seu comportamento sexual registrado. Este dado foi obtido na manhã seguinte à noite de observação comportamental. Os valores são expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls ($F(5,55) = 0.79$, $P > 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado para testar a hipótese de que Ang II participa da modulação do comportamento sexual em fêmeas via MeA. Os resultados mostraram que a Ang II nas doses de 100 e 200 pg promoveu uma redução no comportamento sexual em ratas quando este peptídeo foi injetado diretamente na MeA.

Dentre as doses usadas, os grupos que receberam as maiores doses (100 e 200 pg) de Ang II foram os únicos que apresentaram redução no quociente de lordose - QL (número de lordoses/número de montas), enquanto que os grupos que receberam as doses mais baixas não apresentaram alterações significativas no QL quando comparadas com o grupo controle (fig. 4). Este resultado está de acordo com dados da literatura que indicam uma redução do comportamento sexual em ratos machos quando este peptídeo é injetado diretamente na MeA (BREIGEIRON *et al* , 2002) ou por via icv (CLARK , 1989). Por outro lado, parece que são necessárias doses maiores de Ang II (100 e 200 pg) injetadas na MeA, para reduzir o comportamento de lordose em fêmeas quando comparado com os efeitos em machos, onde a dose de 25 pg de Ang II já é suficiente para reduzir significativamente a freqüência do comportamento de intromissão peniana (BREIGEIRON, 1999) . Esta menor sensibilidade à Ang II comparada com o efeito em machos pode estar relacionada com as variações de estrógeno apresentadas pelas fêmeas durante o ciclo estral. O estradiol modifica a

concentração de receptores de Ang II em várias regiões do SNC (JONKLAAS & BUGGY, 1985; SELTER, *et al*, 1993; JÖHREN, *et al*, 1997). É possível que as altas concentrações de estrógeno apresentadas na fase do proestro (FREEMAN, 1994) poderiam produzir uma redução na ligação de Ang II na células da MeA, como ocorre na hipófise e órgão subfornicial de ratas ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (KISLEY *et al*, 1999)

O efeito da Ang II parece ser específico sobre o quociente de lordose, já que não houve uma inibição comportamental generalizada, como demonstrado pelos parâmetros de locomoção analisados. Os resultados desta investigação indicam que a infusão de Ang II na MeA não influenciam a atividade locomotora do animal, pois tanto a frequência como a duração da locomoção não apresentam alterações significativas nos diferentes grupos (fig. 6A e 6B). Isto é consistente com dados da literatura que demonstram que a administração icv de Ang II não foi associada a alterações na atividade motora geral de ratos submetidos a testes comportamentais (KEATON & CLARK, 1998). Também foi demonstrado que o número de montas, realizadas pelos machos, foi significativamente maior no grupo em que houve a inibição mais pronunciada do comportamento de lordose (fig. 5). Este resultado está de acordo com dados obtidos por GOMES, 2001, que demonstrou que fêmeas com comportamento sexual pronunciadamente inibido eram submetidas a uma frequência significativamente maior de montas quando comparadas com o grupo controle. É possível sugerir que o fato da fêmea possuir uma acentuada redução na frequência de lordose, induza o macho a montar um

número maior de vezes, na tentativa de atingir seu objetivo (fecundar a fêmea). Além disso, foi demonstrado que não houve diferença no número de óvulos observado entre os grupos (fig. 7), sugerindo que a Ang II administrada na MeA na noite do proestro não apresenta efeito sobre o mecanismo que desencadeia a ovulação. Este dado está de acordo com achados da literatura que indicam que todos os eventos que desencadeiam o pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação, ocorrem na tarde do proestro (STEELE *et al* ,1983; FREEMAN , 1994; LEVINE, 1997), portanto antes da administração da Ang II a qual foi realizada na noite do proestro. Na verdade, este parâmetro foi analisado como controle mais preciso da fase de receptividade da fêmea, uma vez que o reflexo de lordose é influenciado pelos mesmos fatores neuroendócrinos que regulam o momento e amplitude do pico de LH , e portanto a ovulação (FREEMAN , 1994; GANS & McCLINTOCK, 1993). Com isso, pode-se afastar a possibilidade da inibição do comportamento sexual da fêmea estar relacionado com o término da fase de receptividade da mesma.

Os processos reprodutivos, incluindo o comportamento sexual, ocorrem de forma adequada desde que as condições ambientais, tanto externas quanto internas ao organismo, sejam ideais. O estresse inibe a função reprodutiva, e esse efeito tem sido observado pela diminuição da secreção de gonadotrofinas (RIVER & VALE, 1984; KAMEL & KUBAJAK, 1987) bem como pela redução do comportamento sexual (PLAS-SOARES & ARON, 1981; ARMSTRONG, 1986). Evidências demonstram que a administração de CRH resulta em uma imediata diminuição na liberação de LHRH e LH (FERIN, 1999). Propõe-se que o CRH seja

um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse através de uma ação no hipotálamo, inibindo a secreção de LHRH (CARATY *et al.*, 1997). Por outro lado, áreas envolvidas no comportamento sexual, como a MeA, também respondem ao estresse, evidenciado pelo aumento da expressão de *c-fos* neste núcleo quando o animal é exposto a diversos estímulos aversivos (PEZZONE *et al.*, 1992; IMAKI *et al.*, 1993; DAYAS *et al.*, 1999; KUBO *et al.*, 2004) ou por microinjeções de CRH dentro da MeA (COSTA *et al.*, 1997). Sabe-se também que a Ang II é um dos principais hormônios envolvidos na resposta adaptativa do estresse através da regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, da pressão arterial, da modulação simpática e dos comportamentos que paralelamente se manifestam nesta resposta (SAAVEDRA, 1992).

Diante disso, pode-se propor que a inibição do comportamento sexual induzida pelo aumento de Ang II na MeA seja parte de uma resposta adaptativa do estresse, onde este neuropeptídeo estaria sendo produzido (LIND *et al.*, 1985; CANTERAS *et al.*, 1995, OLMOS *et al.*, 2004) e liberado no próprio núcleo. Além disso, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), uma importante região envolvida na resposta ao estresse, (PACAK & PALKOVITS, 2001) apresenta um grande número de corpos celulares contendo Ang II (LIND *et al.* 1985) e envia projeções para a MeA. Desta forma pode-se especular que durante o estresse o PVN libere Ang II na MeA.

Entretanto o efeito inibitório da Ang II, liberada na MeA, sobre o comportamento sexual poderia ser explicado pela ação deste neuropeptídeo em

neurônios gabaérgicos presentes na MeA (SWANSON & PETROVICH, 1998), os quais enviariam projeções para APOM, uma importante região envolvida no comportamento sexual de ratas (KATO & SAKUMA, 2000; TAKEO *et al.*, 1993). Tudo isso baseado na sugestão de SWANSON & PETROVICH (1998), que afirma que as eferências da MeA são predominantemente gabaérgicas, e também pelos dados de CANTERAS *et al* (1995), que indicam extensas projeções da MeA para área pré-óptica medial. É possível que o efeito inibitório da MeA sobre a resposta sexual seja dado por estes neurônios gabaérgicos que fazem sinapse com neurônios da APOM, impedindo-os de responderem aos hormônios gonadais (HULL *et al*, 1997).

Este estudo demonstrou um efeito da Ang II na MeA, produzindo inibição do comportamento sexual em ratas, reforçando a importância deste núcleo na modulação deste comportamento, além de indicar o papel da Ang II como neuromodulador desta função em fêmeas.

7. CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados deste estudo encaminham para as seguintes conclusões:

- 1) A Ang II participa da modulação do comportamento sexual em ratas via MeA.
- 2) O aumento de Ang II na MeA, na noite do proestro, não altera o mecanismo responsável pela ovulação.
- 3) A Ang II não influencia a atividade motora do animal via MeA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

ARMSTRONG, D.T. Environmental stress and ovarian function. *Biol Reproduction*, 34:29-39, 1986.

von BOHLEN and HALBACH, O., ALBRECHT, D. Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regul Peptides*, 78:51-56, 1998a.

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

BREIGEIRON, M.K. A administração de Angiotensina II na amígdala medial atenua o comportamento sexual de ratos machos. Dissertação de Mestrado - PPG Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, 1999.

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. *Hormone & Behavior*, 41:267-274, 2002.

BUMPUS, F.M., CATT, K.J., CHIU, A.T., GASPARO, M., GOODFRIEND, T., HUSAIN, A. Nomenclature for angiotensin receptores. *Hypertension*, 17:720-721, 1991.

CANTERAS, N.S., SIMERLY, R.B., SWANSON, L.W., Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, 360:213-245, 1995.

CANTERAS, N.S. Sistema límbico. In: *Fisiologia*. Ed. AIRES, M.M. *et al.* Guanabara Koogan , RJ. 2d ed., 30: 218-239, 1999.

CARATY, A., MILLER, D.W., DALALEU, B., MARTIN, G.B. Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing-hormone. *J Reprod Fertil*, 111:249-257, 1997.

CLARK, J.T., A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rat. *Physiology & Behaviour*, 45:220-224, 1989.

COSTA, A.P.C., KAMPA, R.J., WINDLE, R.J., INGRAM, C.D., LIGHTMAN, S.L. Region-specific immediate-early gene expression following the administration of corticotropin-releasing hormone in virgin and lactating rats. *Brain Res*, 770:151-162, 1997.

DAYAS, C.V., BULLER, K.M., DAY, T.A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not central amygdala. *European J Neuroscience*, 11:2312-2322, 1999.

DORNELLES, R.C.M., FRANCI, C.R. Action of AT₁ subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides*, 32:51-55, 1998.

DESCHEPPER, C.F., BOUHNIK, J., GANONG, W.F. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res*, 374:195-198, 1986.

DUDLEY, C.A., RAJENDREN, G., MOSS, R.L. Signal processing in the vomeronasal system: modulation of sexual behaviour in female rat. *Crit Rev Neurobio*, 10:265-290, 1996.

DUSING, R. Sexual dysfunction in patients with hypertension: implications for therapy. *J Clin Hypertens*, 4:424-432, 2003.

ESCLAPEZ, M., TILLAKARATNE, N.J.K., TOBIN, A.J., HOUSER, C.R. Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *J Comp Neurol*, 331:339-362, 1993

FERRARIO, C.M. & LEVY, P. Effect of the angiotensin II antagonist valsartan on sexual function in hypertensive men. *Blood Press Suppl*, 2:29-34, 2002.

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

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 & Behaviour*, 40:178-182, 2001.

FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., McCANN, S.M. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. *Braz J Med Biol Res*, 23:899-901, 1990.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: *Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Press, NY., 2d ed., 46:613-658, 1994.

GANONG, W.F. Blood pituitary, brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinology*, 14:233-249, 1993.

GANS, S.E. & McCLINTOCK, M.K. Individual differences among female rats in the timing of the preovulatory LH surge are predicted by lordosis reflex intensity. *Hormone & Behaviours*, 27:403-417, 1993.

GHAZI, N., GROV, K. L., WRIGHT J.W., PHILLIPS, M.I., SPETH, R.C. Variation in angiotensin II release from the rat brain during the estrous cycle. *Endocrinology*, 153:1945 - 1950, 1994.

GITLER, M. & BARRACLOUGH, C. Locus coeruleus stimulation augments LH release induced by medial preoptic stimulation. Evidence that the major locus coeruleus stimulatory component enters contralaterally into the hypothalamus. *Brain Res*, 109:720-728, 1987.

GOMES, C. M., Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de Mestrado - PPG Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, 2001

GORSKI, R.A. Sexual differentiation of nervous system. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H, JESSEL, T.M. *Principles of neural science*. New York, MacGraw-Hill, p. 1131-1146, 2000.

HOLSTEGE, G., KERSTENS, L., MORES, M.C., VANDERHORST, V.G.J.M. Evidence for a periaqueductal gray, nucleus retroambiguis, spinal cord pathway in the rat. *Neuroscience*, 80:587-598, 1997.

HULL, E.M., DU, J., LORRAIN, D.S., MATUSZEWICH, L., Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res Bull*, 44:327-333, 1997.

IMAKI, T., SHIBASKI, T., HOTTA, M., DEMURA, H. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induce c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Res*, 616:114-125, 1993.

IMBODEN, H., HARDING, J.W., HILGENFELDT, U., CELIO, M.R., FELIX, D. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res*, 410:74-77, 1987.

JONKLAAS, J. & BUGGY, J., Angiotensin-estrogen central interaction: localization and mechanism. *Brain Res*, 326:239-249, 1985.

JÖHREN, C., SANVITTO, G.L., EGIDY, G., SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT_{1A} receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. *J Neuroscience*, 17:8283-8292, 1997.

KAMEL, F. & KUBAJAK, C.L., Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*, 121:561-568, 1987.

KATO, J. & VILLE, A.C., Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. *Endocrinology*, 80:567-575, 1967.

KATO, A. & SAKUMA, Y. Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behaviour. *Brain Res*, 862:90-102, 2000.

KARTHA, K.N. & RAMAKRISHNA, TA., The role of sexually dimorphic medial preoptic area of hypothalamus in the sexual behaviour of male and female rats. *Physiology Res*, 45:459-466, 1996.

KEATON, A.K. & CLARK, J.T., Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT1 receptor blockade. *Physiology & Behaviour*, 64:339-346, 1998.

KISLEY, L.R., SAKAI, R.R., FLUHARTY, S.J., Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT1 receptor binding and mRNA in the female rat. *Brain Res*, 844:34-42, 1999.

KRETTEK, J.E. & PRICE, J.L., Amygdaloid projections to subcortical structures within the forebrain and brainstem in rat and cat. *J Comp Neurol*, 178:225-254, 1978.

KUBO, T., OKATANI, H., NISHIGORI, Y., HAGIWARA, Y., FUKUMORI, R., GOSHIMA, Y. Involvement of medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor response in rats. *Neuroscience Letters*, 354:84-86, 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.

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

LI, Z. & FERGUNSON, A.V., Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiology*, 256:R302-309, 1993.

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

MADEIRA, M.D., FERREIRA-SILVA, L., PAULA-BARBOSA, M.M. Influence of Sex and estrus cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and golgi study. *J Comp Neurol*, 432:329-345, 2001.

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

MARTIN, J. Sistema Límbico. Em: Martin, J., *Neuroanatomia: texto e atlas*, pgs: 447-78, Ed. Artes Médica, 2^a Ed Porto Alegre, 1998.

MASCO, D.H. & CARRER, H.F. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaliod nuclei. *Physiology & Behaviour*, 24:1073-80, 1990.

MOFFETT, R.B., BUMPUS, F.M., HUSAIN, A. Cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Science*, 41:1867-1879, 1987.

MORRIS, B.J. & REID, I.A. The distribution of angiotensinogen in dog brain studied by cell fractionation. *Endocrinology*, 103:492-500, 1978.

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.

NARUSE, M., NARUSE, K., MCKENZIE, J.S., SCHELLING, P., INAGAMI, T. Regional distribution of renin and angiotensinogen in the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats. . Brain Res, 333:147-150, 1985.

OLMOS, J., BELTRAMINO, C.A., ALHEID, G. Amygdala and Extended Amygdala of the rat: a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: The rat nervous system. Ed. PAXINOS, G., Elsevier Academic Press, London., 3d ed., 19:509-603, 2004.

PACAK, K., & PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocrinology Rev, 22:502-548, 2001.

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

PAUL, M., PRINTZ, M.P., HARMS, E., UNGER, T., LANG, R.E., GANTEN, D. Localization of renin and converting enzyme in nerve ending of rat brain. Brain Res, 334:315-324, 1985.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat nervous system. Australian, Academic Press, 1986

PEZZONE, M.A., LEE, W., HOFFMAN, G.E., RABIN, B.S., Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. Brain Res, 597:41-50, 1992.

PFAUS, J.G., KLEOPOULOS, S.P., MOBBS, C.V., GIBBS, R.B., PFAFF, D.W. Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. Brain Res, 624:253-267, 1993.

PFAFF, D.W. & KEINER, M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of female rat. *J Comp Neurol*, 151:121-158, 1973

PFAFF, D.W., SCHWARTZ-GIBLIN, S., McCARTHY, M.M., KOW, L.M. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Presss, NY., 2d ed., 2:107-220, 1994.

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

PICKEL, V.M., CHAN, J., GANTEN, D., Dual peroxidase and colloidal gold-labelling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ. *J Neuroscience*, 6:2457-2469, 1986.

PLAS-SOARES, S. & ARON, C. Stress related effects in the control of sexual receptivity and in the secretion of progesterone by the adrenals in the cyclic female rats *Physiology & Behaviour*, 27:261-264, 1981.

RAJENDREN, G., DUDLEY, C. A., MOSS, R.L. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual behavior receptivity in female rats. *Neuroendocrinology*, 52:368-372, 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

lutinizing hormone-releasing hormone neural system. *Brain Res*, 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 Res Bull*, 34:53-59, 1994.

RASIA-FILHO, A.A., LONDERO, R.G., ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res Bull*, 48:173-183, 1999.

RICHOUX, J.P., BOUHNİK, J. CLAUSER, E., CORVOL, P. The renin-angiotensin system in the rat brain. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in glia cells and neurons. *Histochemistry*, 89:323-331, 1988.

RICHARDS, E.M., RAIZADA, M.K., GELBAND, C.H., SUMMERS, C. Angiotensin II type 1 receptor-modulated signaling pathways in neurons. *Mol Neurobiol* 19: 25-41, 1999.

RIVER, C. & VALE, W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology*, 114:914-921, 1984.

ROWE, D.W. & ERSKINE, M.S. c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in preoptica area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Res*, 621:25-34, 1993.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinology Rev*, 13:329-380, 1992.

SACHS, B. & MEISEL, R. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. The Physiology of Reproduction. New York, Raven Press, pp. 1393-1485, 1988.

SAH, P., FABER, E.S.L., LOPEZ, M., POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiology Rev*, 83:803-834, 2003.

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

SHIMA, N., YAMAGUCHI, Y., YURI, K. Distribution of estrogen receptor β mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anat Sci Int*, 78:85-97, 2003.

SHUGHRUE, P.J., BUSHNELL, C.D., DORSA, D.M. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrus cycle: A comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*, 131:381-388, 1992.

SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V., MERCHENTHALER, I.J. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 388:507-525, 1997.

SIMERLY, R.B., CHANG, C., MURAMATSU, M., SWANSON, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: *In situ* hybridization study. *J Comp Neurol*, 294:76-95, 1990.

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 Physiological Society*, 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.

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

STORNETTA, R.L., HAWELU-JOHNSON, C.L., GUYENET, P.G., LYNCH, K.R. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242:1444-1446, 1988.

SUN, N. & CASSELL, M.D. Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol*, 330:381-404, 1993.

SWANSON, L.W. & PETROVICH, G.D. What is the amygdala? *Trends Neuroscience*, 21:323-331, 1998.

TAKEO, T., CHIBA, Y. ; SAKUMA, Y. Suppression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. *Physiology & Behaviour*, 53:831-838, 1993.

TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiology*, 261:209-216, 1991.

VEENING, J.G. & COOLEN, L.M. Neural activation following sexual behaviour in the male and female rat brain. *Behavioural Brain Res*, 92:181-193, 1998.

WHITE, S. & UPHOUSE, L. Estrogen and progesterone dose-dependently reduce disruptive effects of restraint on lordosis behaviour. *Hormone & Behaviour*, 45:201-208, 2004.

WOOD, R. Thinking about networks in control de male hamster sexual behaviour. *Hormones & Behaviour*, 32:40-45, 1997.

WRIGHT, J. W. & HARDING, J. W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioural responses. *Brain Res Reviews*, 17:227-262, 1992.

ZHU, M., GELBAND, C.H., POSNER, P., SUMMER, C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neuroscience*, 18:679-686, 1998.

ZHU, M., NATARAJAN, R., NADLER, J.L., MOORE, J.M., GELBAND, C.H., SUMMER, C. Angiotensin II increases neuronal delayed-rectifier potassium current: role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiology*, 84:2494-2501, 2000.