

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

**MANIPULAÇÃO NEONATAL E ESTADO HORMONAL: EFEITOS**  
**COMPORTAMENTAIS E RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS AO**  
**ESTRESSE EM RATOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS**

**Aluna: Gabriela Sentena Severino**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

**Porto Alegre, dezembro de 2006.**

*"Quem nada conhece, nada ama. Quem nada pode fazer, nada compreende. Mas quem compreende também ama, observa, vê... Quanto mais conhecimento houver inerente numa coisa, tanto maior o amor... Aquele que imagina que todos os frutos amadurecem ao mesmo tempo, como as cerejas, nada sabe a respeito das uvas".*

Paracelso

*"Não aceitarei nenhuma dessas...afirmações até que as tenha verificado por mim mesmo, na medida em que me for possível submetê-las à prova. E se alguém, depois de mim, se tornar, como eu, amante do trabalho e zeloso da verdade, não conclua apressadamente a partir de dois ou três casos. Pois muitas vezes ele será esclarecido, como eu, pela prolongada experiência."*

Galeno

*"A glória de uma boa obra reside em abrir caminho a coisas melhores e assim rapidamente levar a seu próprio eclipse. O objetivo da pesquisa é o progresso... do conhecimento."*

Alexander Fleming

*Dedico esta Tese ao meu querido filho Felipe.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido filho por me ensinar o verdadeiro sentido do amor incondicional.

Aos meus pais pela vida, pelo amor, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao André por tudo, mas principalmente pelo amor e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion pela oportunidade da orientação desde a Iniciação Científica, por ter me “apresentado” à Ciência, pelo incentivo, dedicação e disponibilidade sempre presentes. Muito obrigada!

Ao Prof.Dr. Gilberto Luiz Sanvitto pela participação nas idéias desta Tese.

Às professoras que gentilmente aceitaram integrar a banca examinadora: Dra. Wânia Partata (relatora), Dra. Márcia Giovenardi e Dra. Carla Dalmaz contribuindo para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, à Bióloga Sônia Zanon Baptista e à Biomédica Ariana Martins Fernandes pelo radioimunoensaio.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci e ao Dr. Raphael Scorsim Szwanka pelo HPLC/ED.

À amiga e colega Anelise S. Todeschin pela amizade sincera, carinho, generosidade e companheirismo.

Aos queridos colegas e amigos do laboratório: Cármen M. Gomes, Tatiane S. Cagol, Ana Lúcia Ceconello, Márcia S. de Azevedo, Márcia K. Bregeiron, Camila Padilha, Ana Raquel Karkow, Caroline Perinazzo, Fabiana Leopoldo de Souza, Marcelo Souza, Fernando Benetti, Isabel A.M. Fossati,

Charlis Rainecki, Elisa Cristiana Winkelmann e Márcio Donadio pelo coleguismo e amizade.

À Mariana Benetti Torres, Tatiane S. Cagol e Luiz Felipe Teer de Vasconcellos pelo auxílio nos experimentos.

À bioterista Ângela pelo carinho e dedicação que demonstrou na manutenção dos ratos.

Às secretárias do curso de Pós-graduação em Fisiologia, Alice, Fabiana e Uiraçara pela disponibilidade e gentileza.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

### ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRAT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1. Manipulação neonatal: conseqüências neuroendócrinas e comportamentais.....	23
1.2. Papel dos hormônios esteróides gonadais sobre a diferenciação do sistema nervoso central.....	27
1.3. Período hiporresponsivo ao estresse.....	29
1.4. Estresse.....	31
1.5. Prolactina.....	33
1.5.1. Ações fisiológicas.....	33
1.5.2. Regulação da secreção de prolactina.....	35
1.5.3. Prolactina e estresse.....	36
1.6. Papel dos hormônios esteróides gonadais e do sistema noradrenérgico central sobre a síntese e liberação de PRL.....	38
1.7. Influência dos hormônios esteróides gonadais sobre comportamentos.....	41
1.8. Hormônio Luteinizante (LH).....	44
1.8.1. Ações fisiológicas e regulação da secreção de LH.....	44
1.8.2. LH e estresse.....	45
1.9. Ciclo estral.....	47

1.10. Perfil da secreção de PRL e esteróides gonadais durante o ciclo estral.....	47
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
2.1. Objetivo geral.....	51
2.2. Objetivo específico.....	51
<b>3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>53</b>
3.1. Experimento 1.....	54
3.2. Experimento 2.....	55
3.3. Experimento 3.....	56
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
4.1. Animais.....	60
4.2. Manipulação neonatal.....	60
4.3. Esfregaço vaginal.....	62
4.4. Anestesia.....	64
4.5. Gonadectomia e gonadectomia fictícia.....	64
4.6. Tratamento hormonal.....	64
4.7. Comportamento no campo aberto.....	65
4.8. Estresse.....	67
4.9. Canulação da veia jugular.....	67
4.10. Coletas de sangue.....	67
4.11. Radioimunoensaio.....	68
4.12. Microdissecção .....	68
4.13. Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED).....	69
4.14. Análise estatística.....	70

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
5.1. Experimento 1.....	73
5.1.1.Efeito da manipulação neonatal sobre comportamento no campo aberto em ratos machos.....	72
5.1.2. Efeito da manipulação neonatal sobre comportamento no campo aberto em ratas fêmeas durante o ciclo estral.....	74
5.1.3. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da prolactina ao estresse por contenção em ratos machos.....	75
5.1.4. Efeito da manipulação neonatal e do ciclo estral sobre a resposta da prolactina ao estresse por contenção em ratas fêmeas.....	75
5.1.5. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta do LH ao estresse por contenção em ratos machos.....	77
5.1.6. Resposta do LH ao estresse por contenção em ratas fêmeas durante o ciclo estral.....	77
5.2. Experimento 2 .....	89
5.2.1. Efeito da manipulação neonatal e do estado hormonal sobre o comportamento no campo aberto em ratos machos.....	89
5.2.2. Efeito da manipulação neonatal e do estado hormonal sobre o comportamento no campo aberto em ratas fêmeas.....	90



5.2.3. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta da PRL ao estresse por éter em ratos machos.....	92
5.2.4. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta da PRL ao estresse por éter em ratas fêmeas.....	93
5.2.5. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta do LH ao estresse por éter em ratos machos.....	94
5.2.6. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta do LH ao estresse por éter em ratas fêmeas.....	95
5.3. Experimento 3 .....	109
5.3.1. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos.....	109
5.3.2. Efeito da manipulação neonatal sobre o conteúdo de NA, MHPG e MHPG/NA no PVN em resposta ao estresse em ratos machos.....	109
5.3.3. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse por contenção me ratas fêmeas.....	110
5.3.4. Efeito da manipulação neonatal sobre o conteúdo de NA, MHPG e MHPG/NA no PVN em resposta ao estresse em ratas fêmeas.....	111
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>117</b>
6.1. Comportamento no campo aberto.....	118

6.2. Resposta da prolactina ao estresse.....	125
6.3. Resposta do hormônio luteinizante ao estresse.....	129
6.4. Papel do sistema noradrenérgico sobre a resposta da prolactina ao estresse.....	134
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>140</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>142</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

#### Figura 1

Perfil hormonal nas fases do ciclo estral.....49

#### Figura 2

Manipulação neonatal.....61

#### Figura 3

Esfregaço vaginal.....62

#### Figura 4

Epitélio vaginal durante o ciclo estral.....63

#### Figura 5

Campo aberto.....66

### RESULTADOS

#### Figura 6

Efeito da manipulação neonatal sobre a frequência e duração de permanência nos quadrantes centrais do campo aberto em ratos machos adultos.....79

#### Figura 7

Efeito da manipulação neonatal sobre a frequência e a duração de locomoção no campo aberto em ratos machos adultos.....80

#### Figura 8

Duração e frequência de locomoção no campo aberto em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o ciclo estral (diestro, proestro e estro).....81

**Figura 9**

Freqüência e duração de permanência nos quadrantes centrais do campo aberto em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o ciclo estral (diestro, proestro e estro).....82

**Figura 10**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratos machos adultos.....83

**Figura 11**

Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas durante as fases do ciclo estral (diestro, proestro e estro).....84

**Figura 12**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas durante as fases do ciclo estral (diestro, proestro e estro).....85

**Figura 13**

Efeitos da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratos machos adultos.....86

**Figura 14**

Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas durante as fases do ciclo estral (diestro, proestro e estro).....87

**Figura 15**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas durante as fases do ciclo estral (diestro, proestro e estro).....88

**Figura 16**

Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração e a freqüência de locomoção no campo aberto em ratos machos.....97

**Figura 17**

Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração de permanência e a freqüência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto em ratos machos.....98

**Figura 18**

Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração e a freqüência de locomoção no campo aberto em ratas.....99

**Figura 19**

Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração de permanência e a freqüência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto em ratas.....100

**Figura 20**

Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos machos adultos não-manipulados e manipulados submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona (T).....101

**Figura 21**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona.....102

**Figura 22**

Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol (E2).....103

**Figura 23**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol.....104

**Figura 24**

Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados e manipulados submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona (T).....105

**Figura 25**

Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados e manipulados submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona.....106

**Figura 26**

Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas às

cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol (E2).....	107
---	-----

### **Figura 27**

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol .....	108
---	-----

### **Figura 28**

Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratos machos adultos.....	113
---	-----

### **Figura 29**

Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre o conteúdo de NA (pg/μg de proteína), MHPG e razão MHPG/NA em ratos machos adultos.....	114
--	-----

### **Figura 30**

Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratas adultas em diestro.....	115
---	-----

### **Figura 31**

Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre o conteúdo de NA (pg/μg de proteína), MHPG (pg/μg de proteína) e razão MHPG/NA (pg/μg de proteína) em ratas adultas.....	116
---	-----

**ABREVIATURAS**

**ACTH**- corticotrofina

**ANG II**- angiotensina II

**ANP**- peptídeo natriurético atrial

**AVP**- arginina vasopresina

**CRH**- hormônio liberador de corticotrofina

**DA**- dopamina

**DDC**- dietilditiocarbamato

**E<sub>2</sub>**- estradiol

**EM**- eminência mediana

**FSH**- hormônio folículo-estimulante

**GABA**- ácido gama-aminobutírico

**GnRH**- hormônio liberador de gonadotrofina

**HPA**- hipotálamo-hipófise-adrenal

**HPG**- hipotálamo-hipófise-gonadal

**ICV**- intra-cérebro-ventricular

**LC**- *Locus coeruleus*

**LH**- hormônio luteinizante

**LHRH**- hormônio liberador do hormônio luteinizante

**MHPG**-- 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol

**MPH**- hipotálamo médio basal

**MPT**- metil-p-tirosina

**NA**- noradrenalina

**NTS**- núcleo do trato solitário

**ORQ**- orquiectomizados



**ORQ FICT**- orquiectomia fictícia

**ORQ + T**- orquiectomizados tratados com testosterona

**OVX**- ovariectomizadas

**OVXE<sub>2</sub>**- ovariectomizadas tratadas com estradiol

**OVXE<sub>2</sub> + P**- ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona

**OVX FICT**- ovariectomia fictícia

**P**- progesterona

**POA**- área pré-óptica medial

**PRF**- fator de liberação de prolactina

**PRL**- prolactina

**PVN**- núcleo paraventricular do hipotálamo

**RNA<sub>m</sub>**- ácido ribonucléico mensageiro

**SNC**- sistema nervoso central

**SON**- núcleo supra-óptico

**T**- testosterona

**TDF**- fator determinante dos testículos

**TIDA**- túbero-hipofisial dopaminérgico

**TRH**- hormônio liberador de tireotrofina

**VIP**- peptídeo intestinal vasoativo

## RESUMO

A manipulação neonatal promove alterações neuroendócrinas e comportamentais em ratos. Os efeitos conhecidos deste procedimento não são observáveis após gonadectomia neonatal e antes da instalação da puberdade, sugerindo que os hormônios esteróides gonadais modulam os efeitos da manipulação neonatal. Este trabalho teve como objetivo investigar uma possível modulação dos efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos e a resposta ao estresse da PRL e do LH. O efeito da manipulação neonatal sobre a atividade noradrenérgica no PVN induzida por estresse também foi avaliada. A manipulação neonatal consistiu em manipular os filhotes do 1° ao 10° dia de vida. Os animais foram estudados na idade adulta. No experimento 1, o comportamento no campo aberto e as respostas da PRL e do LH ao estresse por contenção foram analisados em ratos e ratas nas fases do diestro, proestro e estro. No experimento 2, os animais não-manipulados e manipulados foram submetidos à gonadectomia fictícia, gonadectomia e gonadectomia seguida de reposição hormonal de testosterona nos machos e estradiol nas fêmeas. Três semanas após as cirurgias, o comportamento no campo aberto e as respostas da PRL e do LH ao estresse foram realizados. No experimento 3 ratos machos e fêmeas em diestro foram subdivididos em basal e estresse. As concentrações plasmáticas de PRL foram determinadas por radioimunoensaio e os conteúdos de NA e MHPG foram determinados através de detecção eletroquímica. Ratos machos manipulados permaneceram mais tempo nos quadrantes centrais e ratas apresentaram aumento da duração de locomoção no campo aberto ao longo do ciclo estral. A gonadectomia em ratos machos e fêmeas manipulados reduziu a duração de locomoção no campo aberto e em ratas reduziu a frequência de entrada nos quadrantes centrais. A manipulação neonatal reduziu a resposta da PRL e do LH ao estresse em ratos machos. Em ratas na fase do estro foi observada uma menor resposta da PRL ao estresse quando comparadas às ratas não-manipuladas na fase do estro. O mesmo ocorreu com a resposta do LH ao estresse em ratas manipuladas nas fases do proestro e do estro. A redução da

resposta da PRL ao estresse em ratas manipuladas foi observada apenas em ratas submetidas à ovariectomia fictícia. Ratas manipuladas não apresentaram aumento da razão MHPG/NA no PVN após aplicação do estresse. Os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos em ratos machos e fêmeas e sobre a resposta da PRL ao estresse em fêmeas parecem depender da presença de hormônios esteróides gonadais. A ciclicidade dos hormônios esteróides gonadais durante o ciclo estral influencia os efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL e do LH ao estresse em ratas. A manipulação neonatal reduz a responsividade do sistema noradrenérgico ao estresse em fêmeas.

**Palavras-chave:** manipulação neonatal, estresse, hormônios esteróides gonadais, prolactina e hormônio luteinizante.

## ABSTRACT

Neonatal handling promotes neuroendocrine and behavioral changes in rats. Known effects of this procedure are not perceived after neonatal gonadectomy and before puberty, suggesting that gonadal steroids hormones modulate the effects of neonatal handling. The objective of this work is to investigate a possible modulation of the neonatal handling effects in behaviors and the stress response of PRL and LH. The neonatal handling effect over noradrenergic activity in PVN induced by stress was also evaluated. Neonatal handling consisted in handling pups from the 1<sup>o</sup> to the 10<sup>o</sup> day of life. Animals were studied in adult age. In experiment 1, the behavior in open field and the PRL and LH responses to stress through restraint were analysed in male and female rats in diestrus, proestrus and estrus phases. In experiment 2, non-handled and handled animals were submitted to sham gonadectomy, gonadectomy and gonadectomy followed by testosterone hormonal replacement in males and estradiol hormonal replacement in females. Three weeks after surgery, open field behavior and PRL and LH responses to stress were conducted. In experiment 3 male and female rats in diestrus were grouped in basal and stress. PRL plasm levels were determined through radioimmunoassay and NA and MHPG contents were determined through electrochemical detection. Handled male rats remained more time in central squares and female rats showed an increase in locomotion duration in open field through estral cycle. Gonadectomy in male rats and handled females reduced locomotion duration in open field and in female rats reduced the frequency in central squares. Neonatal handling reduced PRL and LH response to stress in male rats. In the estrus phase of female rats was observed a lower PRL response to stress when compared to non-handled female rats in estrus phase. The same happened with LH response to stress in female handled rats in proestrus and estrus phases. The reduction in PRL response to stress in handled female rats was observed only in female rats submitted to sham ovariectomy. Handled female rats do not showed increase in MHPG/NA quocient in PVN after stress application. Neonatal handling effects over behaviors seems to depend of the gonadal steroids hormones presence. The cycling of gonadal steroids hormones during estral cycle influences the effects of neonatal handling over

PRL and LH response to stress in female rats. Neonatal handling reduces the responsivity of the noradrenergic system to stress.

**Key-words:** neonatal handling, stress, gonadal steroids, prolactin and luteinizing hormone.

---

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Manipulação neonatal: conseqüências neuroendócrinas e comportamentais

A manipulação neonatal é um modelo experimental que tem por objetivo avaliar como uma interferência ambiental nos primeiros dias de vida pode alterar os mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas ao estresse. Este procedimento consiste em manipular os filhotes durante as duas semanas de vida geralmente por alguns minutos. O tempo de separação dos filhotes da mãe não ultrapassa 15 minutos. A manipulação neonatal que é aparentemente inofensiva altera a diferenciação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) promovendo mudanças nos padrões comportamentais e de resposta ao estresse em animais adultos (LEVINE *et al.*, 1967; LEVINE, 1994; MEANEY *et al.*, 1993; NÚÑEZ *et al.*, 1996; MEANEY *et al.*, 1996; MEERLO *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000; LEVINE, 2001).

A manipulação neonatal diminui a responsividade do eixo HPA ao estresse em animais adultos (LEVINE *et al.*, 1994; MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000). Estes efeitos são mediados pelas alterações da expressão de receptores para glicocorticóides em regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) envolvidas na regulação do feedback negativo. Este procedimento durante o período neonatal aumenta a expressão dos receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal (PLOTSKY & MEANEY, 1993; MEANEY *et al.*, 1993; SAPOLSKY, 1994; MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000). Estas diferenças com relação aos receptores para glicocorticóides modificam a

sensibilidade do *feedback* negativo, tornando-o mais sensível nos animais manipulados (MEANEY *et al.*, 1996).

Animais manipulados no período neonatal apresentam também uma redução nas concentrações de RNAm para o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na amígdala central e um menor conteúdo de CRH no *Locus coeruleus* (LC) (FRANCIS, *et al.*, 1999). Além disso, existe uma atenuação da ativação do LC induzida pelo CRH, resultando em pequenos aumentos de noradrenalina (NA) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) após estresse por contenção (LIU *et al.*, 2000). Estes animais apresentam também um aumento de receptores GABAérgicos nas células noradrenérgicas do LC e do núcleo do trato solitário (NTS), bem como aumento de receptores benzodiazepínicos na amígdala central, LC e NTS (FRANCIS *et al.*, 1999).

Além das respostas neuroendócrinas ao estresse, sabe-se que a manipulação neonatal altera padrões comportamentais em ratos adultos. Os efeitos mais conhecidos da manipulação neonatal em ratos são o aumento da atividade exploratória no campo aberto, a diminuição do número de bolos fecais e o aumento do tempo de permanência e da frequência de entrada nos braços abertos do labirinto-em-cruz-elevado (LEVINE, 1967; NÚÑEZ *et al.*, 1996; MEERLO *et al.*, 1999). Essas alterações podem ser interpretadas como diminuição do medo e da ansiedade. Além disso, ratos machos e fêmeas manipulados no período neonatal apresentam redução da inibição comportamental no campo aberto na presença de um gato (FOSSATI, 2000; PADOIN, *et al.*, 2001). A manipulação neonatal também provoca aumento do comportamento agressivo maternal em ratas, diminuição do comportamento



sexual de ratos machos (PADOIN *et al.*, 1995) e fêmeas (FRANTZ *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1999).

Além das alterações observadas no eixo HPA, GOMES *et al.* (1999) demonstraram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) também pode sofrer alterações em animais que foram manipulados no período neonatal. Fêmeas manipuladas durante este período, além de apresentarem uma diminuição do comportamento sexual, têm ciclos estrais anovulatórios e um retardo da instalação da puberdade (GOMES, 2001). Mais recentemente, GOMES *et al.*, (2005), também demonstraram que hormônios relacionados à ovulação e ao comportamento sexual apresentam seus picos reduzidos. Estes resultados em conjunto sugerem que a manipulação neonatal reduz a capacidade reprodutiva em ratas.

Alterações morfológicas no SNC devido à manipulação neonatal têm sido estudadas em nosso laboratório. LUCION *et al.* (2003) observaram um menor número de neurônios em ratos machos e fêmeas no LC em animais manipulados no período neonatal aos 11, 26, 35 e 90 dias de idade. Da mesma forma, foram observadas reduções da densidade de neurônios da área pré-óptica medial (CAGOL *et al.*, 2005) e do número de neurônios parvocelulares ocitocinérgicos (TODESCHIN, *et al.*, 2005). Por outro lado, WINKELMANN *et al.*, (2005) observaram aumento da densidade de neurônios do hipocampo. Esses resultados sugerem que a manipulação neonatal induz além de modificações comportamentais e neuroendócrinas, alterações morfológicas no SNC.

Uma série de trabalhos tem sugerido que fatores externos, como a presença da mãe, podem interferir sobre processos fisiológicos. A separação

da mãe resulta numa diminuição da frequência cardíaca e nas concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento em ratos neonatos (KUHN *et al.*, 1990; SUCHECKI *et al.*, 1993). A atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos neonatos também parece depender da presença da mãe, uma vez que a resposta da corticotrofina (ACTH) e da corticosterona ao estresse é maior em animais que foram separados da mãe do que aqueles em que a relação mãe-filhote não sofreu interferência (KHUN *et al.*, 1990; LEVINE *et al.*, 1991; SUCHECKI *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1997).

Ratos separados da mãe também apresentam um aumento das concentrações plasmáticas basais de corticosterona sendo este aumento dependente do tempo da separação (KUHN *et al.*, 1990; LEVINE *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal parece estar quiescente nos ratos neonatos devido à presença da mãe. Esta inibição pode ocorrer no hipotálamo, visto que a indução do RNAm para proteína c-fos, no PVN, pelo estresse é maior nos animais separados da mãe por 24 horas, sendo, portanto, suficiente para liberar CRH e conseqüentemente ACTH e corticosterona em animais neonatos (SMITH *et al.*, 1997).

Assim, essas alterações fisiológicas e neuroendócrinas observadas em animais neonatos e adultos parecem ser pelo menos em parte devido à interferência na relação mãe-filhote num período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso central onde a migração, a diferenciação, o crescimento e a apoptose neurais são máximos (MISTRETTA & BRADLEY, 1978). De fato, mães que foram privadas, durante algum período, de suas ninhadas lambem, cuidam e ao amamentar adquirem uma postura de proteção se mantendo em cima dos filhotes com maior frequência do que aquelas cuja relação mãe-filhote

não sofreu interferência (LIU *et al.*, 1997; TODESCHIN, 2001). Estas evidências reforçam a teoria de que o comportamento da mãe pode ser responsável pelas alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis que ratos adultos manipulados no período neonatal apresentam.

## **1.2. Papel dos hormônios esteróides gonadais sobre a diferenciação do sistema nervoso central**

Os hormônios esteróides gonadais são produzidos predominantemente pelas gônadas, os ovários e os testículos. Uma pequena fração desses hormônios é produzida pela glândula supra-renal. Esses hormônios exercem um papel importante sobre a diferenciação do SNC através da ligação com receptores específicos de estradiol (E2), progesterona (P) e testosterona (T) (SIMERLY *et al.*, 1990; GORSKI, 1993; FITCH & DENENBERG, 1998).

A ação dos hormônios esteróides gonadais sobre a diferenciação sexual do SNC pode ocorrer de duas maneiras. A primeira é a ação organizacional que se dá durante o período neonatal, onde circuitos neurais específicos de cada sexo são determinados. A segunda ação é a ativacional, que ocorre na vida adulta, quando a presença de hormônios gonadais é necessária para a ativação dos circuitos neurais organizados no período neonatal (KELLY, 1991; McCORMICK *et al.*, 1998).

A participação dos hormônios sexuais sobre a diferenciação sexual do SNC se dá por ações estruturais e neuroquímicas em áreas e circuitos sexualmente dimórficos, podendo atuar também sobre comportamentos e reações neuroendócrinas. Em ratos, essas ações se iniciam durante a fase embrionária e fetal e continuam no período neonatal, crítico para o

desenvolvimento do SNC e são responsáveis pelas condutas distintas e específicas entre machos e fêmeas em determinados comportamentos na idade adulta (GORSKI, 1993; LITTERIA, 1994; FITCH & DENENBERG, 1998).

As gônadas de ratos machos e fêmeas são tecidos indiferenciados durante o período pré-natal. A secreção de hormônios gonadais depende de fatores genéticos, como o fator determinante dos testículos (TDF), que é um conjunto de genes ligados ao cromossomo Y, que promove a diferenciação da gônada em testículo. Nas fêmeas, o cromossomo Y está ausente e a gônada se diferencia em ovário (KELLY, 1991; ARNOLD, 1996).

Nas ratas, os ovários secretam principalmente estrógeno e progesterona (KELLY, 1991). Em ratos machos, ainda no período fetal, a testosterona ou é metabolizada até diidrotestosterona (pela 5 alfa-redutase) ou é convertida em estradiol por ação da aromatase. O estradiol é o principal responsável pela masculinização do SNC e age sobre receptores distribuídos por várias regiões do SNC, como a área pré-óptica, núcleos hipotalâmicos, amígdala, mesencéfalo, medula espinhal e hipófise (KELLY, 1991; SIMERLY *et al.*, 1990).

A gonadectomia de ratos machos recém-nascidos provoca a desmasculinização e a feminilização de vários comportamentos do animal adulto (LUCION *et al.*, 1996; RASIA-FILHO & LUCION, 1996). Além de comportamentos, a estrutura e morfologia de núcleos sexualmente dimórficos é alterada pela castração neonatal (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; FITCH & DENENBERG, 1998).

### 1.3. Período hiporresponsivo ao estresse

Num animal adulto exposto a estímulos estressores observa-se um aumento de glicocorticóides na circulação sistêmica devido à ativação do eixo HPA. Por outro lado, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando um estresse é aplicado, observa-se um pequeno aumento ou mesmo nenhum aumento da secreção de corticosterona. Por esta razão este período é denominado de Período Hiporresponsivo ao Estresse (GUILLET *et al.*, 1980; SAPOLSKY & MEANEY, 1986; SUCHECKI *et al.*, 1993; GOULD, 1994; LEVINE, 1994), época da vida do animal que o eixo HPA está hiporresponsivo. Este período também é caracterizado por concentrações basais de corticosterona e ACTH muito baixas (WALKER *et al.*, 1986; GRINO *et al.*, 1989; GOULD, 1994; LEVINE, 1994).

A causa desta hiporresponsividade vem sendo estudada. GUILLET *et al.*; (1980) sugeriram que a imaturidade do eixo HPA é responsável pela ausência da resposta ao estresse. Assim, somente quando o hipotálamo, a hipófise e o córtex da adrenal estiverem maduros e funcionalmente conectados, uma resposta ao estresse é observada. Esta imaturidade tem como consequência uma regulação deficiente da síntese e liberação de ACTH e corticosterona e na inabilidade do estresse em promover uma alça de *feedback* eficiente (GRINO *et al.*, 1989; SAKLY & KOCH, 1983). Uma outra provável causa desta hiporresponsividade é o fato da adrenal estar relativamente insensível ao ACTH, provavelmente, devido as suas baixas concentrações durante este período da vida do animal (SUCHECKI *et al.*, 1993), embora estudos mais recentes indicam, no entanto que o RNAm para o

CRH no PVN bem como o ACTH e a corticosterona aumentam após injeção de solução salina isotônica aos 6, 12 e 18 dias de vida (DENT *et al.*, 2000).

De acordo com resultados prévios (SEVERINO, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004), a concentração plasmática basal de prolactina (PRL) e após estresse por éter não sofreu alterações em ratas de 11 dias de idade. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos, onde não foi observada a liberação de PRL em resposta ao estresse antes da puberdade (OJEDA *et al.*, 1976; para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1992). A manipulação neonatal não alterou a concentração plasmática basal e nem após o estresse de 1 minuto por éter em ratas de 11 dias de idade. Embora o éter não tenha sido um estressor capaz de induzir um aumento da liberação de PRL nas ratas de 11 dias de idade, WALKER *et al.* (1986) mostraram que este estímulo se mostrou o mais potente estressor para induzir aumentos das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona antes do 14º dia de vida, sugerindo que durante esta época da vida os animais não respondem a todos estímulos uniformemente, visto que os ratos podem ser insensíveis a outros tipos de estímulos como o eletrochoque e a hipóxia. ECK & KUNH (1992) também observaram resposta do ACTH e da corticosterona ao estresse por éter em ratos de 10 dias de idade, indicando que o éter é capaz de ativar o eixo HPA durante o período neonatal. Nesta idade precoce (Período Hiporresponsivo ao Estresse), o sistema de ativação da resposta da PRL ao estresse por éter parece ser menos sensível do que o do ACTH e da corticosterona.

#### 1.4. Estresse

A homeostase é definida como um estado de equilíbrio dinâmico e complexo necessário para a manutenção da vida. Este equilíbrio é constantemente ameaçado por fatores intrínsecos e extrínsecos, como os estressores. Assim, estresse pode ser definido como um estado de desarmonia da homeostase (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Quando organismos encontram-se em situações de perigo ou ameaça, ocorrem umas séries de respostas físicas e psicológicas adaptativas que têm como objetivo o restabelecimento da homeostase. Entre as adaptações fisiológicas estão o redirecionamento da utilização de substratos energéticos, aumento da pressão arterial sangüínea e da freqüência cardíaca, aumento da freqüência respiratória, prevalência dos processos catabólicos em relação aos anabólicos (gliconeogênese e lipólise), inibição do crescimento e das funções reprodutivas, depressão da resposta imunológica/antiflamatória e da própria resposta ao estresse. Entre as adaptações psicológicas estão o aumento do estado de alerta, de vigília, da cognição, a perda da fome e a diminuição do comportamento reprodutivo (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Em resposta a estressores físicos e psicológicos, o eixo HPA é ativado. Ocorre a liberação de CRH pelo PVN no sistema porta-hipofisário promovendo por sua vez, a liberação de ACTH pelos corticotrofos da adenohipófise na circulação sistêmica. Este hormônio interage com receptores no córtex da supra-renal resultando em aumentos de glicocorticóides no plasma. Em humanos, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e em ratos, a corticosterona. O sistema neurovegetativo simpático também é ativado estimulando a liberação de adrenalina e NA nos terminais simpáticos e na

medular da supra-renal na circulação. No estresse, também ocorre uma descarga central de NA por todo o cérebro, em sua maior parte pelo *Locus coeruleus* (LC) que é muito sensível à maioria dos estressores (MELIA & DUMAN, 1991; KONSTANDI *et al.*, 2000). Assim, a ativação do eixo HPA e do sistema neurovegetativo simpático são as principais respostas adaptativas em situações estressantes, sendo o CRH e a NA, respectivamente, os principais componentes das respostas aos estímulos estressantes (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Segundo PACÁK & PALKOVITS (2001), em geral, os estímulos estressantes podem ser divididos em quatro categorias: físicos, psicológicos, sociais e cardiovasculares e metabólicos. Os estresses físicos incluem os estresses por éter, frio, calor, ruído entre outros. Os estresses psicológicos refletem respostas de aprendizado frente às condições adversas experimentadas previamente pelo indivíduo. Este tipo de estressor afeta profundamente processos emocionais e podem resultar em mudanças comportamentais como as que estão relacionadas à ansiedade, medo e frustração. Os estressores sociais são aqueles que promovem alterações nas relações entre indivíduos. Como exemplo, colocar um rato em um território onde existe um animal dominante. Em humanos, a separação de casais, ou a perda de um familiar, por exemplo, seriam exemplos de estresse social. Por fim, estressores que promovem alterações cardiovasculares e metabólicas incluem o exercício físico, a hemorragia e a hipoglicemia, entre outros. Com relação ao tempo de duração, os estímulos estressores podem ser divididos em duas categorias: agudo e crônico. Os estresses agudos podem ser simples e intermitentes. Já os estresses crônicos podem ser intermitentes ou de



exposição prolongada. Muitos estressores apresentam características que misturam estes quatro tipos básicos de estresse que atuam conjuntamente, como por exemplo, o estresse por contenção, a manipulação e a hemorragia hipotensiva (PACÁK & PALKOVITS, 2001).

## **1.5. Prolactina**

### **1.5.1. Ações fisiológicas**

A prolactina é um hormônio protéico adenohipofisário produzido por células especializadas da adenohipófise, os lactotrofos, que correspondem a 20-35% da população de células hipofisárias. Além dos lactotrofos, existem outros sítios de síntese de PRL, o SNC, a glândula mamária, a placenta, o âmnio, o útero e algumas células do sistema imunológico (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Em mamíferos, a prolactina é responsável pelo desenvolvimento da glândula mamária e pela produção de leite sendo que suas concentrações plasmáticas aumentam durante a gravidez e lactação (BEN-JONATHAN, 1985; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

A concentração plasmática basal de PRL é baixa durante os primeiros 20 dias de idade e aumenta notavelmente até a idade adulta (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1992; CHEN, 1987; SEVERINO, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004). Do mesmo modo, a percentagem de lactotrofos é muito pequena antes da puberdade (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS, *et al.*, 1992; CHEN, 1987). Na hipófise de ratos neonatos existe a predominância de mamossomatrofos, células bifuncionais que secretam PRL e GH (HOEFFLER *et al.*, 1985). Os mamossomatrofos se diferenciam em lactotrofos na presença

de estrógenos (BOOCKFOR *et al.*, 1986). Esta diferenciação também parece depender de um sinal materno no início e no decorrer da lactação (PORTER *et al.*, 1991a; PORTER *et al.*, 1991b).

A hiperprolactinemia é uma das principais causas de infertilidade em mulheres e de impotência no homem (BEN-JONATHAN, 1985). Em ratas, concentrações plasmáticas elevadas de PRL, por um longo período, resultam em alterações da regularidade do ciclo estral, da esteroidogênese e da espermatogênese, enquanto que curtos períodos de PRL plasmática elevada, como durante o estresse e a lactação, resultam em infertilidade (SHARPE & MCNEILLY, 1979; VASQUEZ *et al.*, 1980). Além disso, a indução de hiperprolactinemia promove uma supressão do comportamento sexual tanto em machos como em fêmeas (SVARE *et al.*, 1979; DUDLEY *et al.*, 1982).

Em ratas a prolactina parece ter uma ação luteotrófica ou luteolítica caso não ocorra concepção. Existem evidências de que a prolactina sozinha ou na presença de estradiol aumenta o número de receptores do hormônio luteinizante (LH) nas células luteais e a produção de progesterona (HOLT *et al.*, 1976; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). Em roedores, a prolactina também está relacionada com o comportamento maternal em ratas lactantes (DUDLEY, 1982; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Além do seu papel nos processos reprodutivos, a PRL também participa da regulação das respostas imunológicas, da osmorregulação e da angiogênese (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

### 1.5.2. Regulação da secreção de prolactina

De todos os hormônios adenohipofisários, a regulação da secreção da PRL é única, pois o hipotálamo exerce uma ação inibitória tônica sobre a secreção deste hormônio pela adenohipófise, através da liberação de dopamina (DA), o mais potente inibidor de prolactina fisiológico tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A DA é liberada por neurônios tuberoinfundibulares hipotalâmicos nos vasos portais hipofisários e age de forma direta sobre os lactotrofos da adenohipófise (SHAAR & CLEMENS, 1973; MACLEOD & LEHMEYER, 1974; GIBBS & NEILL, 1978, BEN-JONATHAN, 1985; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000), inibindo a síntese e a secreção de PRL.

Receptores dopaminérgicos estão presentes na hipófise, sendo os da subclasse D<sub>2</sub> encontrados no lactotrofo (MEADOR-WOODRUFF *et al.*, 1989). O tratamento com antagonistas dos receptores D<sub>2</sub>, como o haloperidol e pimozida, bloqueiam a atividade dos neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) com conseqüente aumento na síntese e liberação de PRL (OLIVEIRA *et al.*, 1996; MOHANKUMAR *et al.*, 1997; MOHANKUMAR *et al.*, 1998; HENTSCHEL *et al.*, 2000).

A atividade basal dos neurônios TIDA e a responsividade da PRL é maior em fêmeas do que em machos e diminuiu após ovariectomia (DEMAREST & MORRE, 1981; GUNNET *et al.*, 1986a). Este efeito é revertido após tratamento com esteróides gonadais (GUNNET *et al.*, 1986b). A liberação de PRL em resposta ao estresse está relacionada com uma diminuição da atividade de neurônios TIDA em fêmeas, mas não em machos (DEMAREST *et al.*, 1985). Estas evidências sugerem um dimorfismo sexual nas propriedades regulatórias dos neurônios TIDA sobre a secreção e a liberação de PRL.

Além da DA, o GABA (MOGUILEVSKY *et al.* 1992), a Ang II (FRANCI *et al.*, 1997) e o ANP (FRANCI *et al.*, 1992) são capazes de inibir a síntese e liberação de PRL.

Existem inúmeras substâncias que estimulam a liberação de PRL, como o TRH (DeGREEF & VISSER, 1981), VIP (KAJI *et al.*, 1985), ocitocina (RICHARD *et al.*, 1991), serotonina (JORGENSEN *et al.*, 1992), substância P, neurotensina, opióides (RIVIER *et al.*, 1977), melatonina (KAMBERI *et al.*, 1971),  $\beta$ -endorfina (RIVIER *et al.*, 1977), histamina (ALVAREZ, 1982; KNIGGE *et al.*, 1988) entre outras.

### **1.5.3. Prolactina e estresse**

A resposta da corticosterona aos diversos tipos de estressores é muito bem estudada (LENOX *et al.*, 1980; DOBRAKOVOVÁ & JURCOVICOVÁ, 1984). A prolactina, assim como a corticosterona, também responde aos estímulos estressantes, entre eles o éter e ao estresse por contenção (DEMAREST *et al.*, 1985; BÁNKY *et al.*, 1994; CALDEIRA & FRANCI, 2000; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Após a exposição a estressores, o pico da concentração de prolactina ocorre entre 2 e 5 minutos após o estresse e o retorno às concentrações basais se dá aproximadamente após 15 minutos (WAKABAYASHI *et al.*, 1971). Esta resposta pode ser considerada de baixa magnitude e de curta duração (GALA, 1990), diferentemente da resposta da corticosterona, que é bem mais tardia e longa, o pico da concentração é observado aproximadamente 15 minutos após o estresse e mantém-se por aproximadamente 1 hora (TURPEN *et al.*, 1976).

Em humanos também se observa um aumento da secreção de prolactina em situações estressantes como anestesia, cirurgia, exercício e hipoglicemia induzida por insulina. Em todas essas situações a resposta da prolactina ao estresse foi maior nas mulheres do que nos homens (NOEL *et al.*, 1972; PONTIROLI *et al.*, 1982), sugerindo que a resposta deste hormônio está relacionada com as condições hormonais diferentes entre mulheres e homens. Assim como em humanos, as condições hormonais da rata também influenciam a resposta da prolactina ao estresse. De fato, sabe-se já há algum tempo que os estrógenos estimulam a secreção de prolactina (GUDELSKY *et al.*, 1981; CALIGARIS & TALESNIK, 1983; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

A concentração plasmática de PRL pré-estresse, que é fortemente correlacionada com as concentrações plasmáticas de esteróides gonadais (CALIGARIS & TALESNIK, 1983; POLETINI, 1998), é quem determina a magnitude e o tipo de resposta (aumento ou diminuição). Assim, quando as concentrações de prolactina antes do estresse são baixas, como em machos e nas fêmeas em estro e em diestro, um estressor provoca um aumento da secreção de PRL (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971, POLETINI, 1998). Por outro lado, quando a concentração plasmática de PRL é alta, como nas ratas lactantes (BÁNKY *et al.*, 1994), nas ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona e nas fêmeas na tarde do proestro, a prolactina responde ao estresse com uma diminuição da sua secreção (TURPEN *et al.*, 1976; KRIEG *et al.*, 1984; GALA & HAISENLEDER, 1986; POLETINI, 1998).

Os mecanismos responsáveis por esta resposta antagônica da prolactina ao estresse ainda não estão esclarecidos, mas resultados recentes

de nosso laboratório sugerem a participação do sistema angiotensinérgico. Em ratas lactantes e OVXE<sub>2</sub>+P a microinjeção de losartan (antagonista dos receptores AT1 de ANG II) no núcleo arqueado impede a diminuição da PRL após estresse de 1 minuto por éter (DONADIO *et al.*, 2004), sugerindo o papel da Ang II central nesta resposta.

O significado fisiológico do aumento da secreção de prolactina que ocorre no estresse ainda não está bem esclarecido, mas ela parece estar envolvida com a ativação do sistema imunológico (GALA, 1990). Além disso, foram encontrados receptores para prolactina em tecidos não envolvidos diretamente com a resposta imunológica, sugerindo outros papéis fisiológicos para o aumento deste hormônio que ocorre no estresse (GALA, 1990).

#### **1.6. Papel dos hormônios esteróides gonadais e do sistema noradrenérgico central sobre a síntese e liberação de PRL**

A síntese e regulação da secreção de PRL é extremamente complexa e o sistema noradrenérgico e os hormônios esteróides gonadais parecem estar envolvidos nesses processos.

O *Locus coeruleus*, o núcleo A6 da ponte (GRZANNA & MOLLIVER, 1980) é um dos locais do SNC que contém a maioria dos corpos celulares noradrenérgicos, sendo a principal fonte de NA no cérebro (SAWCHENKO & SWANSON, 1982). Seus neurônios projetam-se difusamente para todo o SNC, incluindo núcleos que sintetizam o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) ou núcleos envolvidos com funções autonômicas como o PVN e o núcleo supra-óptico (SON), (SAWCHENKO & SWANSON, 1982; KITAZAWA *et al.*, 1987).

Em ratas que apresentam o ciclo estral regular, o bloqueio do pico pré-ovulatório da PRL, na tarde do proestro, foi observado após lesão do LC na manhã desta fase juntamente com a diminuição do conteúdo de NA no MBH (hipotálamo médio basal) e área pré-óptica medial (POA) (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997). A lesão do LC também diminui as altas concentrações de PRL na tarde do estro, bem como impede os picos circadianos de PRL que ocorrem à tarde em ratas OVXE<sub>2</sub> associado ou não com a progesterona (POLETINI, 1998).

Durante a aplicação de estímulos estressantes, os neurônios do LC são ativados liberando NA (VALENTINO *et al.*, 1991; CONTI *et al.*, 1992; ENNIS, 1997). O envolvimento do LC nas respostas ao estresse é reforçado por dados que demonstram que ocorre um aumento da expressão da proteína FOS, usada como marcadora da atividade neuronal, em situações de estresse (MURPHY *et al.*, 1994; CULLINAM *et al.*, 1995), bem como um aumento da expressão do RNAm para a tirosina hidroxilase no LC (MELIA & DUMAN, 1991). O LC é um núcleo do SNC crítico na iniciação da resposta das catecolaminas no estresse, visto que a administração de CRH exógeno aumenta a liberação de NA no PVN, hipocampo e córtex pré-frontal (VALENTINO *et al.*, 1998).

O LC parece participar da liberação de PRL em resposta ao estresse. A lesão do LC realizada quando as concentrações de prolactina são altas (tarde do proestro, tarde do estro, OVXE<sub>2</sub>, OVXE<sub>2</sub>+P) diminui as concentrações plasmáticas de prolactina pré-estresse e também a magnitude da resposta ao estresse por éter (POLETINI, 1998). Estes resultados sugerem que o sistema noradrenérgico do LC tem uma ação estimulatória sobre a liberação de

prolactina induzida por estresse e que esta estimulação depende do estado hormonal, visto que em animais cujos estrógenos estavam baixos (machos, fêmeas em diestro) a lesão do LC não alterou a magnitude da resposta da prolactina ao estresse (POLETINI, 1998).

O PVN é o maior centro integrativo do hipotálamo e das funções endócrinas, vegetativas e comportamentais (SWANSON & SAWMCHENKO, 1983). O PVN recebe projeções noradrenérgicas ascendentes principalmente da medula oblonga ventrolateral, núcleo do trato solitário (NTS) e *Locus coeruleus* (LC) (para revisão ver PLOTSKY *et al.*, 1989). Esses núcleos são os maiores reguladores fisiológicos da liberação de CRH e AVP durante o estresse.

O estresse é um dos estímulos capazes de promover uma ativação noradrenérgica no PVN com aumento da liberação, síntese, recaptção e do metabolismo da NA no PVN (PÁČAK *et al.*, 1992, PACÁK *et al.*, 1995, TJURMINA *et al.*, 1999).

Em ratos, a manipulação neonatal atenua a liberação de PRL em resposta ao estresse (NÚÑEZ *et al.*, 1996; MEERLO *et al.*, 1999; SEVERINO, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004). Este resultado poderia ser explicado pelo sistema noradrenérgico, pois em animais manipulados ocorre uma menor ativação do LC induzida pelo CRH, sendo as concentrações de NA no PVN mais baixas após estresse por contenção do que nos animais do grupo controle (LIU *et al.*, 2000). Assim, existindo uma menor resposta da PRL ao estresse em ratos manipulados no período neonatal, e considerando a participação do sistema noradrenérgico na regulação da secreção de PRL induzida pelo estresse, resolvemos avaliar e correlacionar a liberação de PRL em resposta



ao estresse e a atividade noradrenérgica no PVN em ratos machos e fêmeas manipulados. Assim, uma das hipóteses investigadas nesta Tese, é a de que modificações no sistema noradrenérgico central possam estar contribuindo para a menor resposta da PRL ao estresse.

### **1.7. Influência dos hormônios esteróides gonadais sobre comportamentos**

A ciclicidade dos hormônios esteróides gonadais durante o ciclo estral em ratas adultas influencia parâmetros comportamentais como, por exemplo, os de memória e aprendizado. Fêmeas na fase do diestro apresentam um melhor desempenho com relação à memória espacial no labirinto aquático do que fêmeas na fase do estro (FRYE, 1995, WARREN & JURASKA, 1997). Da mesma forma, ratas ovariectomizadas apresentam uma memória espacial melhor do que ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol (DIAZ-VELIZ *et al.*, 1991). Esses resultados sugerem que a memória espacial em fêmeas é melhor quando as concentrações plasmáticas de estrógenos são baixas como o que ocorre na fase do diestro e em ratas ovariectomizadas.

Além das influências dos hormônios gonadais sobre as respostas ao estresse já comentadas, os esteróides também modulam efeitos comportamentais podendo ser esses sexualmente dimórficos (BOWMAN *et al.*, 2002). Em roedores, alguns estudos demonstram que ratos têm um desempenho melhor em labirintos do que ratas (WILLIAN & MECK, 1991; GAULIN & FITZGERALD, 1989).

Essas diferenças sexuais podem ser devidas a efeitos organizacionais e/ou ativacionais dos esteróides gonadais sobre comportamentos (WILLIAN & MECK, 1991; FRYE *et al.*, 2000).

Em mulheres, a administração de estradiol diminui sintomas de ansiedade e depressão (NATHORST-BOOS *et al.*, 1993; PEARLSTEIN *et al.*, 1997). Durante a fase do proestro, onde são observados os picos de hormônios esteróides gonadais, ratas demonstram um maior número de entradas e maior duração de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, maior interação social e menor tempo do comportamento de *freezing* em resposta ao eletrochoque do que ratas nas fases do diestro, estro e machos (FRYE *et al.*, 2000). No campo aberto, fêmeas em proestro e estro demonstraram um número maior de cruzamentos de quadrantes do que machos (FRYE *et al.*, 2000).

Fêmeas apresentam um aumento da locomoção e do comportamento de *rearing* quando comparadas aos machos, e a taxa de defecação reduzida quando analisadas no campo aberto (SLOB *et al.*, 1981). Por sua vez, a ovariectomia diminui a locomoção e o comportamento de *rearing* e aumenta a taxa de defecação no campo aberto, e a orquiectomia diminui a taxa de defecação em ratos (SLOB, *et al.*, 1981). Em ratas, utilizando-se de ferramentas comportamentais, como o campo aberto e o labirinto em cruz elevado, que são utilizados para se analisar a ansiedade, e o modelo experimental de nado forçado, que é um modelo de depressão, WALF & FRYE (2005) demonstraram que ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol apresentam uma redução da ansiedade e do comportamento depressivo.

Esses resultados sugerem um efeito ansiolítico e antidepressivo do estradiol em ratas.

Assim como o estradiol existem evidências de que a testosterona também tem uma ação ansiolítica. Em homens, a testosterona diminui a ansiedade e aumenta a performance cognitiva (YU *et al.*, 2000). Da mesma forma, homens na andropausa, o que é caracterizado por uma diminuição das concentrações de testosterona no soro, apresentam um aumento da prevalência de sintomas relacionados à ansiedade e à depressão (DELHEZ *et al.*, 2003). Em ratos, a administração sistêmica e intrahipocampal de andrógenos como testosterona e DHT diminui a ansiedade no campo aberto quando comparados ao grupo de animais gonadectomizados e tratados com veículo (EDINGER & FRYE, 2004). A testosterona aumenta a analgesia e a performance cognitiva e diminui a ansiedade de ratos (FRYE & SELIGA, 2001). Esses resultados sugerem que a testosterona possui, assim como o estradiol, efeitos ansiolíticos e cognitivos.

Como citado acima, existem evidências que sugerem que hormônios esteróides gonadais podem influenciar e modular comportamentos relacionados com a memória, aprendizado, ansiedade e depressão. De modo semelhante, a manipulação neonatal também influencia esses comportamentos. Assim, considerando que tanto a manipulação neonatal quanto os hormônios esteróides gonadais influenciam as respostas neuroendócrinas ao estresse e os comportamentos, resolvemos testar a hipótese de que possa existir uma possível interação entre os hormônios esteróides gonadais e a manipulação neonatal sobre o comportamento no

campo-aberto, que analisa tipicamente a atividade exploratória e a ansiedade em ratos, e sobre a resposta da PRL e do LH ao estresse por éter.

## **1.8. Hormônio Luteinizante (LH)**

### **1.8.1. Ações fisiológicas e regulação da secreção de LH**

O Hormônio Luteinizante (LH) juntamente com o Hormônio Folículo-estimulante (FSH) são as gonadotrofinas (para revisão ver BESSER & MORTIMER, 1974; LEVINE, 1997; MARTÍ & ARMÁRIO, 1998). Possuem esse nome devido às ações que exercem sobre as gônadas. O LH e o FSH são glicoproteínas sintetizadas, predominantemente, por um tipo único de células da adenohipófise, os gonadotrofos, que correspondem a cerca de 10 a 15% da população de células hipofisárias e estão espalhadas por toda a glândula. Uma pequena subclasse de gonadotrofos secretam apenas LH ou FSH (para revisão ver BESSER & MORTIMER, 1974; LEVINE, 1997; MARTÍ & ARMÁRIO, 1998).

O LH apresenta muitas funções relacionadas com a regulação do desenvolvimento, do crescimento, da maturação puberal, dos processos reprodutivos e da secreção dos hormônios esteróides gonadais de machos e fêmeas (LEVINE, 1997; KARMAN & TISCHKAU, 2006). O LH estimula as células intersticiais ovarianas (tecais) e as células de Leydig testiculares a secretarem testosterona e outros produtos que desempenham papel importante na reprodução (DEKEL, 2005). A manutenção do ciclo reprodutivo em mamíferos é criticamente dependente dos pulsos de LH (para revisão ver BESSER & MORTIMER, 1974; DEKEL, 2005).

A regulação da secreção de LH é extremamente complexa e depende de elementos sexuais dimórficos, pulsáteis, periódicos, diurnos, cíclicos e

relacionados ao estágio da vida (RUBIN, 2000; BROWN *et al.*, 2004; KARMAN & TISCHKAU, 2006). A secreção de LH é estimulada principalmente pelo hormônio hipotalâmico chamado de hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) ou hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (para revisão ver BESSER & MORTIMER, 1974; LEVINE, 1997; RUBIN, 2000; McCANN *et al.*, 2001).

Os neurônios produtores de GnRH estão sob inúmeras influências, entre elas podemos citar a dopaminérgica, serotoninérgica, noradrenérgica, gabaérgica e endorfinérgica (DONOSO *et al.*, 1994; McCANN *et al.*, 1998).

### **1.8.2. LH e estresse**

O LH é um hormônio que tem suas concentrações plasmáticas modificadas pelos estressores (NEIL, 1970; LÓPEZ-CALDERON *et al.*, 1990; AKEMA *et al.*, 1995). Estímulos estressantes são capazes de influenciar a secreção de hormônio luteinizante indiretamente através de vias centrais neurais que regulam o GnRH (BRAN & MAHESH, 1991; MITCHEL *et al.*, 2005) ou através de efeitos diretos dos hormônios glicocorticóides circulantes sobre os gonadotrofos hipofisários influenciando, por sua vez, a secreção de LH (BRISKI & SYLVESTER, 1991; D'AGOSTINHO *et al.*, 1990).

Estímulos estressantes como a contenção (BLAKE, 1975), o eletrochoque (RIVIER *et al.*, 1986) e o estresse por hipoglicemia (CAGAMPANG *et al.*, 1997), entre outros, suprimem a liberação pulsátil de LH e o pico desse hormônio que ocorre no proestro em ratas (ROOZENDAAL *et al.*, 1995). Essa supressão é potencializada na presença de estrógenos (CAGAMPANG *et al.*, 1997; HAHN *et al.*, 2003). Existem estudos que sugerem

a participação do eixo HPA na liberação de LH. A administração central de CRH pode inibir a liberação de LH e o pico desse hormônio durante o proestro em ratas (ONO *et al.*, 1984; ROOZENDAAL *et al.*, 1996). A diminuição da secreção de LH induzida por estresse pode ser evitada após adrenalectomia (McGIVERN & REDEI *et al.*, 1994). Além disso, a administração ICV de antagonista de receptores para CRH também produz o mesmo efeito (MAEDA *et al.*, 1994; BRISKI, 1995). Por sua vez, a administração de agonista para CRH aumenta a concentração de LH no plasma (BRISKI, 1995). Esses resultados sugerem a participação do CRH na regulação da secreção de LH durante o estresse.

A duração da aplicação do estímulo estressante está relacionada com o tipo de resposta do LH ao estresse. Em ratos de ambos os sexos, o estresse crônico provoca uma diminuição da secreção de LH (GRAY *et al.*, 1978; TACHE *et al.*, 1976). Por outro lado, com relação ao estresse agudo, ainda não existe na literatura nenhum consenso, visto que alguns pesquisadores demonstram aumentos (EUKER *et al.*, 1975; SIEGEL *et al.*, 1981), diminuições (BRISKI, 1995; RIVIER *et al.*, 1986) ou até mesmo nenhuma alteração na concentração plasmática de LH em resposta ao estresse agudo (CHARPENET *et al.*, 1982; MANN & ORR, 1990). BRISKI (1996) demonstrou que as discrepâncias com relação aos padrões de resposta do LH ao estresse agudo podem estar correlacionadas com diferenças na ativação da secreção de glicocorticóides pelo tipo e intensidade do estressor.

Na literatura não foram encontrados estudos que analisam o efeito do estresse sobre esse hormônio em ratos manipulados. Sendo, portanto, o LH um hormônio que responde ao estresse, cuja resposta parece depender do

eixo HPA, que sabidamente é hiporresponsivo em ratos manipulados no período neonatal, esse hormônio juntamente com a PRL foi objeto de estudo como medida de estresse.

### **1.9. Ciclo estral**

O ciclo estral de ratas dura em torno de 4-5 dias. É dividido em quatro estágios: proestro, estro, diestro I (metaestro) e diestro II (diestro) que são identificados pela análise a fresco no microscópio de tipos celulares típicos de cada fase. A fase do proestro dura em torno de 12 a 14 horas e antecede a fase do estro, período de receptividade sexual, que dura em média 25 a 27 horas. Senão ocorrer concepção, a próxima fase é o diestro I que dura aproximadamente 6 a 8 horas. Na próxima fase, diestro II, que tem duração aproximada de 55 a 57 horas, é quando se inicia novamente a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo, seguido do proestro novamente (FREEMAN, 1994).

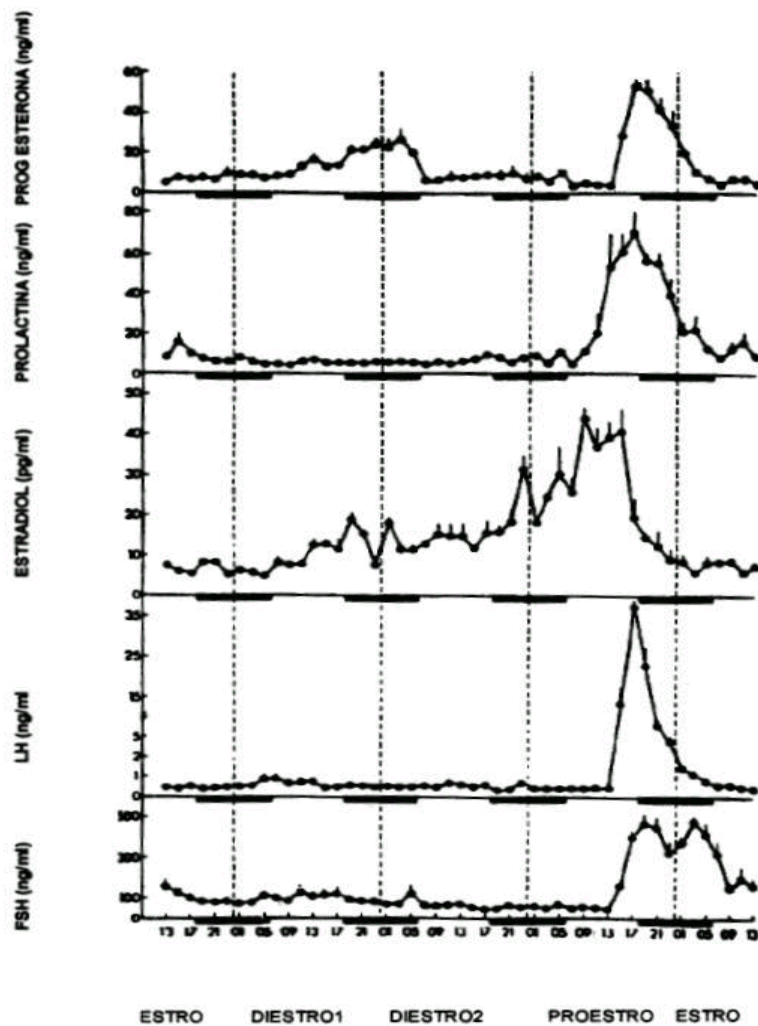
### **1.10. Perfil da secreção de PRL e esteróides gonadais durante o ciclo estral**

A prolactina apresenta um pico durante à tarde do proestro que coincide com o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Figura 1). Alguns autores identificam esse pico como único durante o ciclo estral (NEILL, 1970; SMITH *et al.*, 1975), outros observaram um segundo pico durante à tarde do estro (BUTCHER *et al.*, 1974; POLETINI, 1998; SZAWKA *et al.*, 2000) ou concentrações de prolactina elevadas durante o proestro, estro e diestro I (AMENOMORI, 1970).

A concentração plasmática de estradiol é baixa no estro e começa a aumentar na tarde do diestro I, até atingir concentrações mais altas no meio dia do proestro, que desencadeiam o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, caindo até o final da tarde e atingindo valores basais no início da madrugada do estro (Figura 1).

A concentração plasmática de progesterona começa a aumentar juntamente com o pico de LH na tarde do proestro, retornando às concentrações basais na manhã do estro. Além do pico que ocorre na tarde do proestro, as concentrações plasmáticas de progesterona aumentam na manhã do diestro I retornando às concentrações basais na manhã da próxima fase, o diestro II (Figura 1).





**Figura 1.** Concentrações plasmáticas de prolactina, estradiol, progesterona, LH e FSH em intervalos de 2 horas durante as quatro fases do ciclo estral de ratas. Os valores estão expressos como média ( $\pm$  erro padrão da média) (SMITH *et al.*, 1975).

---

**OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da manipulação neonatal sobre as respostas neuroendócrinas ao estresse e sobre comportamentos no campo aberto em ratos machos e fêmeas adultos. Também será testada a hipótese de que haja uma provável modulação dos efeitos da manipulação neonatal pelos hormônios esteróides gonadais. Por fim, o efeito da manipulação neonatal sobre a atividade noradrenérgica no PVN em ratos machos e fêmeas adultos será avaliado.

### 2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre parâmetros comportamentais no campo-aberto e sobre a resposta da PRL e do LH ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas na manhã do diestro II, proestro e estro (EXPERIMENTO 1);

Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento no campo-aberto e sobre a resposta da PRL e do LH ao estresse por éter em ratos machos e fêmeas gonadectomizados (EXPERIMENTO 2);

Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento no campo aberto e a resposta da PRL e do LH ao estresse por éter em ratos gonadectomizados tratados com *pellet* subcutâneo de estradiol nas fêmeas e de testosterona nos machos (EXPERIMENTO 2);

Avaliar a resposta da PRL e a atividade noradrenérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo induzida por estresse em ratos machos e fêmeas em diestro II (EXPERIMENTO 3);

---

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

---

### **3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Experimento 1**

Os animais foram separados por sexo e divididos em dois grupos não-manipulados e manipulados. Na idade adulta, a veia jugular externa direita foi canulada entre as 16:00 e 18:00 horas. O estresse por contenção foi aplicado entre as 9:00 e 11:00 horas do dia seguinte. Foram estudados ratos machos e fêmeas nas fases do diestro II, proestro e estro. Amostras de 600  $\mu$ L de sangue foram coletadas aos 2 minutos antes e 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse. Um volume igual de soro fisiológico estéril foi repostado após cada coleta. As concentrações plasmáticas de PRL e de LH foram determinadas por radioimunoensaio.

Em um outro grupo de animais, cujo tratamento até a idade adulta foi o mesmo do descrito acima, ao redor dos 120 dias de idade, o comportamento no campo-aberto foi registrado pela manhã e analisado em ratos machos e fêmeas em diestro II, proestro e estro.

#### **Grupos experimentais:**

##### **1- Machos**

a) Não-manipulados:

b) Manipulados

##### **2- Fêmeas**

##### **Não-manipuladas**

a) Diestro II

- b) Proestro
- c) Estro

**Manipuladas:**

- a) Diestro II
- b) Proestro
- c) Estro

### **3.2. Experimento 2**

Os animais foram separados por sexo e divididos primeiramente nos grupos não-manipulados e manipulados. Todos animais, ao redor dos 90 dias de idade foram subdivididos em grupos que sofreram gonadectomia fictícia, gonadectomia e gonadectomia + reposição hormonal. Em todos os sub-grupos os procedimentos experimentais (estresse e comportamento) foram realizados 3 semanas após as cirurgias (gonadectomias fictícias, gonadectomias e gonadectomias + reposição hormonal). Após o procedimento de retirada das gônadas, foram implantados *pellets* no tecido subcutâneo na altura da região dorso cervical. Nos grupos de animais repostos, as fêmeas receberam *pellets* com E2 e os machos *pellets* com testosterona cristalina. Nos grupos gonadectomia e gonadectomia fictícia, as fêmeas receberam *pellets* contendo óleo e os machos *pellets* sem testosterona. Três semanas após esses procedimentos, a veia jugular externa direita foi canulada em torno das 17:00 horas e o estresse por éter aplicado entre 9:00 e 11:00 horas da manhã seguinte. Amostras de 600  $\mu$ L de sangue foram coletadas aos 2 minutos antes e 2, 5 e 15 minutos após o estresse. Um volume igual de solução fisiológica

estéril foi repostado após cada coleta. As concentrações plasmáticas de PRL e LH foram determinadas por radioimunoensaio.

Nesses mesmos grupos de animais, o comportamento no campo-aberto foi registrado entre 9:00 e 11:00 horas da manhã e os parâmetros comportamentais foram analisados.

### **Grupos experimentais:**

#### **1- Machos:**

##### **Não-manipulados:**

- 1- Orquiectomia fictícia (NM ORQ FICT)
- 2- Orquiectomia (NM ORQ)
- 3- Orquiectomia + testosterona (NM ORQ + T)

##### **Manipulados:**

- 4- Orquiectomia fictícia (M ORQ FICT)
- 5- Orquiectomia (M ORQ)
- 6- Orquiectomia + testosterona (M ORQ + T)

#### **2- Fêmeas:**

##### **Não-manipuladas:**

- 1- Ovariectomia fictícia (NM OVX FICT)
- 2- Ovariectomia (NM OVX)
- 3- Ovariectomia + E2 (NM OVX+E2)

##### **Manipuladas:**

- 4- Ovariectomia fictícia (M OVX FICT)



5- Ovariectomia (M OVX)

6- Ovariectomia + E2 (M OVX+E2)

### **3.3. Experimento 3**

Os animais foram separados por sexo e divididos primeiramente nos grupos não-manipulados e manipulados. Ao redor dos 90 dias de idade foram subdivididos em basal e estresse. As ratas foram estudadas no diestro II. Entre 9:00 e 10:00 da manhã, os indivíduos do grupo basal tiveram o cérebro retirado e congelado e o sangue coletado. O mesmo ocorreu com os animais do grupo estresse, após a aplicação do estresse por contenção por 1 minuto. O cérebro e o plasma foram armazenados em um freezer -70°C até o momento das dosagens. As concentrações plasmáticas de PRL no plasma foram determinadas por radioimunoensaio. O PVN foi microdissectado em criostato (-20°C) e os conteúdos de noradrenalina e MHPG foram determinados através de detecção eletroquímica.

#### **Grupos experimentais:**

##### **Machos**

##### **Não-manipulados:**

1. Basal
2. Estresse

##### **Manipulados:**

3. Basal
4. Estresse

**Fêmeas****Não-manipuladas**

1. Basal
2. Estresse

**Manipulados:**

1. Basal
2. Estresse

---

**MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

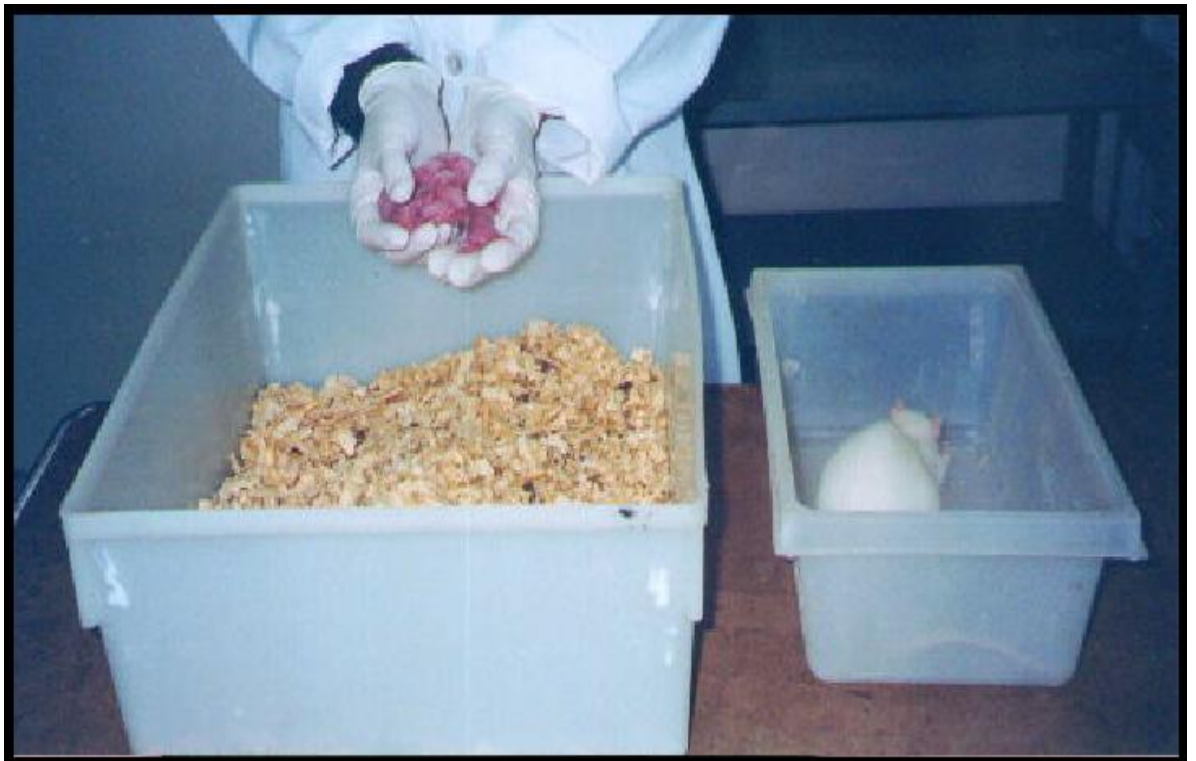
### 4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar. Os animais foram mantidos sob temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (12 horas de claro e 12 horas de escuro, com as luzes acessas às 6:00 horas) controlados e com água e comida *ad libitum*. Ratas prenhas foram fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS. Após o nascimento os filhotes foram divididos em dois grupos: não-manipulados e manipulados (1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia de vida pós-natal).

A manipulação neonatal foi aplicada de acordo com um modelo prévio utilizado em nosso laboratório (LUCION *et al.* 2003, SEVERINO *et al.*, 2004, GOMES *et al.*, 2005). Após esse procedimento, os filhotes foram colocados novamente com suas mães. No 21<sup>o</sup> dia de vida os filhotes foram desmamados e os animais separados por sexo em grupos de 4-5 ratos por caixa.

### 4.2. Manipulação neonatal

Um dia após o nascimento, o número de filhotes foi padronizado em 8 por mãe. A manipulação neonatal foi realizada do 1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia de vida pós-natal em uma sala adjacente ao biotério (Figura 2). A mãe foi colocada em uma caixa ao lado e o experimentador com as mãos revestidas com luvas de látex, manipulou gentilmente os filhotes durante 1 minuto durante a fase clara do fotoperíodo em horários aleatórios. O tempo total de separação dos filhotes da mãe foi de aproximadamente de 3 minutos.



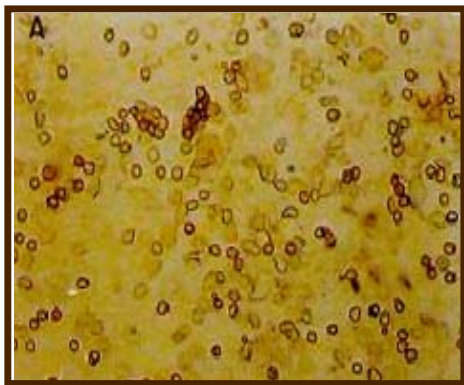
**Figura 2.** Procedimento de manipulação neonatal.

### 4.3. Esfregaço vaginal

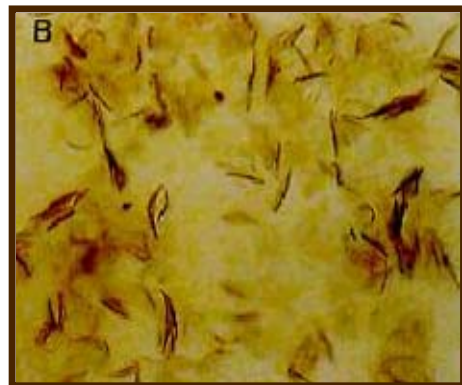
Nas fêmeas adultas, o esfregaço vaginal foi realizado diariamente ao redor das 9:00 horas da manhã (Figura 3). O epitélio vaginal foi analisado a fresco no microscópio óptico segundo técnica de LONG & EVANS (1992) (Figura 4). As ratas utilizadas no experimento tiveram no mínimo 3 ciclos estrais regulares.



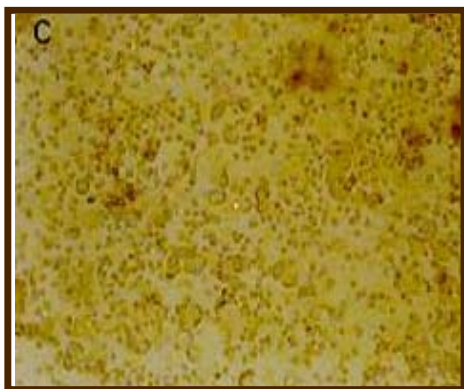
**Figura 3.** Coleta do epitélio vaginal.



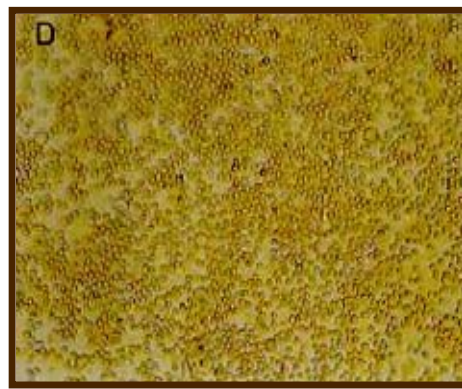
Proestro



Estro



Metaestro



Diestro

**Figura 4.** Epitélio vaginal coletado através de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.

#### **4.4. Anestesia**

Nas cirurgias de gonadectomias, os animais foram anestesiados por via intramuscular com Tiopental® na dose de 50 mg/kg.

Nas cirurgias de canulação da veia jugular, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol (Aldrich Chem. Comp. Inc.) 2,5% em salina na dose de 1 mL/100 g de peso corporal.

#### **4.5. Gonadectomia e gonadectomia fictícia**

Após anestesia, as ratas foram ovariectomizadas através de incisões transversais bilaterais na porção látero-dorsal do abdômen de cerca de 1 cm, por meio das quais os ovários e as porções superiores uterinas foram expostos. Após ligadura entre essas duas estruturas, os ovários foram retirados. Por fim, o tecido muscular e a pele foram suturados.

Após anestesia, os ratos foram orquiectomizados através de incisões transversais únicas nos sacos escrotais de cerca de 2 cm, estando o animal em decúbito dorsal. Os ramos vasculares foram rigorosamente atados e, após, os testículos foram retirados. Por fim, a pele do saco escrotal foi suturada.

Nas cirurgias de gonadectomia fictícia, os mesmos procedimentos foram realizados com exceção da ligadura e da retirada dos ovários e testículos.

#### **4.6. Tratamento hormonal**

A reposição hormonal dos ratos machos e fêmeas foi durante três semanas. Nas ratas do grupo OVX+E2, uma cânula de silicone (Medicone, Multiplast®) de 15mm de comprimento (1,02 mm de diâmetro interno e 2,16 mm de diâmetro externo) foi preenchida com 10 µL de β-estradiol 3-benzoate



(SIGMA®) 5% diluído em óleo foi implantada subcutaneamente na região dorso-cervical após a cirurgia de ovariectomia. Nas ratas dos grupos OVX - FICT e OVX, o *pellet* implantado possuía apenas óleo.

No grupo ORQ+TESTO, uma cânula de silicone (Medicone, Multiplast®) com 10 mm de comprimento (1,5 mm de diâmetro interno e 2,4 mm de diâmetro externo) foi preenchida com testosterona cristalina pura (SIGMA®) e implantada abaixo do tecido subcutâneo na região dorso-cervical após a orquiectomia. Nos ratos dos grupos ORQ FICT e ORQ, os *pellets* foram implantados sem a testosterona.

#### **4.7. Comportamento no campo aberto**

O campo aberto consiste em uma caixa de 1 m<sup>2</sup>. Sua base é dividida em 25 quadrados de 20 cm<sup>2</sup> (Figura 5). Desses 25 quadrados, 16 são laterais e 9 centrais. A escolha de cada um dos quatro cantos do campo aberto para colocação do animal foi aleatória. O tempo do registro comportamental foi de 5 minutos. A análise dos comportamentos foi por meio do programa Noldus®. Os parâmetros analisados no campo aberto foram:

- 1- Duração total de locomoção
- 2- Freqüência de locomoção
- 3- Duração de permanência nos quadrantes centrais
- 4- Freqüência de entrada nos quadrantes centrais



**Figura 5.** Campo aberto.

#### **4.8. Estresse**

No experimento 1 foi aplicado o estresse por contenção, onde o animal permaneceu trinta minutos dentro de um tubo plástico. No experimento 2, estresse por éter, quando o animal foi colocado em uma cuba saturada de vapores de éter durante 1 minuto. No experimento 3 o estresse por contenção teve duração de 1 minuto.

#### **4.9. Canulação da veia jugular**

Após anestesia, uma cânula de silicone (Medicone®), de dimensões de 0,59 mm de diâmetro interno e 0,99 mm de diâmetro externo, foi introduzida no átrio direito através da veia jugular externa direita segundo técnica descrita por HARMS & OJEDA (1974). Até o momento da coleta as cânulas ficaram preenchidas com solução fisiológica estéril.

#### **4.10. Coletas de sangue**

Todas as coletas de sangue foram realizadas em uma sala silenciosa. Após a introdução do cateter, os animais foram mantidos em caixas individuais e cerca de 30 minutos antes da primeira coleta uma extensão de 20 cm de polietileno (PE50), previamente lavada com soro heparinizado, foi conectada à cânula de silicone e preenchida com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%), com o objetivo de realizar as coletas de sangue seriadas sem ser necessária a manipulação do animal. Amostras de 600  $\mu$ L de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas aos 2 minutos antes do estresse e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse por contenção (Experimento 1) e aos 2 minutos antes e aos 2, 5 e 15 minutos após o estresse por vapores de éter

(Experimento 2). Após cada coleta um volume igual de solução fisiológica estéril foi repostado.

Em todos os grupos, as amostras de sangue foram colocadas em tubos plásticos, centrifugadas a 3000 rpm a 4°C durante 15 minutos, sendo o plasma separado e armazenado em um freezer a -70°C.

#### **4.11. Radioimunoensaio**

Os radioimunoensaios foram realizados na Faculdade de Medicina – Depto. de Fisiologia da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto / SP no laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci. As concentrações plasmáticas de prolactina foram determinadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo usando kits específicos da National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore-USA). Os anticorpos específicos para PRL foram o anti-rat PRL-S9 e a preparação padrão a PRL-RP3 foram desenvolvidos em ratos. O 2º anticorpo foi produzido pelo laboratório. O limite mínimo de detecção das concentrações de PRL foi de 0,09 ng/mL.

Para as dosagens LH foi utilizado *kit* específico fornecido pelo National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore - USA). O anticorpo primário foi o anti-rat LH-S11 e a preparação padrão foi a LH-RP3. O limite mínimo para a detecção do LH foi de 0,04 ng/mL.

#### **4.12. Microdissecção (*Punch*)**

A porção posterior do cérebro foi fixada em um suporte e seccionada no criostato em uma temperatura de -20°C sendo uma amostra do PVN removida

pela técnica do *punch* (PALKOVITS, 1973). Os *punches* foram obtidos através das coordenadas do Atlas do cérebro de ratos (PAXINOS & WATSON, 1986).

#### **4.13. Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED)**

Os conteúdos de NA e MHPG-sulfato foram determinados por cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica. Os *punches* do PVN congelados foram homogeneizados em 400 µL de uma solução contendo 0,2 M de ácido perclórico, 0,1 mM EDTA e 0,15 µM de 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA, padrão interno; Aldrich, EUA). Cada amostra foi sonicada até que o tecido estivesse totalmente dissolvido e então o homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 12000g. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana durapore de 0,22 µm (Millipore) previamente preenchida com uma solução de ácido perclórico 0,2 M. No *pellet* que ficou no tubo foi determinado o conteúdo de proteína através do método de BRADFORD (1976). No rato, o 3-metoxi-4-hidroxifeniletlenoglicol (MHPG, metabólito da NA) é conjugado a MHPG-sulfato pela fenolsulfatotransferase (FLODS E MEEK, 1974). O MHPG-sulfato não é eletroquimicamente ativo, assim, para hidrolisar o MHPG-sulfato foi necessário aquecer o sobrenadante a 95°C por 5 minutos como previamente descrito (LOOKINGLAND *et al.*, 1991). Posteriormente, 30 µL de cada amostra foi injetado no aparelho de HPLC por um auto injetor (SIL-10Advp; Shimadzu, Japão). A separação foi realizada em uma coluna fase reversa C18 de 250 x 4,6 mm (Shim-pack VP-ODS, 5µm; Shimadzu, Japão), precedida por uma pré-coluna de 10 x 4,6 mm (Shim-pack GVP-ODS, 5µm; Shimadzu, Japão). A fase móvel, preparada com água Milli-Q,

era constituída de 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,28 mM ácido octanesulfônico de sódio e 20% de metanol, sendo o pH ajustado para 3,5 com H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. O fluxo da bomba (LC-10Advp; Shimadzu, Japão) para o HPLC foi de 0,8 mL/min. O detector utilizado foi o Decade (Antec) com potencial eletroquímico de 0,65 V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 *electrochemical flow cell*; Antec Leyden, Holanda). Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o programa Class-VP (Shimadzu, Japão). A NA e o MHPG foram identificados de acordo com o tempo de retenção de seus picos e a quantificação foi feita através do método de padrão interno (DHEA como padrão interno) baseado na sua área abaixo da curva.

#### **4.14. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados pela estatística paramétrica. No experimento 1, os parâmetros comportamentais no campo aberto em ratos machos foram comparados entre os dois grupos estudados pelo teste *t* de Student. Em ratas fêmeas, os parâmetros observados no campo aberto foram comparados por meio de ANOVA de duas vias seguida de Newman-Keuls, sendo analisados os efeitos grupo (não-manipuladas e manipuladas) e da fase do ciclo estral (diestro, proestro e estro). Em ratos machos, as médias ( $\pm$ EPM) das concentrações plasmáticas de PRL e LH foram comparadas através de ANOVA de uma via de medidas repetidas para o estresse, sendo analisado os efeitos grupo (não-manipulados e manipulados) e estresse (basal, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse) e a interação entre esses efeitos por meio do teste Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Em ratas fêmeas, utilizou-se ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) para se avaliar

a manipulação neonatal, do estresse e do ciclo estral sobre as concentrações plasmáticas de PRL e LH.

No experimento 2, em ratos machos e fêmeas, as médias ( $\pm$ EPM) dos parâmetros comportamentais no campo aberto foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Foram comparados os efeitos da manipulação neonatal e do tratamento hormonal (cirurgia de gonadectomia fictícia, gonadectomia e gonadectomia juntamente com reposição de testosterona nos machos e estradiol nas fêmeas). Em ratos machos e fêmeas as médias das concentrações plasmáticas de PRL e LH foram analisadas por meio de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

No experimento 3, em ratos machos e fêmeas, as médias ( $\pm$ EPM) das concentrações plasmáticas de PRL e as médias ( $\pm$ EPM) dos conteúdos no PVN de NA, MHPG e da razão MHPG/NA foram comparadas por meio de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos da manipulação neonatal, do estresse e da interação manipulação neonatal e estresse foram analisados.

O nível crítico foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ) para se considerar diferenças estatisticamente significativas. Valores de  $p$  acima desse e até 0,10 foram considerados tendências.

---

**RESULTADOS**

---



## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nessa Tese foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$ EPM).

Os resultados do experimento 1 serão descritos primeiro, seguido dos experimentos 2 e 3, nesta respectiva ordem. Em cada experimento serão discutidos primeiro os resultados obtidos com os ratos machos e depois com as ratas fêmeas. Em cada descrição os dados considerados significativos serão descritos primeiro seguido da descrição de tendências e por último dos dados não significativos.

### 5.1. Experimento 1

#### 5.1.1. Efeito da manipulação neonatal sobre comportamento no campo aberto em ratos machos

A figura 6 representa o efeito da manipulação neonatal sobre a frequência de entrada (A) e a duração de permanência (B) nos quadrantes centrais do campo aberto. A manipulação neonatal aumentou a frequência de entrada nos quadrantes centrais (teste *t* de Student,  $p=0,05$ ). Foi observada uma tendência ( $p=0,09$ ) ao aumento de locomoção em ratos manipulados quando comparados aos ratos não-manipulados.

Os parâmetros frequência de locomoção e duração de locomoção (Figura 7) não foram diferentes entre os grupos estudados ( $p=0,776$  e  $p=0,979$ , respectivamente).

### **5.1.2. Efeito da manipulação neonatal sobre comportamento no campo aberto em ratas fêmeas durante o ciclo estral**

A figura 8 representa a duração e a frequência de locomoção em ratas não-manipuladas e manipuladas nas fases do diestro, proestro e estro. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo (não-manipuladas e manipuladas) [ $F(1,69)=16,898$ ,  $p < 0,001$ ] e do ciclo estral (diestro, proestro e estro) [ $F(2,69)=3,334$ ,  $p < 0,05$ ] foram estatisticamente significativos. Ratas na fase do estro apresentaram um aumento significativo da duração de locomoção. A interação grupo e ciclo estral não apresentou diferença significativa [ $F(2,69)=0,209$ ].

Com relação à frequência de locomoção no campo aberto, foram observadas diferenças significativas nos efeitos do grupo (não-manipuladas e manipuladas) [ $F(1,70)=5,895$ ,  $p < 0,05$ ] e do ciclo estral (diestro, proestro e estro) [ $F(2,70)=3,948$ ,  $p < 0,05$ ]. Ratas na fase do estro apresentaram um aumento na frequência de locomoção quando comparadas às fases do diestro e proestro. A interação entre esses efeitos (grupo x fase do ciclo estral) não foi significativa [ $F(92,70)=0,891$ ].

A figura 9 demonstra a análise do parâmetro comportamental tempo de permanência e frequência de entrada nos quadrantes centrais no campo aberto. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (não-manipuladas e manipuladas) [ $F(1,71)=1,377$ ], entre as fases do ciclo estral (diestro, proestro e estro) [ $F(2,71)= 1,009$ ] e nem em relação à interação (grupo x fase do ciclo estral) [ $F(2,71)=0,446$ ].

O mesmo ocorreu com a frequência de entrada nos quadrantes centrais. O efeito do grupo (não-manipuladas e manipuladas) [ $F(1,72)=0,933$ ], da fase do ciclo estral (diestro, proestro e estro) [ $F(2,72)=1,624$ ] e a interação entre eles (grupo x fase do ciclo estral) [ $F(2,72)=0,499$ ] não foram estatisticamente significativos.

### **5.1.3. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da prolactina ao estresse por contenção em ratos machos**

A figura 10 representa as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratos machos não-manipulados e manipulados submetidos a estresse por contenção de 30 minutos. O sangue foi coletado antes e aos 2, 5 e 15 minutos após a aplicação do estresse. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de uma via de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p<0,05$ ). Foi observada diferença significativa no efeito do grupo [ $F(1,22)=12,004$ ,  $p<0,05$ ] e do estresse [ $F(5,110)=9,09$ ,  $p<0,001$ ]. As concentrações plasmáticas de PRL foram maiores do que as basais nos tempos 2, 5 e 10 minutos após o estresse. A interação entre grupo e estresse não foi estatisticamente diferente [ $F(5,110)=0,566$ ].

### **5.1.4. Efeito da manipulação neonatal e do ciclo estral sobre a resposta da prolactina ao estresse por contenção em ratas fêmeas**

As figuras 11 e 12 representam as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratas não-manipuladas e manipuladas nas fases diestro, proestro e estro submetidas a 30 minutos de estresse por contenção. O sangue foi

coletado antes e aos 2, 5 e 15 minutos após o início do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo, do estresse e da fase do ciclo estral foram analisados. Todos os efeitos tiveram diferenças estatisticamente significativas: grupo [ $F(1,55)=18,331$ ,  $p < 0,001$ ]; estresse [ $F(5,275)=33,440$ ,  $p < 0,001$ ] e fase do ciclo estral [ $F(2,55)=8,317$ ,  $p < 0,001$ ]. A interação desses três fatores também foi estatisticamente diferente [ $F(10,275)=2,881$ ,  $p < 0,05$ ]. O teste de Newman-Keuls revelou que as concentrações plasmáticas de PRL basais não diferem entre os grupos estudados. O estresse provocou aumento das concentrações plasmáticas de PRL somente na fase do estro, aos 2 minutos, em ambos os grupos, não-manipuladas e manipuladas (Figuras 11A, 11B e 12C). Além disso, ratas manipuladas na fase do estro apresentaram uma redução das concentrações plasmáticas de PRL 2 minutos após o estresse quando comparadas com ratas não-manipuladas no mesmo tempo e fase do ciclo estral (Figura 12C). Durante a fase do estro, 2 minutos após o início do estresse, também foi observado uma maior resposta da PRL ao estresse em ratas não-manipuladas quando comparadas ao mesmo grupo e entre as fases do diestro e proestro (Figura 11A). Da mesma forma, ratas manipuladas em estro, apresentaram uma maior resposta da PRL 2 minutos após o início do estresse quando comparadas às ratas do mesmo grupo na fase do diestro (Figura 11B).

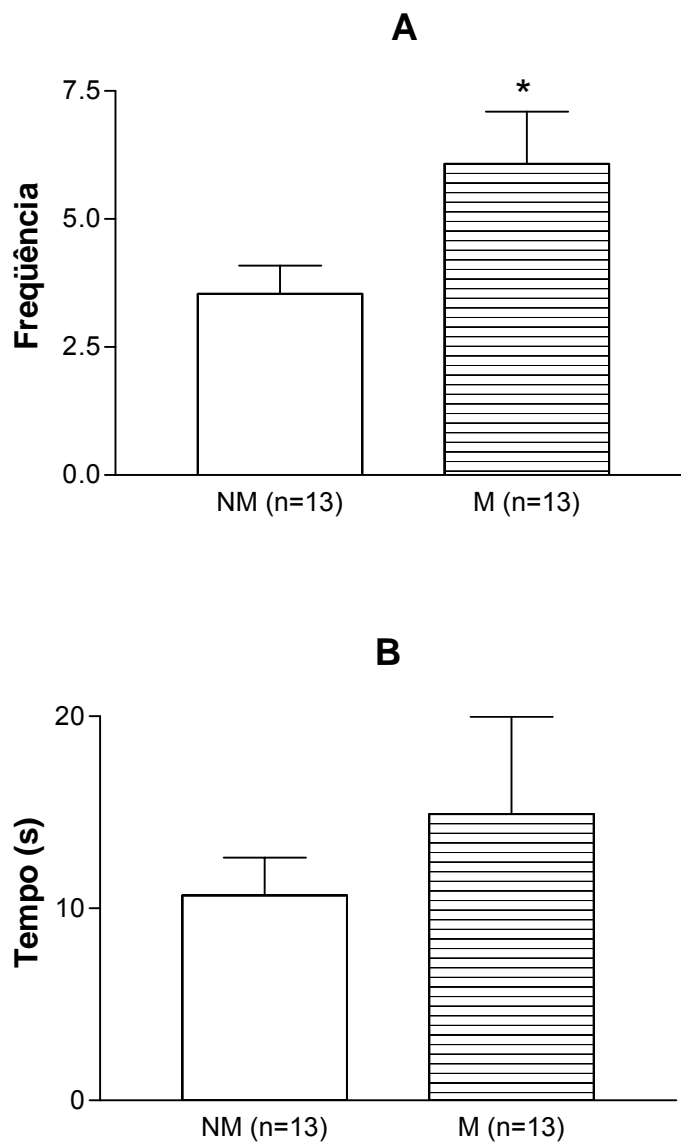
### **5.1.5. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta do LH ao estresse por contenção em ratos machos**

A figura 13 demonstra as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em ratos machos não-manipulados e manipulados submetidos a estresse por contenção durante 30 minutos. O sangue foi coletado antes e aos 2, 5 e 15 minutos após o início do estresse. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de uma via de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), sendo os efeitos do grupo (não-manipulado e manipulado) e do estresse (basal, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após estresse) analisados. Foram observadas diferenças significativas no efeito do grupo [ $F(1,19)=6,07$ ,  $p < 0,05$ ] e do estresse [ $F(5,95)=7,113$ ,  $p < 0,001$ ]. As concentrações plasmáticas de LH 30 minutos após o início do estresse foram diferentes de todos os tempos estudados. A interação entre grupo e estresse não foi estatisticamente diferente [ $F(5,95)=0,545$ ].

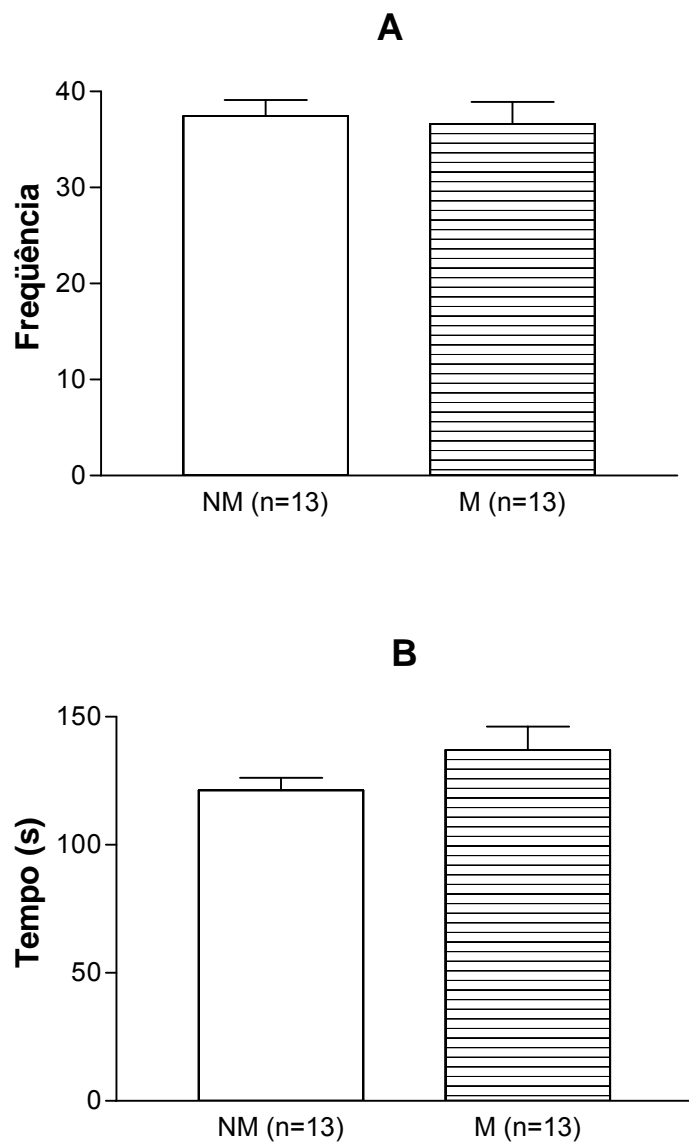
### **5.1.6. Resposta do LH ao estresse por contenção em ratas fêmeas durante o ciclo estral**

As figuras 14 e 15 representam as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em ratas não-manipuladas e manipuladas nas fases do diestro, proestro e estro submetidas a estresse por contenção durante 30 minutos. O sangue foi coletado antes e aos 2, 5 e 15 minutos após o início do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo, do estresse e da fase do ciclo estral foram analisados. Todos os efeitos tiveram diferenças significativas: grupo [ $F(1,64)=40,270$ ,  $p < 0,001$ ]; estresse

[F(5,320)=34,984,  $p<0,001$ ] e fase do ciclo estral [F(2,64)=43,468,  $p<0,001$ ]. A interação grupo x estresse [F(5,320)=6,880,  $p<0,001$ ], grupo x fase do ciclo estral [F(2,64)=6,597  $p<0,05$ ] e estresse x fase do ciclo estral [F(10,320)=5,558,  $p<0,001$ ] foram estatisticamente diferentes. A interação entre os três fatores analisados (grupo, estresse e fase do ciclo estral) também foi estatisticamente significativa [F(10,320)=2,067,  $p<0,05$ ]. O teste de Newman-Keuls revelou que as concentrações plasmáticas de LH basais não diferem entre os grupos estudados. O estresse provocou aumento das concentrações plasmáticas de LH na fase do proestro aos 2, 5, 10 e 15 minutos e na fase do estro aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o início do estresse em ratas não-manipuladas (Figura 14A). Em ratas manipuladas o estresse provocou aumento das concentrações plasmáticas de LH aos 2 minutos após o início do estresse somente na fase do proestro e aos 5 e 10 minutos após o início do estresse na fase do estro (Figura 14B). Além disso, ratas manipuladas na fase do proestro demonstraram uma menor resposta do LH ao estresse aos 2, 5 e 10 minutos (Figura 15B) e na fase do estro aos 5, 10 e 15 minutos após o início do estresse (Figura 15C) quando comparadas às ratas não-manipuladas no mesmo tempo e fase do ciclo estral. Durante as fases do proestro e estro aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o início do estresse, também foi observado uma maior resposta do LH ao estresse em ratas não-manipuladas quando comparadas ao mesmo grupo e tempo na fase do diestro (Figura 14A). Da mesma forma, ratas manipuladas nas fases do proestro e estro aos 2 minutos após o início do estresse e ratas manipuladas em estro aos 5 minutos após o início do estresse apresentaram uma maior resposta quando comparadas às ratas do mesmo grupo e tempo na fase do diestro (Figura 14B).

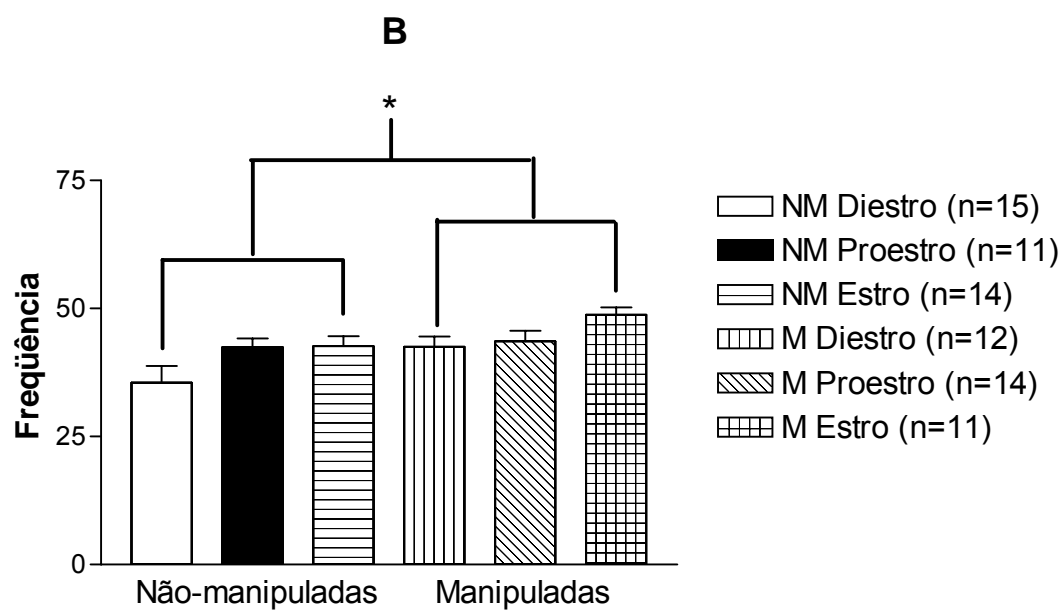
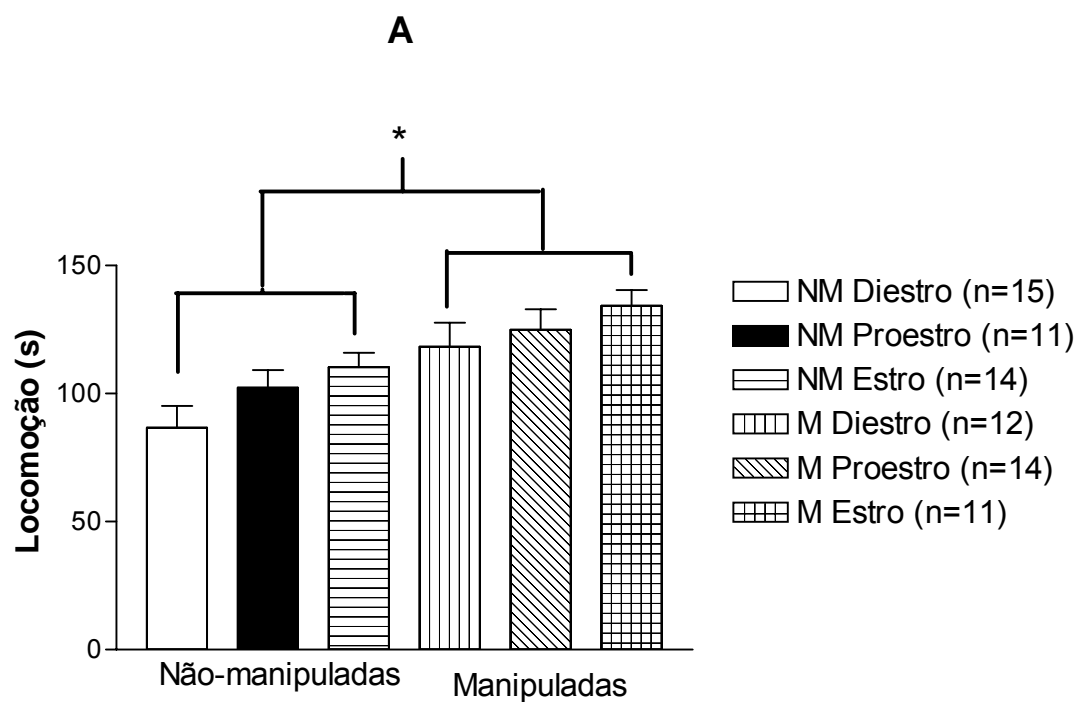


**Figura 6-** Efeito da manipulação neonatal sobre a freqüência (A) e duração de permanência nos quadrantes centrais (B) do campo aberto em ratos machos adultos. Não-manipulados (NM) e manipulados (M). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através do Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). \* diferente do grupo NM.

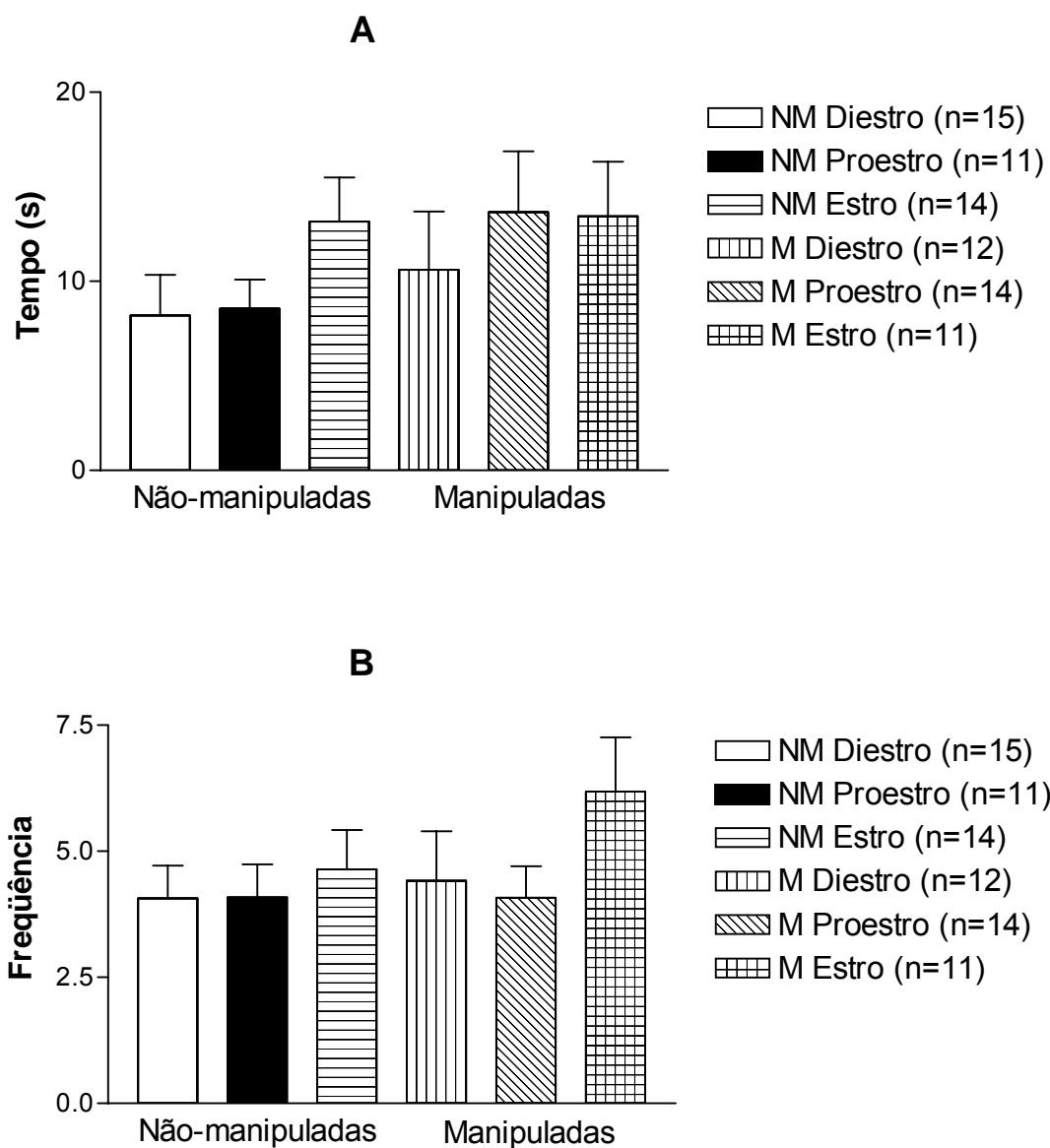


**Figura 7-** Efeito da manipulação neonatal sobre a frequência (A) e a duração de locomoção (B) no campo aberto em ratos machos adultos. Não-manipulados (NM) e manipulados (M). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através do Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

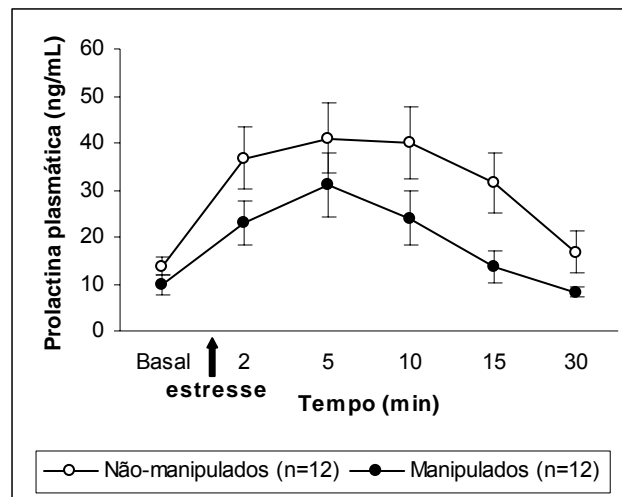




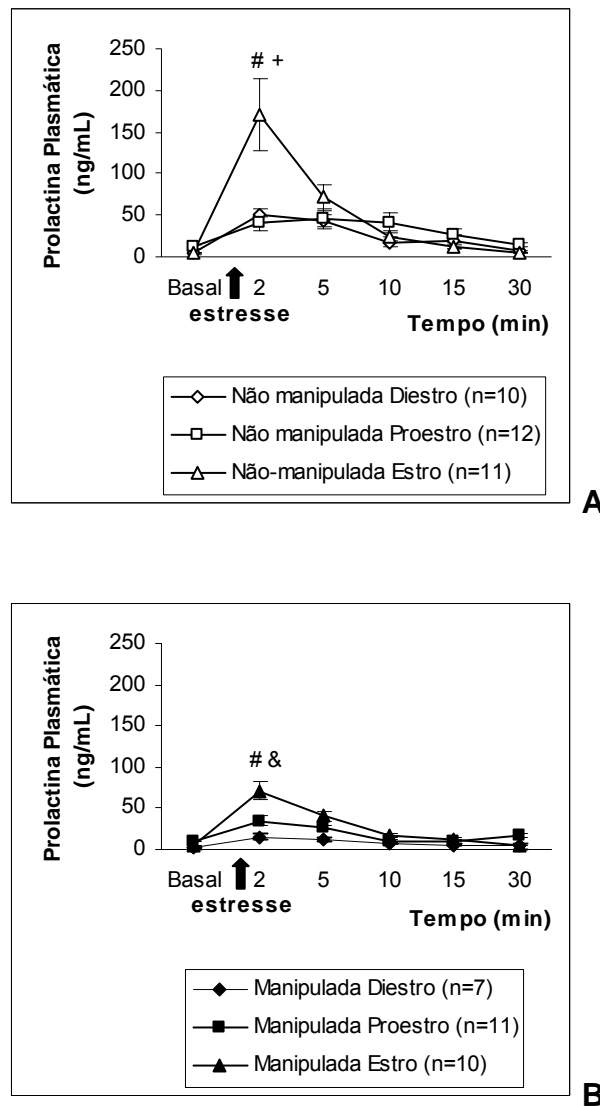
**Figura 8-** Duração (A) e frequência de locomoção (B) no campo aberto em ratas não-manipuladas (NM) e manipuladas (M) durante o ciclo estral (diestro, proestro e estro). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ) revelou diferenças significativas entre os grupos (\*) e as fases do ciclo estral.



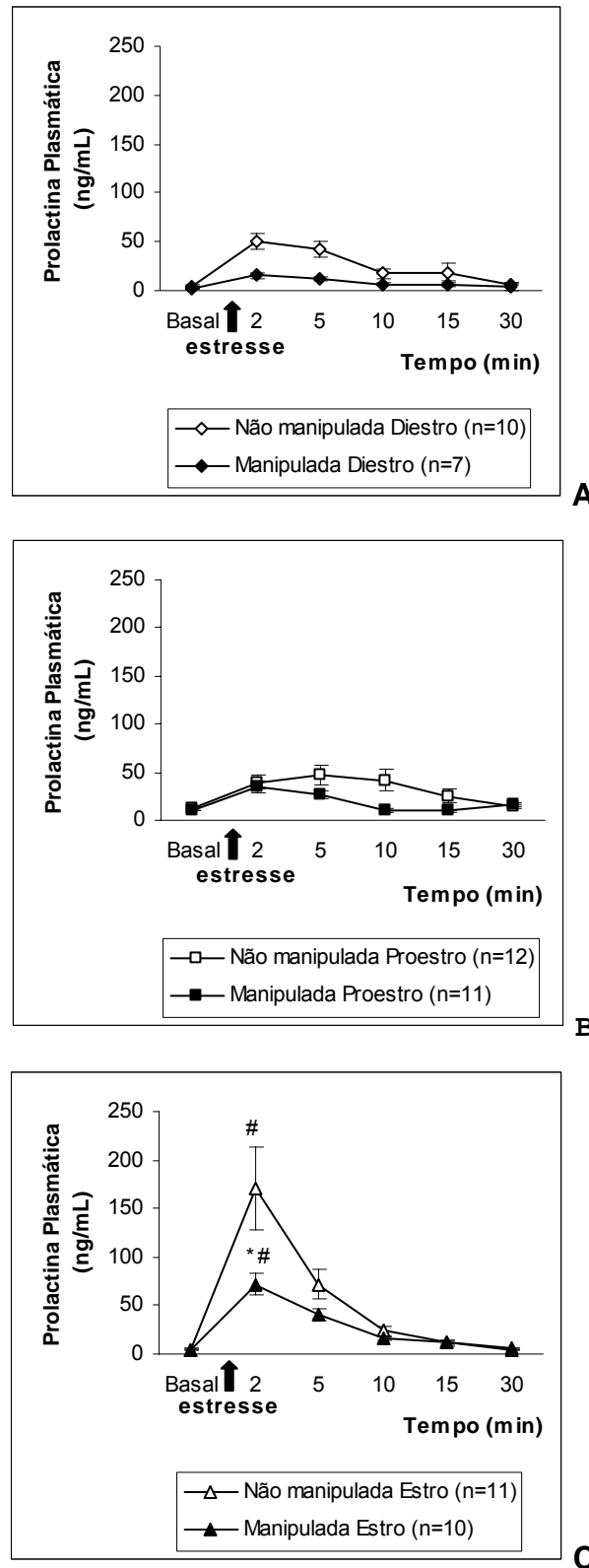
**Figura 9-** Frequência (A) e duração (B) de permanência nos quadrantes centrais do campo aberto em ratas não-manipuladas (NM) e manipuladas (M) durante o ciclo estral: diestro, proestro e estro. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas.



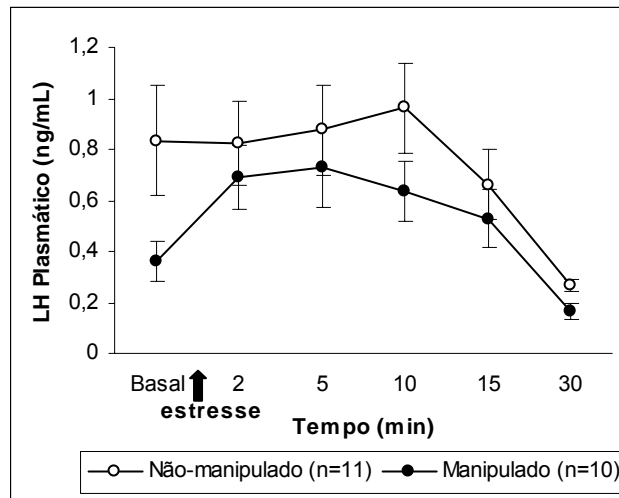
**Figura 10-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratos machos adultos não-manipulados e manipulados. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ) revelou efeito significativo do grupo e do estresse.



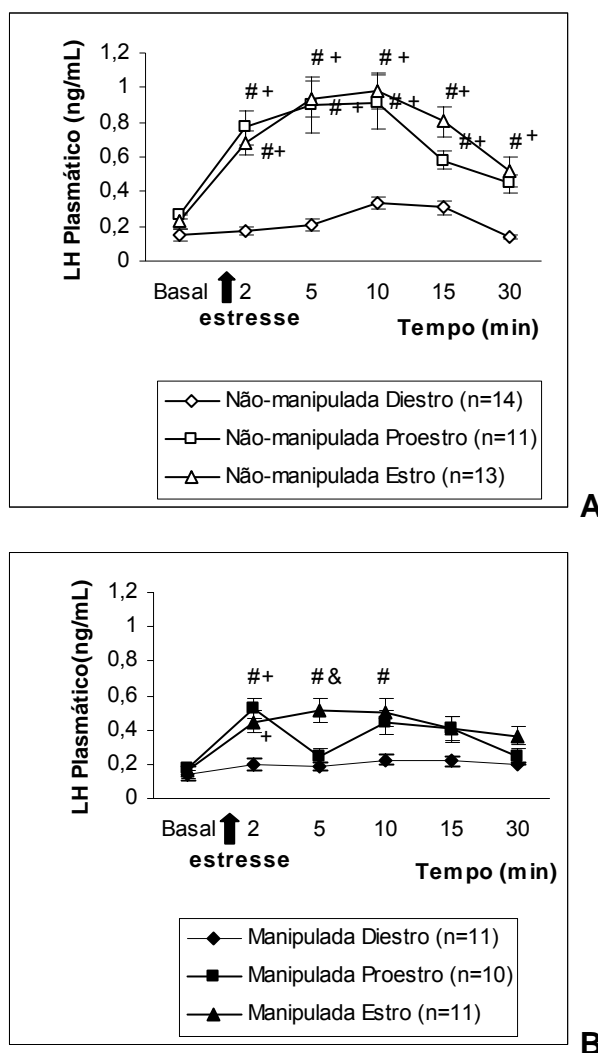
**Figura 11-** Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas (A) e manipuladas (B) durante as fases do ciclo estral: diestro, proestro e estro. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ): # - diferente das concentrações basais no mesmo grupo e fase do ciclo estral; + - diferente das fases do diestro e proestro no mesmo tempo; & - diferente da fase do diestro no mesmo tempo.



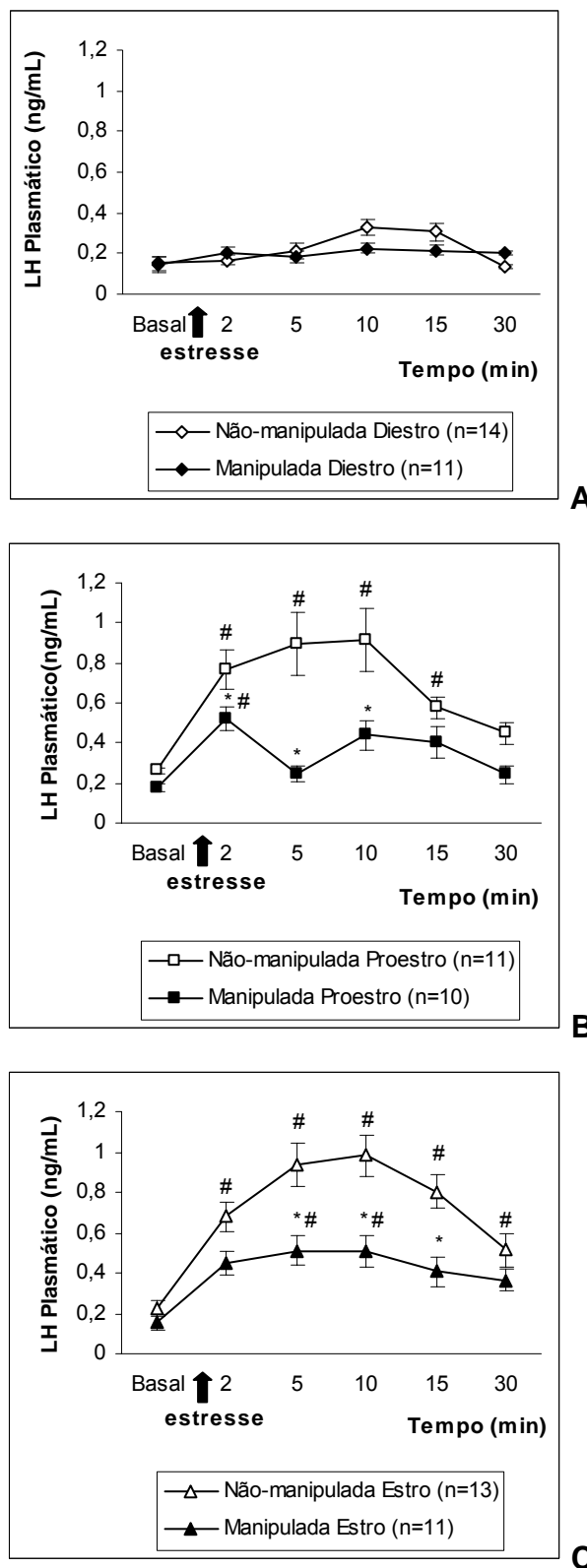
**Figura 12-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas (NM) e manipuladas (M) durante as fases do ciclo estral: diestro (A), proestro (B) e estro (C). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ): \*- diferente do grupo NM no mesmo tempo e fase do ciclo estral; #- diferente das concentrações basais no mesmo grupo e fase do ciclo estral.



**Figura 13-** Efeitos da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratos machos adultos não-manipulados e manipulados. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do grupo e do estresse.



**Figura 14-** Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas (A) e manipuladas (B) durante as fases do ciclo estral: diestro, proestro e estro. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou diferenças significativas. # - diferente das concentrações basais no mesmo grupo e fase do ciclo estral; + - diferente da fase do diestro no mesmo tempo; & - diferente da fase do estro no mesmo tempo.



**Figura 15-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas não-manipuladas (NM) e manipuladas (M) durante as fases do ciclo estral: diestro (A), proestro (B) e estro (C). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou diferenças significativas. # - diferente das concentrações basais no mesmo grupo e fase do ciclo estral; \* - diferente do grupo não-manipuladas nas mesmas fases e tempos.



## 5.2. Experimento 2

### 5.2.1. Efeito da manipulação neonatal e do estado hormonal sobre o comportamento no campo aberto em ratos machos

A figura 16 demonstra a duração (Figura 16A) e a frequência (Figura 16B) de locomoção no campo aberto em ratos machos adultos divididos em 6 grupos: não-manipulado gonadectomia fictícia, não-manipulado gonadectomia, não-manipulado gonadectomia + T, manipulado gonadectomia fictícia, manipulado gonadectomia e manipulado gonadectomia + T. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Com relação à duração de locomoção (Figura 16A) o efeito do grupo apresentou uma tendência a ser significativo [ $F(1,65)=2,639$ ,  $p=0,109$ ]. O efeito do tratamento hormonal [ $F(2,65)=9,353$ ,  $p < 0,05$ ] e a interação grupo X tratamento hormonal [ $F(2,65)=3,826$ ,  $p < 0,05$ ] foram estatisticamente significativos. O teste de Newman-Keuls revelou que ratos manipulados gonadectomizados apresentaram uma redução na duração total de locomoção no campo aberto quando comparados aos ratos manipulados gonadectomia fictícia. Da mesma forma, ratos manipulados gonadectomia + T também apresentaram uma redução da duração de locomoção quando comparados com ratos manipulados gonadectomia fictícia. Ratos não-manipulados gonadectomia + T apresentaram redução na duração de locomoção quando comparados aos ratos não-manipulados gonadectomia.

Com relação à frequência de locomoção no campo aberto (Figura 16B), tanto o efeito grupo [ $F(1,65)=0,753$ ] quanto o efeito tratamento hormonal [ $F(2,65)=1,522$ ] não apresentaram diferenças estatisticamente

significativas. Contudo, a interação entre esses fatores (grupo x tratamento hormonal) demonstrou ter uma tendência a ser significativa [F(2,65)=2,424, p=0,096].

A figura 17A demonstra a duração de permanência nos quadrantes centrais em ratos machos. A ANOVA de duas vias revelou que o efeito do grupo [F(1,65)=1,077] e do tratamento hormonal [F(2,65)=1,173] foram significativos. A interação (grupo x tratamento hormonal) [F(2,65)= 0,906] não apresentou diferença estatisticamente significativa.

A figura 17B demonstra a frequência de entrada nos quadrantes centrais em ratos machos. A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos do grupo [F(1,65)=0,296] e do tratamento hormonal [F(2,65)=2,184]. Contudo, a interação grupos x tratamento hormonal apresentou uma tendência a ser significativa [F(2,65)=2,402, p=0,098].

### **5.2.2. Efeito da manipulação neonatal e do estado hormonal sobre o comportamento no campo aberto em ratas fêmeas**

A figura 18 mostra a duração (Figura 18 A) e a frequência de locomoção (Figura 18B) em ratas adultas divididas em 6 grupos: não-manipulada ovariectomia fictícia, não-manipulada ovariectomia, não-manipulada ovariectomia + E2, manipulada ovariectomia fictícia, manipulada ovariectomia e manipulada ovariectomia + E2. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls (p<0,05). Com relação à duração de locomoção (18 A), o efeito do grupo não apresentou diferenças significativas [F(1,63)=0,102]. O efeito do tratamento hormonal [F(2,63)=3,209, p<0,05] e a interação grupo x

tratamento hormonal [ $F(2,63)=3,385$ ,  $p<0,05$ ] foram estatisticamente significativos. O teste de Newman-Keuls revelou que ratas manipuladas ovariectomizadas apresentaram uma redução na duração total de locomoção no campo aberto quando comparadas às ratas manipuladas ovariectomia fictícia. Com relação à frequência de locomoção (Figura 18B), tanto o efeito grupo [ $F(1,62)=0,042$ ] quanto o efeito tratamento hormonal [ $F(2,62)=0,514$ ] não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Contudo, a interação entre esses fatores (grupo x tratamento hormonal) foi estatisticamente diferente [ $F(2,62)=4,837$ ,  $p<0,05$ ].

A figura 19 representa a duração de permanência (Figura 19 A) e a frequência de entrada (Figura 19B) nos quadrantes centrais do campo aberto. A ANOVA de duas vias revelou que a duração de permanência nos quadrantes centrais não foi estatisticamente diferente entre os grupos [ $F(1,61)=1,655$ ] e na interação (grupo x tratamento hormonal) [ $F(2,61)=2,062$ ]. Contudo, o tratamento hormonal apresentou diferenças significativas [ $F(2,61)=3,236$ ,  $p<0,05$ ]. Ratas não-manipuladas e manipuladas ovariectomizadas tratadas com E2 apresentaram um aumento da duração de permanência no centro do campo aberto quando comparadas às ratas ovariectomizadas.

Com relação à frequência de entrada nos quadrantes centrais (Figura 19B), a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do grupo [ $F(1,61)=4,519$ ,  $p<0,05$ ] e na interação grupos x tratamento hormonal [ $F(2,61)=5,388$ ,  $p<0,05$ ]. O teste de Newman-Keuls indicou que ratas manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia apresentaram um aumento na frequência de entrada nos quadrantes centrais quando comparadas às

ratas não-manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia. Ratas manipuladas ovariectomizadas apresentaram uma redução da frequência de entrada nos quadrantes centrais quando comparadas às ratas manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia. O efeito do tratamento hormonal não foi estatisticamente diferente [ $F(2,61)=1,482$ ].

### **5.2.3. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta da PRL ao estresse por éter em ratos machos**

As figuras 20 e 21 representam as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratos não-manipulados gonadectomia fictícia, não-manipulados gonadectomia, não-manipulados gonadectomia + T, manipulados gonadectomia fictícia, manipulados gonadectomia e manipulados gonadectomia + T submetidos a 1 minuto de estresse por vapores de éter. O sangue foi coletado 2 minutos antes e aos 2, 5 e 15 minutos durante a aplicação do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p<0,05$ ). Os efeitos da manipulação, do tratamento hormonal e do estresse foram avaliados. O efeito da manipulação neonatal não foi estatisticamente significativo [ $F(1,61)=1,635$ ]. A reposição hormonal [ $F(2,61)=26,828$   $p<0,001$ ] e o estresse [ $F(3,183)=27,367$ ,  $p<0,001$ ] tiveram efeitos significativos sobre a concentração plasmática de PRL. A gonadectomia reduziu as concentrações plasmáticas de PRL quando comparada à gonadectomia fictícia e a gonadectomia + T. Da mesma forma, a gonadectomia + T provocou um aumento das concentrações plasmáticas de PRL quando comparada aos grupos gonadectomia fictícia e

gonadectomia. O estresse provocou um aumento das concentrações plasmáticas de PRL aos 2 e 5 minutos após a sua aplicação. As interações manipulação x tratamento hormonal [ $F(2,61)=5,266$ ,  $p<0,05$ ] e grupo x estresse [ $F(3,183)=3,754$ ,  $p<0,05$ ] foram estatisticamente significativas [ $F(3,81)=1,992$ ]. As interações tratamento hormonal X estresse [ $F(6,183)=1,881$ ] e manipulação x tratamento hormonal x estresse [ $F(6,183,81)=0,865$ ] não foram estatisticamente significativas.

#### **5.2.4. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta da PRL ao estresse por éter em ratas fêmeas**

As figuras 22 e 23 representam as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratas não-manipuladas ovariectomia fictícia, não-manipuladas ovariectomia, não-manipuladas ovariectomia + E2, manipuladas ovariectomia fictícia, manipuladas ovariectomia e manipuladas ovariectomia + E2 submetidas a 1 minuto de estresse por vapores de éter. O sangue foi coletado antes (basal) e aos 2, 5 e 15 minutos durante a aplicação do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p<0,05$ ). Os efeitos da manipulação, do tratamento hormonal e do estresse foram avaliados. O efeito da manipulação neonatal não foi estatisticamente significativo [ $F(1,56)=2,298$ ]. A reposição hormonal [ $F(2,56)=223,917$ ,  $p<0,001$ ], o estresse [ $F(3,168)=5,175$ ,  $p<0,001$ ], a interação tratamento hormonal x estresse [ $F(6,168)=4,844$ ,  $p<0,001$ ] e a interação entre os três fatores (manipulação x tratamento hormonal x estresse) [ $F(6,168)=3,932$ ,  $p<0,001$ ] tiveram efeitos significativos sobre a concentração plasmática de

PRL. Ratas manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia apresentaram uma menor concentração plasmática de PRL aos 2 minutos após o estresse quando comparadas às ratas não-manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia. A ovariectomia + E2 aumentou as concentrações plasmáticas de PRL quando comparada à ovariectomia fictícia e à ovariectomia. O estresse provocou um aumento das concentrações plasmáticas de PRL aos 2 e 5 minutos após a aplicação do mesmo em ratas não-manipuladas ovariectomizadas e em ratas não-manipuladas que sofreram ovariectomia fictícia. O estresse provocou uma redução das concentrações plasmáticas de PRL aos 2, 5 e 15 minutos após a sua aplicação em ratas não-manipuladas ovariectomizadas tratadas com E2. Ratas ovariectomizadas tratadas com E2 apresentaram aumentos das concentrações plasmáticas de PRL em todos os tempos estudados quando comparadas às ratas ovariectomia fictícia e ovariectomizadas. As interações manipulação X tratamento hormonal [ $F(2,56)=2,144$ ], manipulação x estresse [ $F(3,168)=0,398$ ] e manipulação x tratamento hormonal x estresse [ $F(6,168)=0,590$ ] não foram estatisticamente significativas.

#### **5.2.5. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta do LH ao estresse por éter em ratos machos**

As figuras 24 e 25 representam as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em ratos não-manipulados gonadectomia fictícia, não-manipulados gonadectomia, não-manipulados gonadectomia + T, manipulados gonadectomia fictícia, manipulados gonadectomia e manipulados gonadectomia + T submetidos a 1 minuto de estresse por vapores de éter.

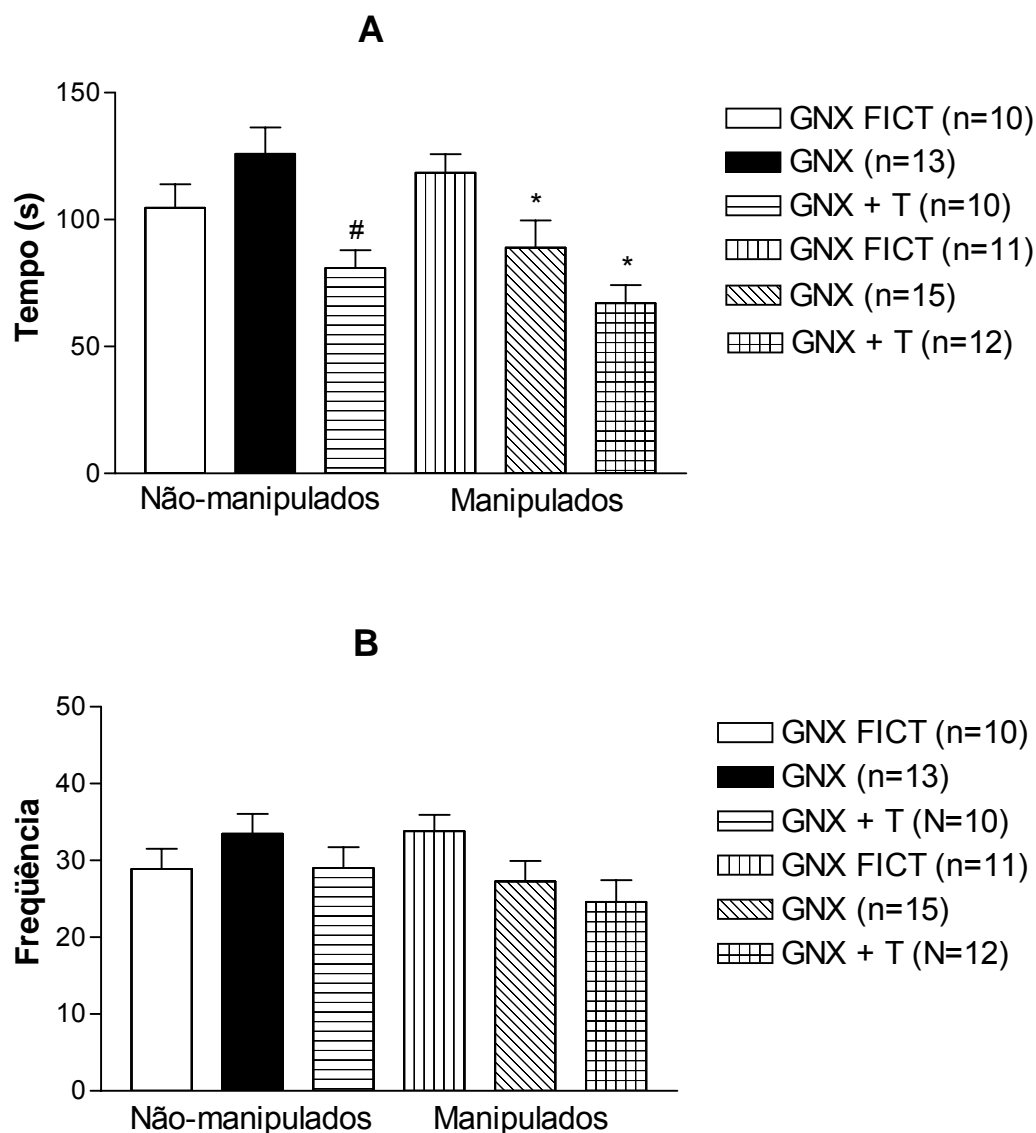
O sangue foi coletado antes (basal) e aos 2, 5 e 15 minutos durante a aplicação do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos da manipulação, do tratamento hormonal e do estresse foram avaliados. A reposição hormonal [ $F(2,52)=146,889$   $p < 0,001$ ] e o estresse [ $F(3,156)=5,133$ ,  $p < 0,001$ ] tiveram efeitos significativos sobre a concentração plasmática de LH. O efeito isolado da manipulação neonatal não apresentou efeito significativo [ $F(1,51)=1,190$ ]. A gonadectomia aumentou as concentrações plasmáticas de LH quando comparada à gonadectomia fictícia e a gonadectomia + T. Da mesma forma, a gonadectomia + T provocou um aumento das concentrações plasmáticas de LH quando comparada ao grupo gonadectomia fictícia. O estresse provocou uma redução das concentrações plasmáticas de LH aos 15 minutos após a sua aplicação quando comparado aos tempos basal, 2 e 5 minutos no grupo GNX + T. As interações manipulação x tratamento hormonal [ $F(2,52)=9,504$ ,  $p < 0,001$ ] e tratamento hormonal x estresse [ $F(6,156)=3,242$ ,  $p < 0,01$ ] foram estatisticamente significativas. As interações manipulação x estresse [ $F(3,156)=0,619$ ] e manipulação x tratamento hormonal x estresse [ $F(6,156)=1,046$ ] não foram estatisticamente significativas.

#### **5.2.6. Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a resposta do LH ao estresse por éter em ratas fêmeas**

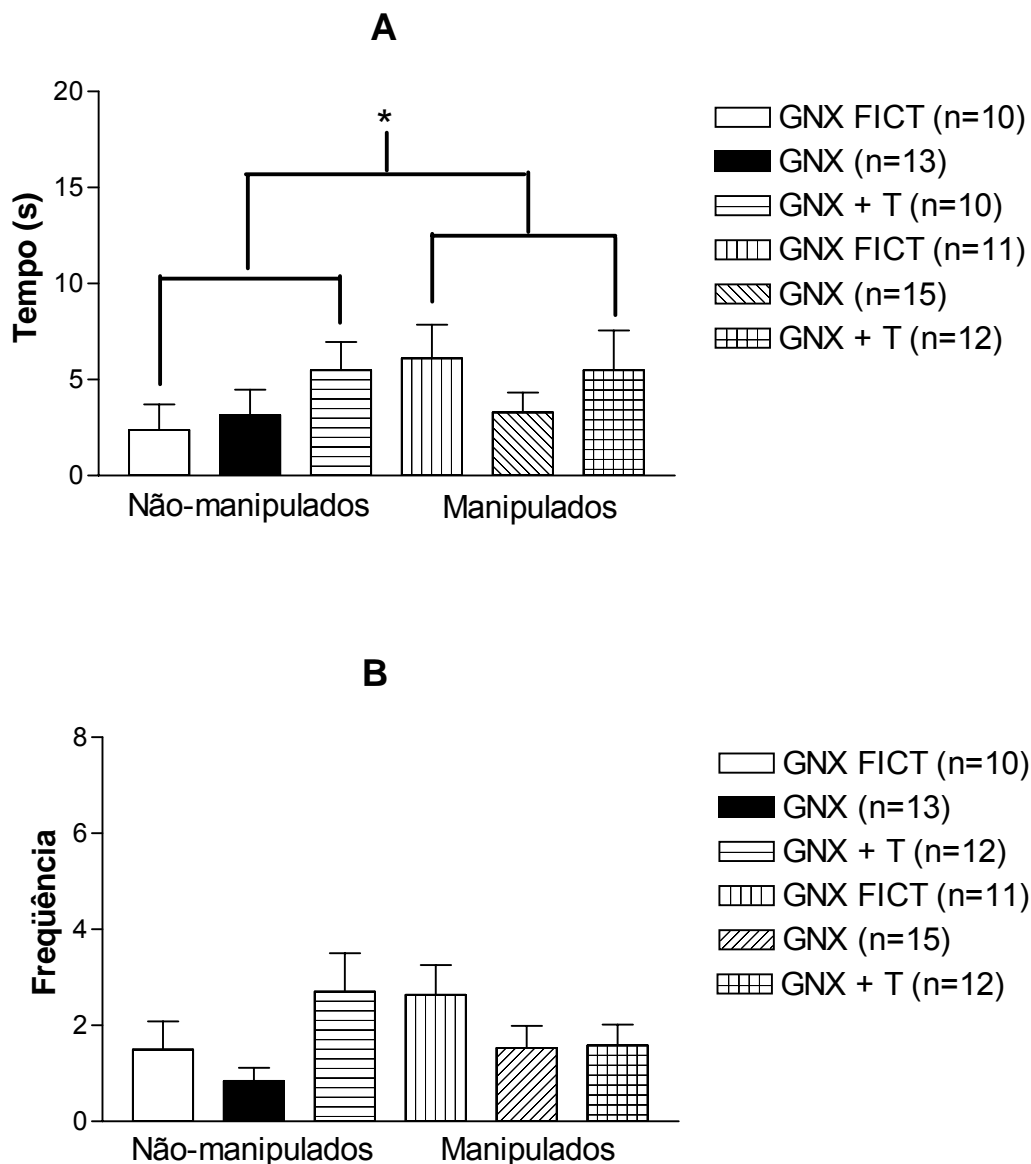
As figuras 26 e 27 representam as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em ratas não-manipuladas ovariectomia fictícia, não-manipuladas ovariectomia, não-manipuladas ovariectomia + E2, manipuladas

ovariectomia fictícia, manipuladas ovariectomia e manipuladas ovariectomia + E2 submetidas a 1 minuto de estresse por vapores de éter. O sangue foi coletado antes (basal) e aos 2, 5 e 15 minutos durante a aplicação do estresse. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias de medidas repetidas para o estresse, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos da manipulação, do tratamento hormonal e do estresse foram avaliados. O efeito da manipulação neonatal [ $F(1,47)=0,514$ ] e a interação entre os três fatores [ $F(6,141)=0,801$ ] não foram estatisticamente significativos. O tratamento hormonal [ $F(2,47)=132,312$ ,  $p < 0,001$ ] e o estresse [ $F(3,141)=3,351$ ,  $p < 0,05$ ] apresentaram efeitos significativos sobre a concentração plasmática de LH. A ovariectomia aumentou as concentrações plasmáticas de LH quando comparada à ovariectomia fictícia e a ovariectomia + E2. De outro modo, a ovariectomia seguida de reposição com E2 diminuiu as concentrações plasmáticas de LH quando comparada à ovariectomia fictícia e a ovariectomia. O estresse promoveu um aumento das concentrações plasmáticas de LH aos 2 e 5 minutos após a aplicação do mesmo. As interações manipulação x tratamento hormonal [ $F(2,47)=1,111$ ], manipulação x estresse [ $F(3,141)=0,972$ ], tratamento hormonal x estresse [ $F(6,141)=1,662$ ].

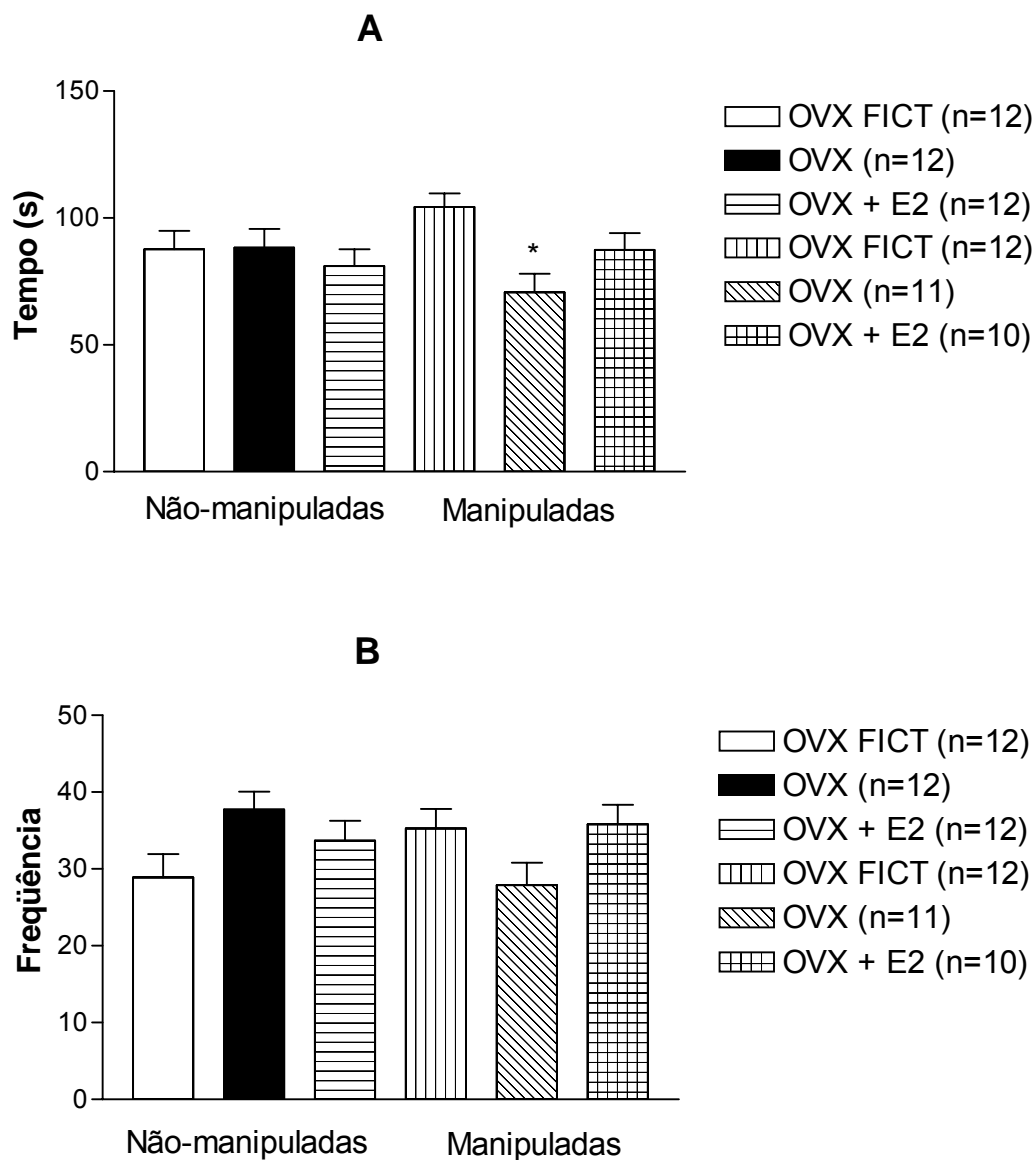




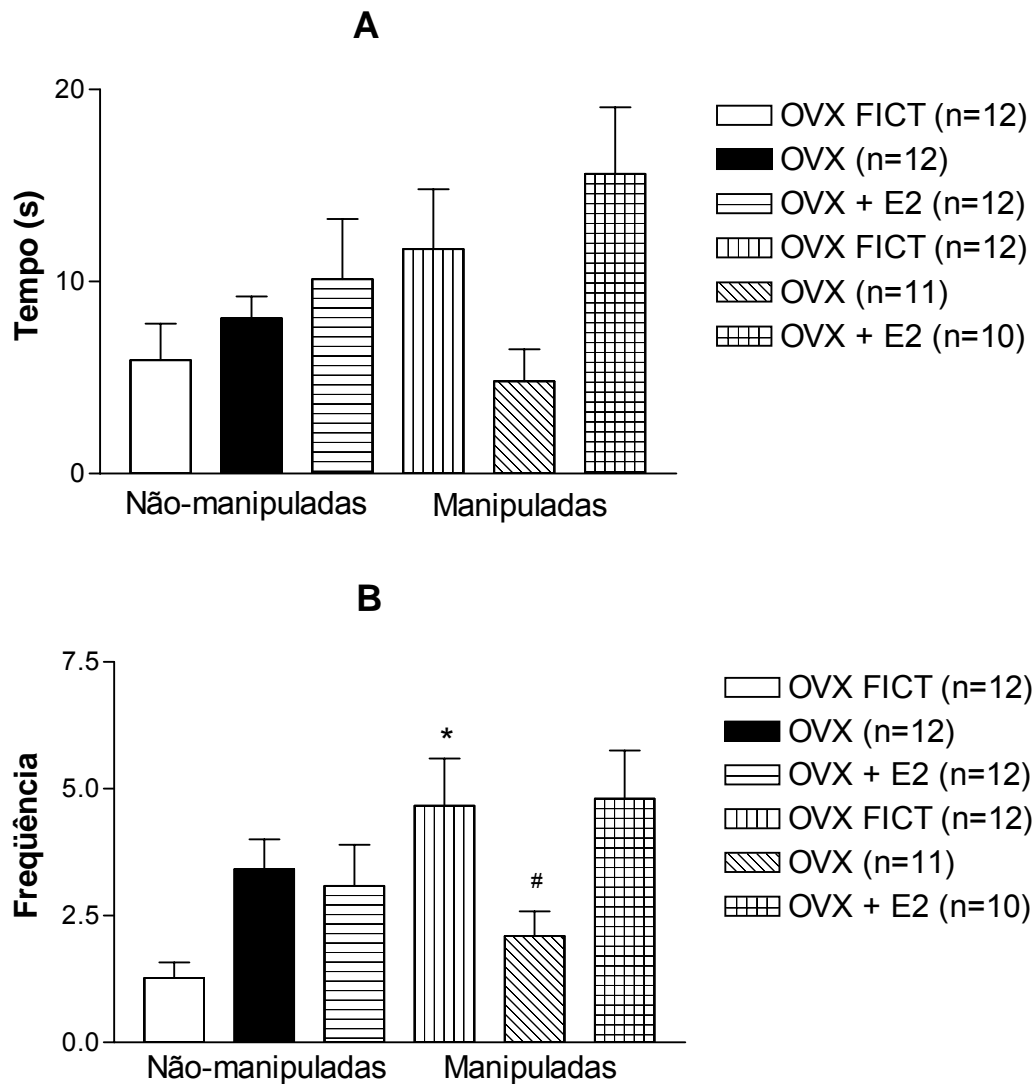
**Figura 16-** Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração (A) e a frequência (B) de locomoção no campo aberto em ratos machos. Grupos: Não-manipulado gonadectomia fictícia (NM GNX FICT), não-manipulado gonadectomia (NM GNX), não-manipulado gonadectomia + T (NM GNX + T), manipulado gonadectomia fictícia (M GNX FICT), manipulado gonadectomia (M GNX) e manipulado gonadectomia + T (M GNX + T). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). \*- Diferente do grupo manipulado gonadectomia fictícia; # diferente do grupo não-manipulado gonadectomia. A interação grupo x tratamento hormonal apresentou tendência a ser significativa na frequência de locomoção ( $p = 0,096$ ).



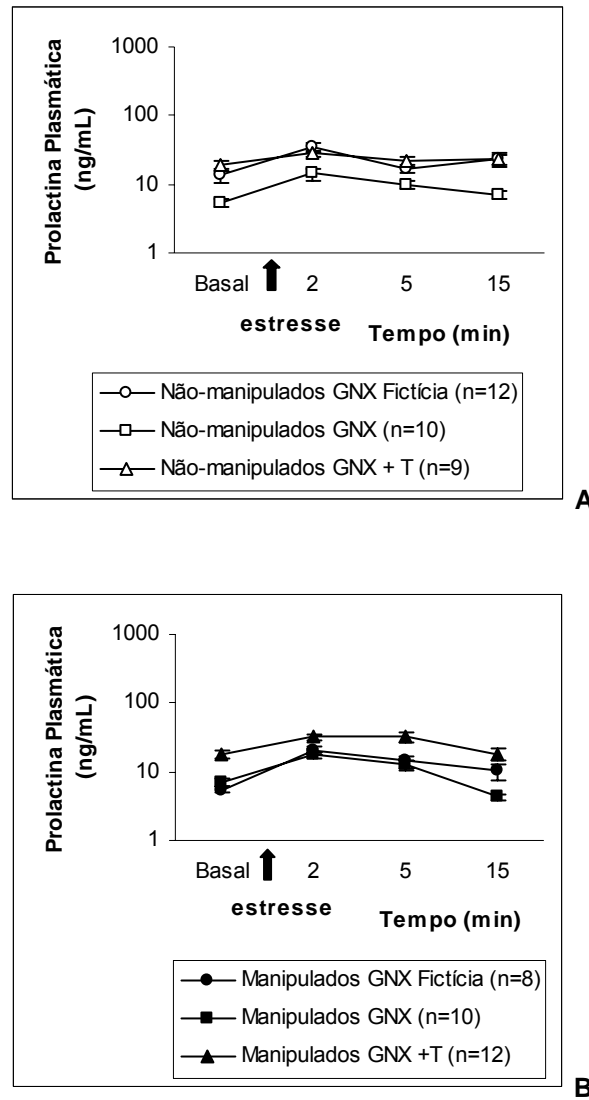
**Figura 17-** Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração de permanência (A) e a frequência de entrada (B) nos quadrantes centrais do campo aberto em ratos machos. Grupos: Não-manipulado gonadectomia fictícia (NM GNX FICT), não-manipulado gonadectomia (NM GNX), não-manipulado gonadectomia + T (NM GNX + T), manipulado gonadectomia fictícia (M GNX FICT), manipulado gonadectomia (M GNX) e manipulado gonadectomia + T (M GNX + T). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). Os efeitos do grupo (\*) e do tratamento hormonal foram significativos na duração de permanência nos quadrantes centrais. A interação grupo x tratamento hormonal apresentou tendência a ser significativa na frequência de entrada nos quadrantes centrais ( $p = 0,098$ ).



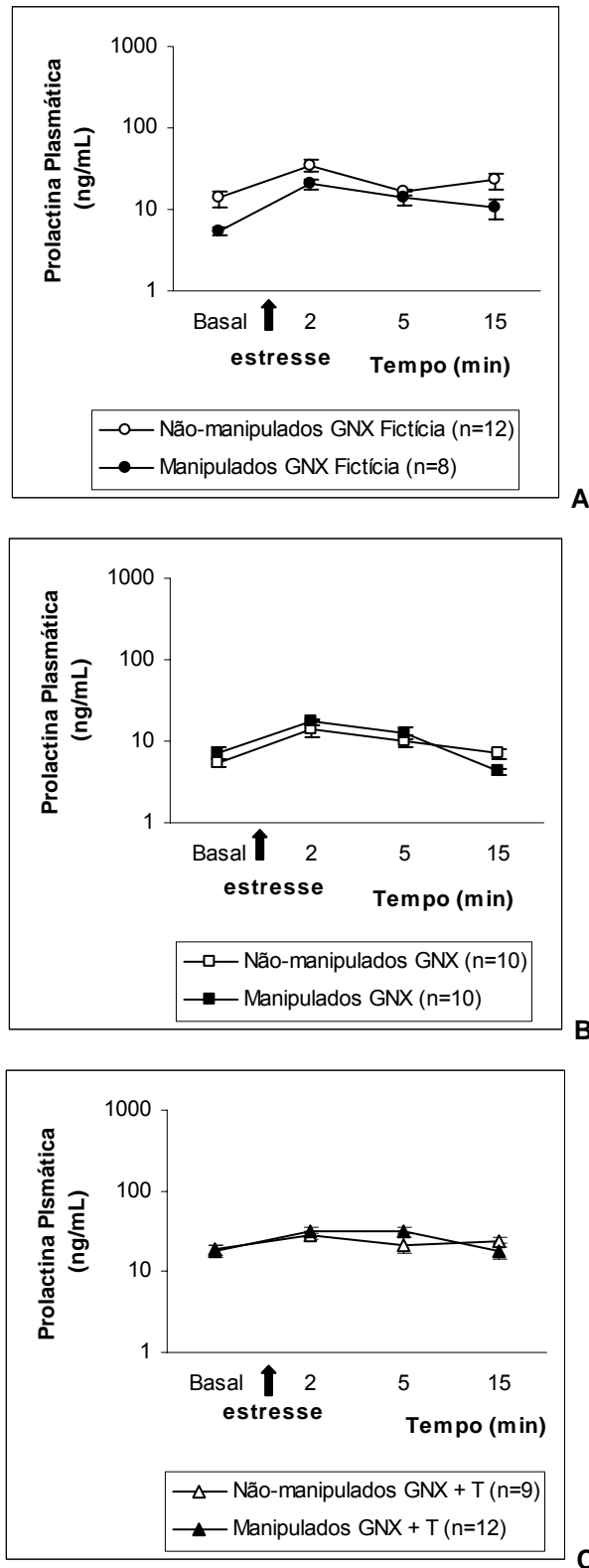
**Figura 18-** Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração (A) e a frequência de locomoção (B) no campo aberto em ratas. Grupos: Não-manipulada ovariectomia fictícia (NM OVX FICT), não-manipulada ovariectomia (NM OVX), não-manipulada ovariectomia + E2 (NM OVX + E2), manipulada ovariectomia fictícia (M OVX FICT), manipulada ovariectomia (M OVX) e manipulada ovariectomia + E2 (M OVX + E2). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). \*-Diferente do grupo manipulada ovariectomia fictícia. A duração de locomoção apresentou efeito significativo do tratamento hormonal. A interação grupo x tratamento hormonal foi significativa na frequência de locomoção.



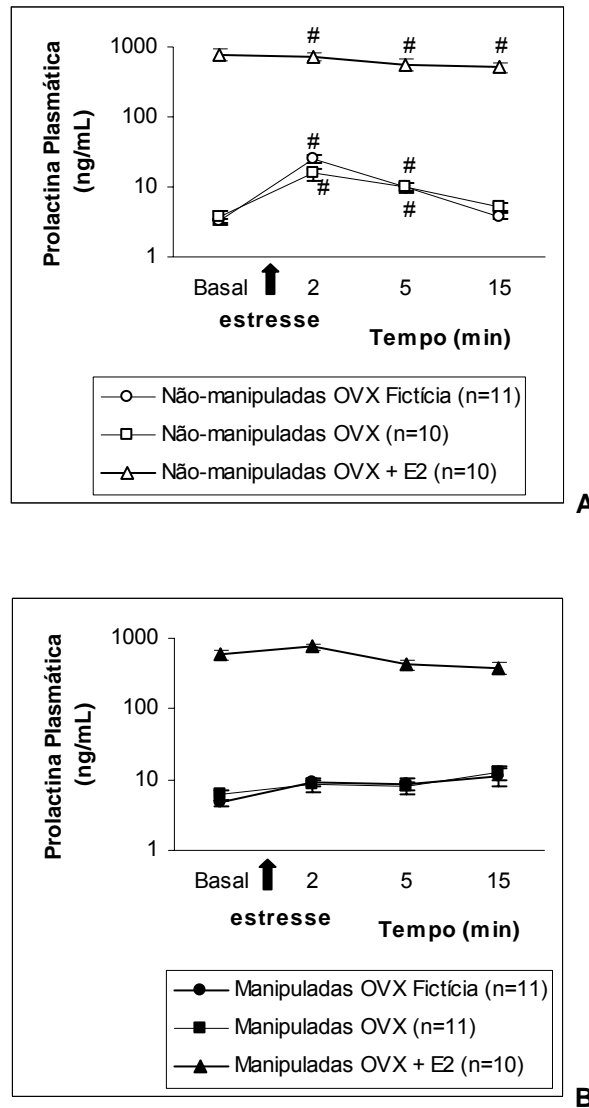
**Figura 19-** Efeito da manipulação neonatal e do tratamento hormonal sobre a duração de permanência (A) e a frequência de entrada (B) nos quadrantes centrais do campo aberto em ratas. Grupos: não-manipulada ovariectomia fictícia (NM OVX FICT), não-manipulada ovariectomia (NM OVX), não-manipulada ovariectomia + E2 (NM OVX + E2), manipulada ovariectomia fictícia (M OVX FICT), manipulada ovariectomia (M OVX) e manipulada ovariectomia + E2 (M OVX + E2). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). \*- diferente do grupo NM OVX FICT; #- diferente do grupo M OVX FICT. O efeito do grupo foi estatisticamente significativo na frequência de entrada nos quadrantes centrais. O tratamento hormonal foi estatisticamente diferente na duração de permanência nos quadrantes centrais.



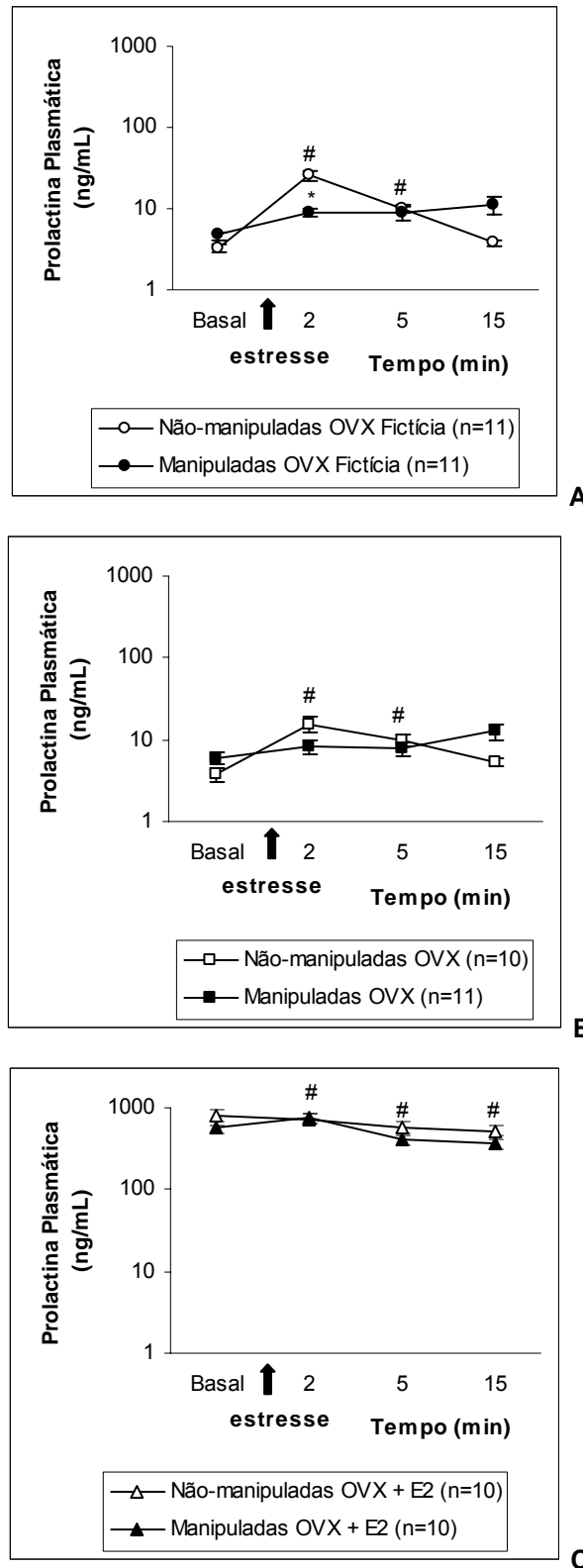
**Figura 20-** Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados (A) e manipulados (B) submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona (T). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de PRL (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal e do estresse.



**Figura 21-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados e manipulados submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia (A), gonadectomia (B) e gonadectomia + testosterona (C). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de PRL (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo nas interações manipulação x tratamento hormonal e manipulação x estresse.

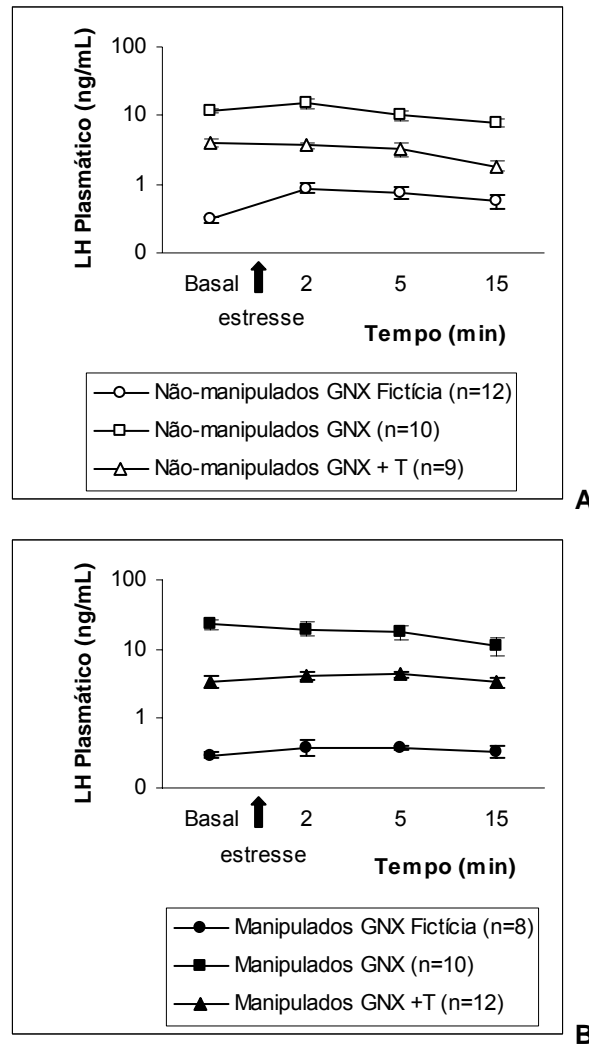


**Figura 22-** Concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas (A) e manipuladas (B) submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol (E2). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de PRL (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal e do estresse. # diferente da concentração plasmática de prolactina basal nos mesmos grupos.

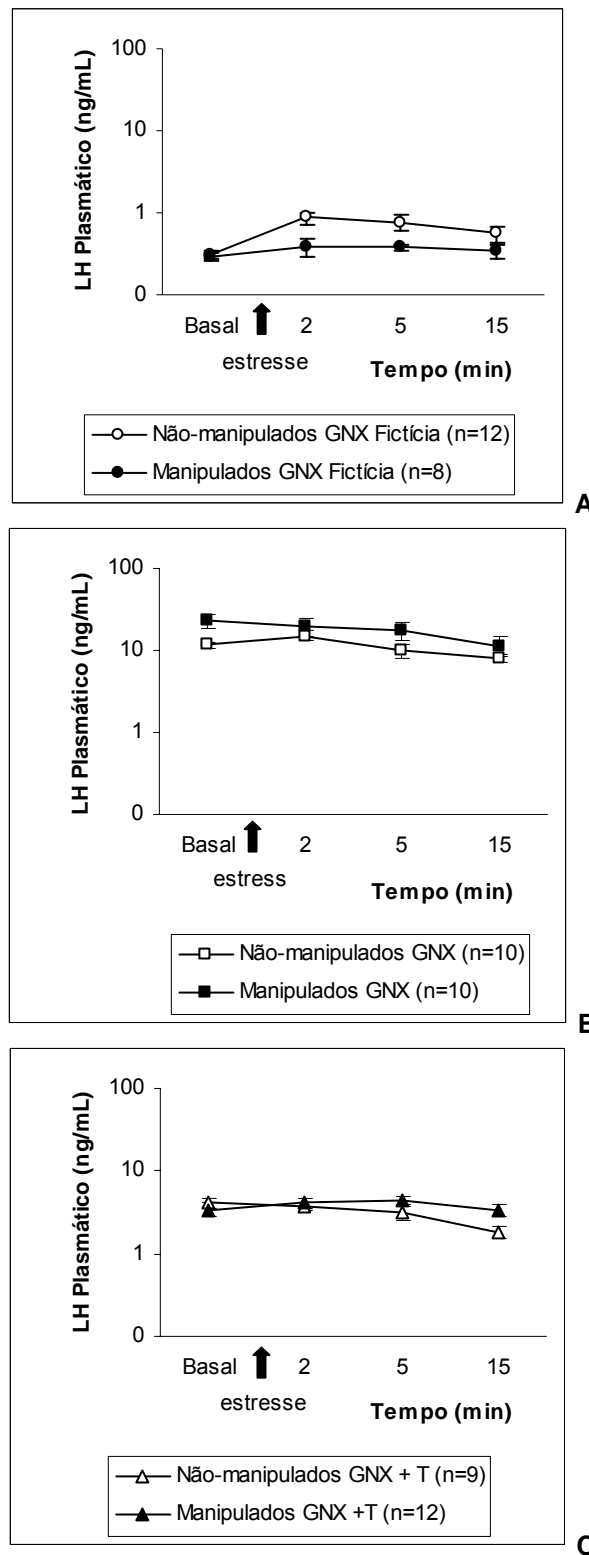


**Figura 23-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia (A), ovariectomia (B) e ovariectomia + estradiol (C). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de PRL (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal, do estresse e da interação tratamento hormonal x estresse. # diferente da concentração plasmática de prolactina basal no mesmo grupo; \* diferente do grupo não-manipulada no mesmo tempo.

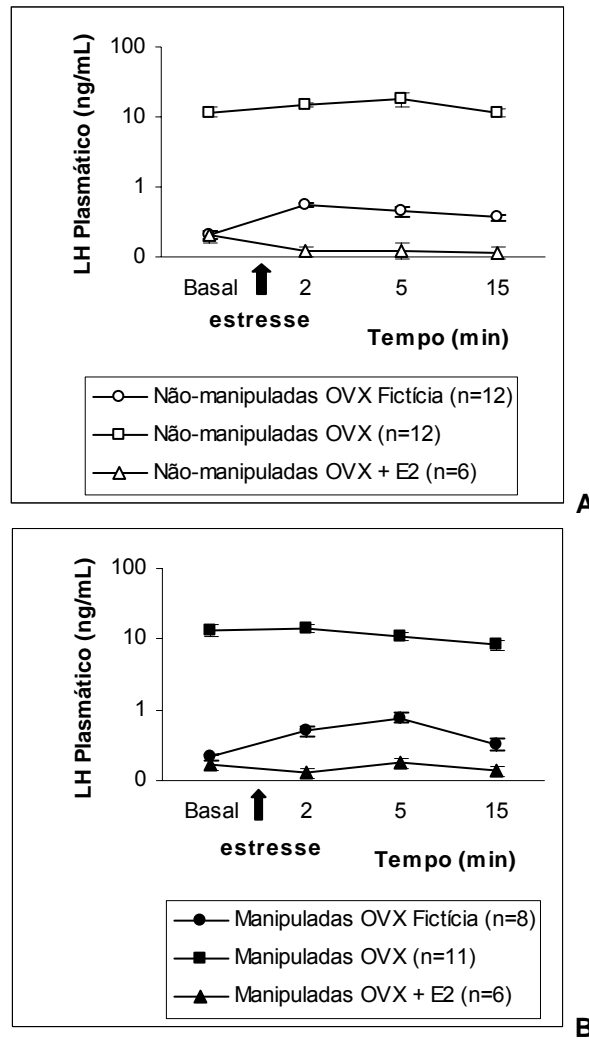




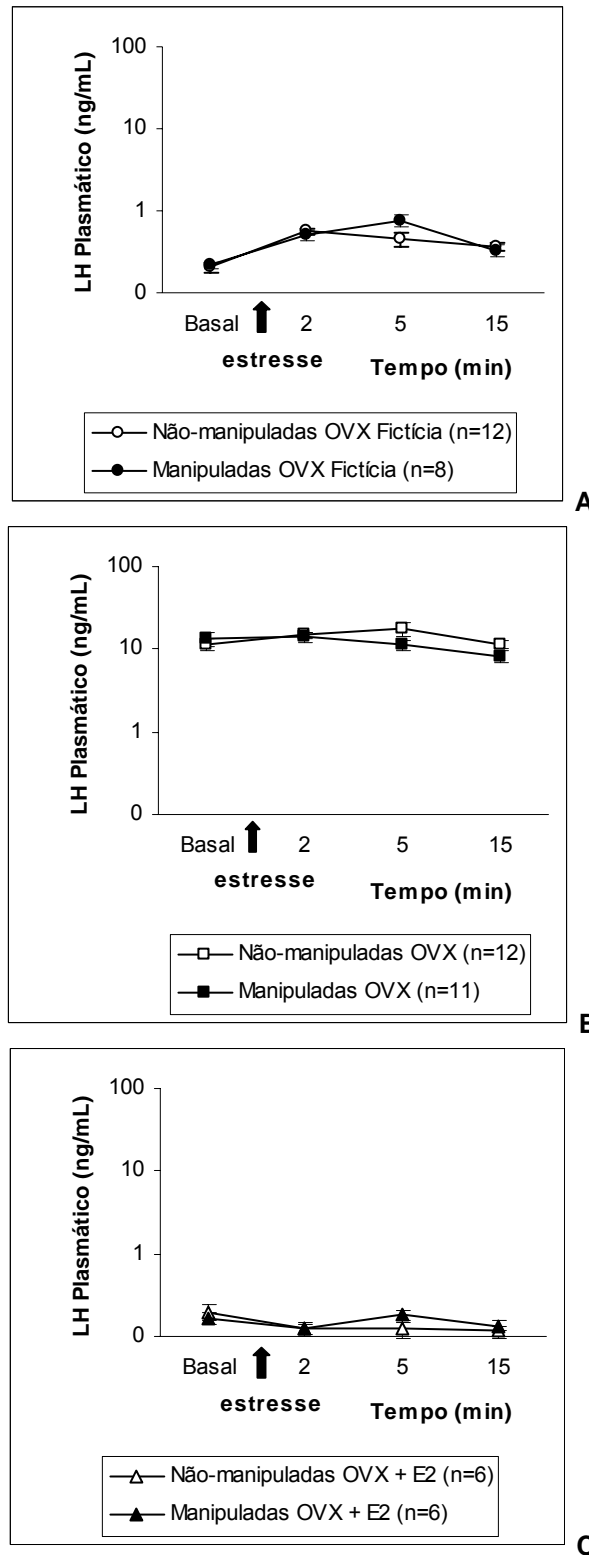
**Figura 24-** Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados (A) e manipulados (B) submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia, gonadectomia e gonadectomia + testosterona (T). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de LH (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal, do estresse, da interação manipulação x tratamento hormonal e do tratamento hormonal x estresse.



**Figura 25-** Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratos adultos não-manipulados e manipulados submetidos às cirurgias de gonadectomia (GNX) fictícia (A), gonadectomia (B) e gonadectomia + testosterona (C). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de LH (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal, do estresse, da interação manipulação x tratamento hormonal e do tratamento hormonal x estresse.



**Figura 26-** Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas (A) e manipuladas (B) submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia, ovariectomia e ovariectomia + estradiol (E2). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de LH (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal e do estresse.



**Figura 27-** Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) em resposta ao estresse por éter em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas às cirurgias de ovariectomia (OVX) fictícia (A), ovariectomia (B) e ovariectomia + estradiol (C). O eixo das ordenadas, que corresponde à concentração plasmática de LH (ng/mL), está em escala logarítmica. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. A ANOVA de três vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) revelou efeito significativo do tratamento hormonal e do estresse.

### 5.3. Experimento 3

#### 5.3.1. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos

A figura 28 representa as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratos machos adultos não-manipulados e manipulados submetidos a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo e do estresse (antes e depois) e a interação grupo x estresse foram analisados. Os efeitos do estresse [ $F(1,19)=3,478$ ,  $p < 0,05$ ] e a interação grupo x estresse [ $F(1,19)=4,028$ ,  $p < 0,05$ ] foram estatisticamente significativos. O efeito isolado do grupo não foi estatisticamente significativo, embora tenha existido uma tendência [ $F(1,19)=3,478$ ,  $p=0,07$ ]. Somente ratos não-manipulados apresentaram um aumento significativo das concentrações plasmáticas de PRL após o estresse. Ratos manipulados apresentaram concentrações plasmáticas pós-estresse menores do que ratos não-manipulados.

#### 5.3.2. Efeito da manipulação neonatal sobre o conteúdo de NA, MHPG e MHPG/NA no PVN em resposta ao estresse em ratos machos

A figura 29 representa o conteúdo de NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (A), MHPG (pg/ $\mu$ g de proteína) (B) e MHPG/NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (C) no PVN em ratos machos adultos não-manipulados e manipulados submetidos a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Com relação ao conteúdo de NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (Figura 29A), os efeitos do grupo e do estresse (antes e

depois) e a interação grupo x estresse foram analisados. Os efeitos do grupo [F(1,27)=0,427] e a interação grupo x estresse [F(1,27)=0,321] não foram significativos. O efeito do estresse teve uma tendência a ser significativo [F(1,27)=0,07]. A figura 29B representa o conteúdo de MHPG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) no PVN. Apenas o efeito do estresse foi estatisticamente significativo [F(1,25)=7,066,  $p<0,05$ ]. Os efeitos do grupo [F(1,25)=0,031] e a interação grupo x estresse [F(1,25)=0,160] não foram significativos. A figura 29C representa a razão MHPG/NA ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) no PVN. Nenhum dos efeitos analisados foram estatisticamente significativos. Grupo: [F(1,26)=0,001]; estresse: [F(1,26)=2,381] e grupo x estresse: [F(1,26)=0,971].

### **5.3.3. Efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratas fêmeas**

A figura 30 representa as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratas fêmeas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p<0,05$ ). Os efeitos do grupo e do estresse (antes e depois) foram analisados. Os efeitos do estresse [F(1,31)=4,587,  $p<0,05$ ] e a interação grupo x estresse [F(1,31)=4,025,  $p<0,05$ ] foram estatisticamente significativos. Somente ratas não-manipuladas apresentaram um aumento significativo das concentrações plasmáticas de PRL após o estresse. Ratas manipuladas apresentaram concentrações plasmáticas pós-estresse menores do que ratas não-manipuladas.

#### **5.3.4. Efeito da manipulação neonatal sobre o conteúdo de NA, MHPG e MHPG/NA no PVN em resposta ao estresse em ratas fêmeas**

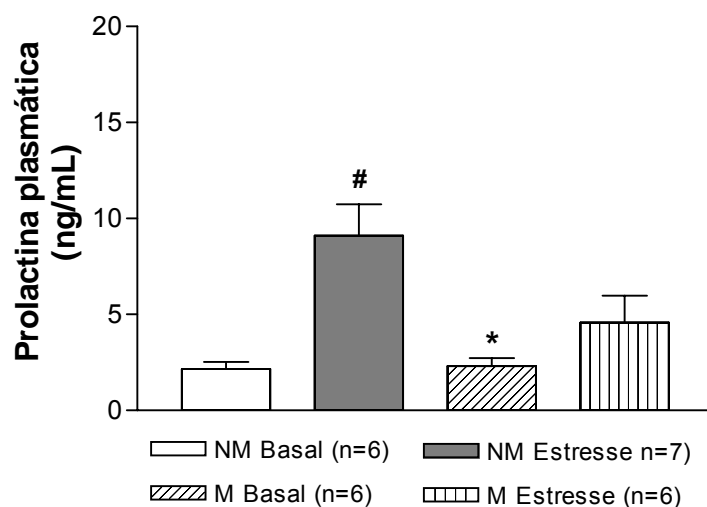
A figura 31 representa o conteúdo de NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (A), MHPG (pg/ $\mu$ g de proteína) (B) e a razão MHPG/NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (C) no PVN em ratas fêmeas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo e do estresse (antes e depois) e a interação grupo x estresse foram analisados. Com relação ao conteúdo de NA (pg/ $\mu$ g de proteína) (Figura 31A), apenas o efeito do grupo foi estatisticamente significativo [ $F(1,35)=4,161$ ,  $p < 0,05$ ]. Os efeitos do estresse [ $F(1,35)=0,309$ ] e a interação grupo x estresse [ $F(1,35)=0,013$ ] não foram significativos.

A figura 31B representa o conteúdo de MHPG (pg/ $\mu$ g de proteína) no PVN em ratas fêmeas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo e do estresse (antes e depois) e a interação grupo x estresse foram analisados. Apenas o efeito do estresse foi estatisticamente significativo [ $F(1,33)=13,929$ ,  $p < 0,05$ ]. Os efeitos do grupo [ $F(1,33)=2,228$ ] e a interação grupo x estresse [ $F(1,33)=1,052$ ] não foram significativos.

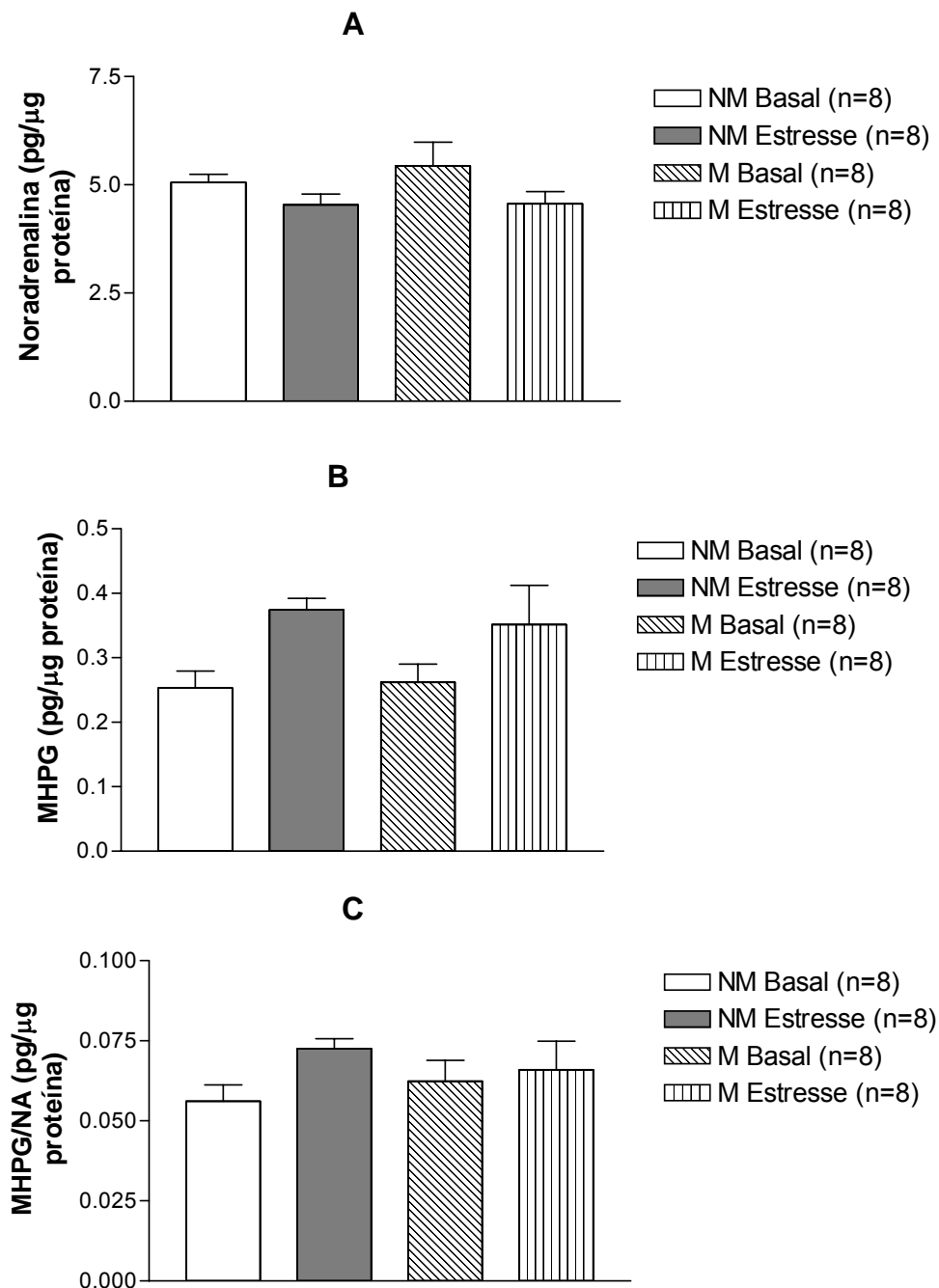
A figura 31C representa a razão de NA / MHPG (pg/ $\mu$ g de proteína) no PVN em ratas fêmeas adultas não-manipuladas e manipuladas submetidas a 1 minuto de estresse por contenção. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do grupo e do estresse (antes e depois) e a interação grupo x estresse foram analisados.

Os efeitos do estresse [ $F(1,33)=16,845$ ,  $p<0,05$ ] e a interação grupo x estresse [ $F(1,33)=4,994$ ,  $p<0,05$ ] foram estatisticamente significativos. Apenas ratas não-manipuladas apresentaram um aumento da razão MHPG/NA após a aplicação do estresse. O efeito isolado do grupo não teve significância estatística [ $F(1,33)=0,089$ ].

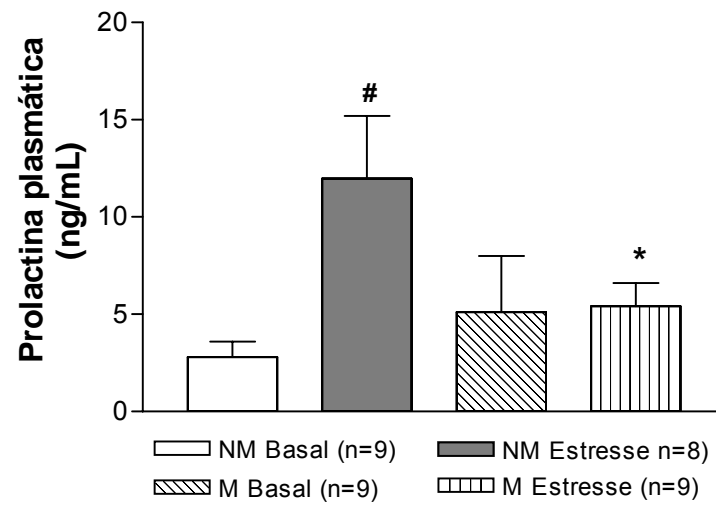




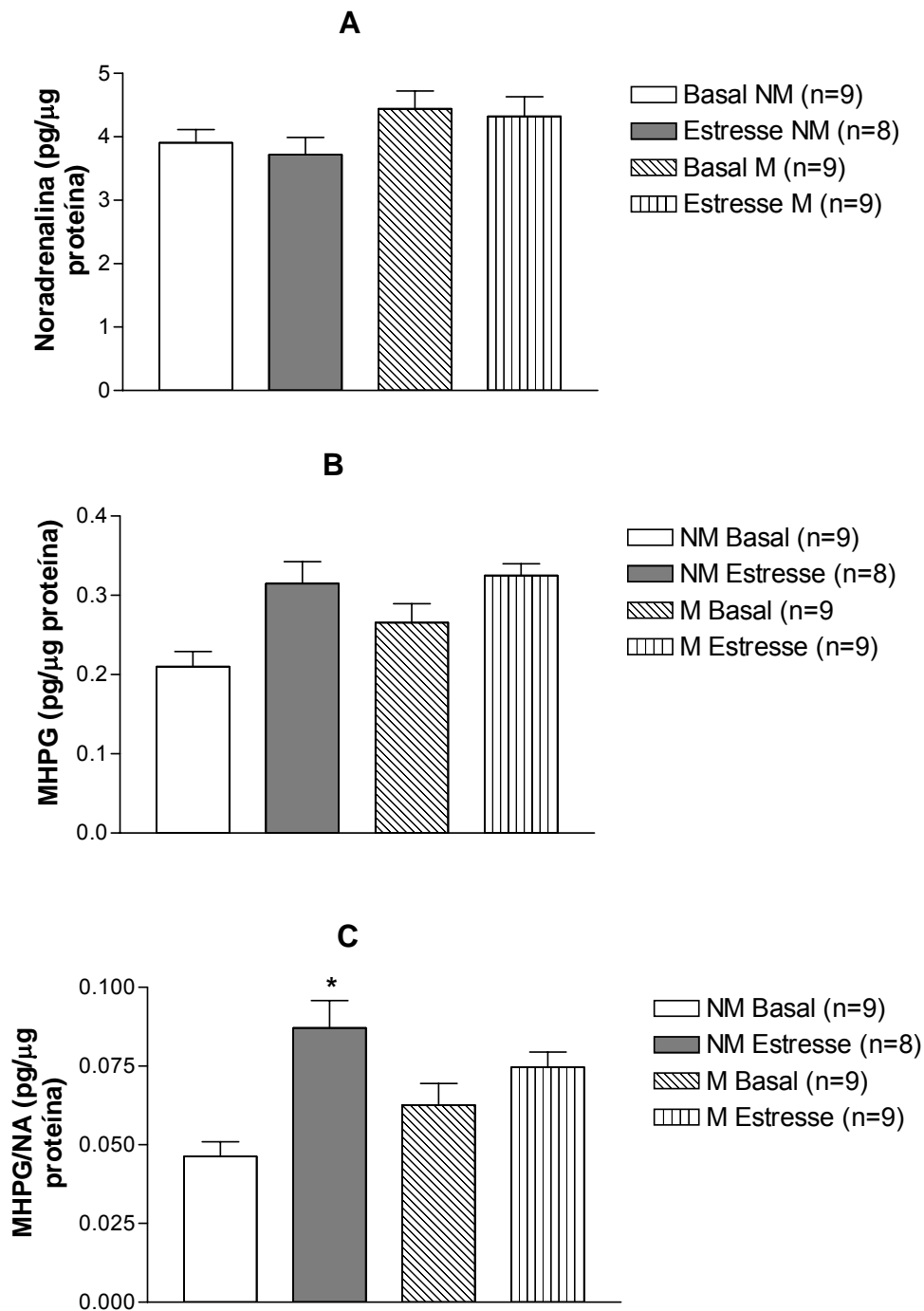
**Figura 28-** Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratos machos adultos. Grupos: não-manipulados (NM) basal, não-manipulados (NM) estresse, manipulados (M) basal e manipulados (M) estresse. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O efeito do estresse e a interação grupo  $\times$  estresse foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). \*- diferente do grupo não-manipulado estresse; #- diferente do grupo não-manipulado basal.



**Figura 29-** Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre o conteúdo de NA (pg/μg de proteína) (A), MHPG (B) e razão MHPG/NA (C) em ratos machos adultos. Grupos: não-manipulados (NM) basal, não-manipulados (NM) estresse, manipulados (M) basal e manipulados (M) estresse. Os valores são expressos como média ± EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O efeito do estresse foi estatisticamente significativo sobre o conteúdo de MHPG ( $p < 0,05$ ) e apresentou uma tendência a ser significativo no conteúdo de NA ( $p = 0,07$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na razão MHPG/NA.



**Figura 30-** Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre as concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) em ratas fêmeas adultas em diestro. Grupos: não-manipuladas (NM) basal, não-manipuladas (NM) estresse, manipuladas (M) basal e manipuladas (M) estresse. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O efeito do estresse e a interação manipulação x estresse foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). \*- diferente do grupo não-manipulado estresse; #- diferente do grupo não-manipulado basal.



**Figura 31-** Efeitos da manipulação neonatal e do estresse de 1 minuto de contenção sobre o conteúdo de NA (pg/μg de proteína) (A), MHPG (B) e razão MHPG/NA (C) em ratas fêmeas adultas. Grupos: não-manipuladas (NM) basal, não-manipuladas (NM) estresse, manipuladas (M) basal e manipuladas (M) estresse. Os valores são expressos como média ± EPM e os números entre parênteses correspondem ao n de cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O efeito da manipulação foi estatisticamente significativo sobre o conteúdo de noradrenalina. O efeito do estresse foi estatisticamente significativo sobre o conteúdo de MHPG. O efeito do estresse e a interação manipulação x estresse foram estatisticamente significativos sobre a razão MHPG/NA. \*diferente do grupo não-manipulada basal.

---

**DISCUSSÃO**

---

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Comportamento no campo-aberto

No experimento 1, foi observado que ratos machos manipulados no período neonatal apresentam aumento da frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto quando comparados aos ratos não-manipulados. Em todas as fases nas quais as ratas foram estudadas, diestro, proestro e estro, as manipuladas apresentaram um aumento da duração total e da frequência de locomoção quando comparadas às ratas não-manipuladas, revelando que apresentam aumento da atividade exploratória. Além disso, foi observado um efeito significativo das fases do ciclo estral sobre estes parâmetros comportamental. A atividade locomotora foi maior nas fases do proestro e estro do que no diestro em ratas não-manipuladas e manipuladas.

No experimento 2, os resultados demonstram que ratos não-manipulados e manipulados gonadectomizados tratados com testosterona apresentam uma redução da duração de locomoção no campo aberto quando comparados a ratos submetidos à gonadectomia e gonadectomia fictícia, respectivamente. Machos manipulados gonadectomizados apresentaram redução da duração total de locomoção quando comparados aos manipulados submetidos à gonadectomia fictícia.

Ratas manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia apresentaram aumento da frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto quando comparadas às ratas não-manipuladas submetidas a ovariectomia fictícia. Ratas manipuladas ovariectomizadas apresentam redução de duração de locomoção e da frequência de entrada nos quadrantes centrais no campo aberto quando comparadas às ratas manipuladas submetidas à ovariectomia

fictícia. A ovariectomia seguida da reposição com E2 promoveu um aumento da duração de permanência nos quadrantes centrais no campo aberto em ratas não-manipuladas e manipuladas.

O campo aberto é uma ferramenta utilizada para se avaliar principalmente a atividade locomotora e a ansiedade em ratos (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990; NUNEZ *et al.*, 1996; VELLÉE *et al.*, 1997; MEERLO *et al.*, 1999). Parâmetros comportamentais como duração total e frequência de locomoção refletem a atividade locomotora e podem estar relacionados com o medo em ambientes novos. Da mesma forma, duração de permanência e frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto, assim como número de bolos fecais eliminados durante este teste, refletem a ansiedade em ratos (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990; NUNEZ *et al.*, 1996; VELLÉE *et al.*, 1997; MEERLO *et al.*, 1999). Assim, quanto maior a frequência e a duração de permanência nos quadrantes centrais no campo aberto e menor o número de bolos fecais eliminados durante o teste, menor é a ansiedade.

No experimento 1, os machos manipulados apresentaram um aumento significativo da frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto. As médias da duração de permanência nos quadrantes centrais e da duração total de locomoção mostraram uma tendência a ser maiores nos ratos manipulados, contudo não atingiu o nível de significância estabelecido. Em ratas fêmeas estudadas nas fases do diestro, proestro e estro, foram observados efeitos estatisticamente significativos do grupo e da fase do ciclo estral na duração total e na frequência de locomoção no campo aberto. Esses resultados estão de acordo com a literatura.

No campo aberto, ratos manipulados apresentam aumentos da atividade locomotora, da duração e da frequência de entrada no centro e uma diminuição da quantidade de bolos fecais (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990; NÚNEZ *et al.*, 1996; MEERLO *et al.*, 1999). Ratos manipulados também permanecem mais tempo nos braços abertos no labirinto-em-cruz-elevado, refletindo uma redução da ansiedade (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990; NÚNEZ *et al.*, 1996; VALLÉE *et al.*, 1997). Como exposto anteriormente, o comportamento de permanência no centro do campo aberto pode ser relacionado à ansiedade (HIROI & NEUMAIER, 2006). Portanto, ratos machos manipulados apresentaram aumento da frequência de entrada nos quadrantes centrais o que pode estar relacionado à diminuição da ansiedade. Com relação às ratas fêmeas, observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos parâmetros de duração total e frequência de locomoção o que também confirma a literatura, pois ratas manipuladas nas fases do diestro, proestro e estro têm aumento nestes comportamentos quando comparadas às ratas não-manipuladas na mesma fase do ciclo estral. Também foi estatisticamente significativo o efeito do ciclo estral, que será discutido adiante.

Embora a testosterona tenha efeitos ansiolíticos em animais com as gônadas intactas (EDINGER & FRYE, 2004), em ratos gonadectomizados tratados com testosterona a atividade exploratória no campo aberto é correlacionada negativamente com as concentrações plasmáticas de testosterona (LAMBADJIEVA, 1998; FRYE & SELIGA, 2001). Os dados desta tese confirmam este resultado previamente demonstrado, pois a gonadectomia seguida de reposição com testosterona reduziu a duração de locomoção no campo aberto. A concentração plasmática de testosterona, que foi determinada



por radioimunoensaio, observada em animais que receberam *pellets* com este hormônio estavam supra-fisiológicas, o que pode ter contribuído para redução da atividade locomotora neste grupo de animais.

A maioria dos estudos sobre os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos é realizado com ratos machos. Em estudos comportamentais que envolvem ratas fêmeas, é necessária a verificação do ciclo estral devido à influência que os hormônios esteróides gonadais exercem sobre a atividade exploratória e a ansiedade. Em ratas, as flutuações dos hormônios ovarianos durante o ciclo estral, como o E2 e a P têm sido associadas com mudanças comportamentais (FRYE *et al.*, 1995; FERNANDEZ-GUASTI & PICAZO, 1999; FRYE *et al.*, 2000; HIROI & MEUMAIER, 2006).

Ratas fêmeas na fase do proestro apresentam aumento da duração de permanência nos braços abertos do labirinto-em-cruz-elevado do que fêmeas em diestro ou ratos machos (FERNANDEZ-GUASTI & PICAZO, 1999). Fêmeas em estro apresentam um aumento da atividade locomotora no campo aberto quando comparadas aos ratos machos (FRYE *et al.*, 1995; FRYE *et al.*, 2000). Assim, durante o proestro e estro, as diferenças entre machos e fêmeas são intensificadas, enquanto que no diestro a fêmea apresenta um comportamento mais típico de machos. Ratas ovariectomizadas reduzem o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto-em-cruz-elevado assemelhando-se mais ao comportamento de machos (FERNANDEZ-GUASTI & PICAZO, 1999). Além disso, ratas ovariectomizadas tratadas com E2 demonstram um maior tempo de permanência nos quadrantes centrais (HIROI & MEUMAIER, 2006) e um aumento da atividade locomotora no campo aberto (DIAZ-VELIZ *et al.*, 1991).

Além dos hormônios ovarianos, o 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one (3 $\alpha$ , 5 $\alpha$  - THP), um metabólito da progesterona, também parece estar envolvido na modulação de comportamentos no campo aberto e no labirinto-em-cruz-elevado (FRYE *et al.*, 2000; FRYE & WALF, 2002). Foi observado que o aumento da frequência de entrada no campo aberto em ratas durante o proestro coincidem com elevações de 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$  -THP periféricas e no hipocampo (FRYE *et al.*, 2000; FRYE & WALF, 2002). Em conjunto, esses estudos sugerem o efeito ansiolítico dos hormônios ovarianos e do 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre comportamentos no campo aberto e no labirinto-em-cruz-elevado, que são ferramentas que avaliam a atividade locomotora e a ansiedade em ratos.

Os resultados deste estudo demonstram que ratas manipuladas apresentaram aumento da duração e da frequência da atividade locomotora no campo aberto quando comparadas às ratas não-manipuladas. Tanto ratas não-manipuladas quanto manipuladas apresentaram aumento da duração de locomoção de forma crescente ao longo das fases diestro, proestro e estro, contudo ratas manipuladas apresentaram uma maior duração de locomoção em todas as fases do ciclo estral estudadas. Assim, fica claro que tanto a manipulação neonatal quanto os hormônios ovarianos promovem aumento da atividade exploratória em ratas, visto que ambos os efeitos (manipulação neonatal e fase do ciclo estral) foram estatisticamente significativos.

A manipulação neonatal afeta o desenvolvimento e a função do sistema serotoninérgico e gabaérgico (STAMATAKIS *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2003). Existe interação entre o eixo HPA e o sistema serotoninérgico central no controle das respostas ao estresse e de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (HESEN & JOELS, 1996; STAMATAKIS *et al.*, 2006).

Considerando o papel modulatório do CRH, serotonina e GABA sobre a atividade exploratória e sobre a ansiedade, e que estes sistemas encontram-se alterados em animais manipulados, sugerimos que os efeitos da manipulação neonatal sobre estes parâmetros comportamentais no campo aberto devem, pelo menos em parte, ser mediados por alterações nestes sistemas.

De acordo com resultados prévios, os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos e respostas neuroendócrinas ao estresse não são observáveis em animais gonadectomizados no período neonatal e antes da instalação da puberdade (LUCION *et al.*, 1999; FOSSATI, 2000; SEVERINO *et al.*, 2004). Estes resultados prévios sugeriram que a presença de hormônios esteróides gonadais seria necessária para a revelação dos efeitos da manipulação neonatal. Portanto, no experimento 2 foi testada esta hipótese. Para isso foram estudados grupos de ratos não-manipulados e manipulados em diferentes estados hormonais: machos gonadectomizados, machos gonadectomizados repostos com testosterona, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com estradiol e um grupo de machos e fêmeas submetidos à gonadectomia fictícia.

Os resultados desta Tese demonstraram que ratos manipulados gonadectomizados apresentaram uma redução da atividade locomotora quando comparados aos ratos manipulados submetidos à cirurgia fictícia. O mesmo foi observado com ratas manipuladas ovariectomizadas, que apresentam redução de duração de locomoção e da frequência de entrada nos quadrantes centrais no campo aberto quando comparadas às ratas manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia. Os efeitos da manipulação neonatal manifestam-se quando os hormônios das gônadas estão presentes.

Além disso, ratas manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia apresentaram aumento da frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo aberto quando comparadas às ratas não-manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia. A gonadectomia em animais manipulados abole os efeitos da manipulação neonatal sobre a atividade exploratória em ratos machos e fêmeas e sobre a ansiedade em fêmeas. Assim, parece que a presença de hormônios esteróides gonadais é necessária para “revelar” os efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento no campo aberto. Possivelmente, a modulação dos esteróides gonadais sobre os efeitos da manipulação neonatal deve-se aos efeitos ativacionais destes hormônios nos circuitos neurais que regulam os comportamentos, visto que a gonadectomia foi realizada na idade adulta e não no período neonatal, onde os efeitos organizacionais dos hormônios esteróides gonadais são mais pronunciados.

Os possíveis mecanismos neurais envolvidos na complexa regulação da ansiedade pelos hormônios ovarianos incluem sistemas de neuropeptídeos e neurotransmissores como o CRH (KOOB & HEINRICHS, 1999; TAKAHASHI, 2001), serotonina (CLARK *et al.*, 2002; MASWOOD *et al.*, 1998) e GABA (GRAEFF, 1981). A expressão gênica do CRH (HASS *et al.*, 1997), serotonina (BETHEA *et al.*, 2002; RUBINOW *et al.*, 1998) e GABA (HAMON *et al.*, 1996; MAGGI & PEREZ, 1984) são moduladas pelo E2 e P. Além disso, manipulações do CRH e da serotonina têm sido demonstradas terem efeitos semelhantes ao do E2 e da P sobre a ansiedade (CLARK *et al.*, 2002; KOOB & HEINRICHS, 1999).

Em conclusão, a manipulação neonatal promove uma redução da ansiedade em ratos machos e fêmeas em todas as fases do ciclo estral

estudadas. Assim como a manipulação neonatal, os hormônios esteróides gonadais influenciam o comportamento no campo aberto promovendo um aumento da atividade locomotora em ratas no estro maior do que no proestro e este maior do que no diestro. Em ratos manipulados, a presença das gônadas parece ser necessária para “revelar” os efeitos da manipulação neonatal sobre a atividade exploratória em machos e fêmeas e a ansiedade em fêmeas, sugerindo uma possível mediação dos hormônios esteróides gonadais nos efeitos comportamentais conhecidos da manipulação neonatal.

## **6.2. Resposta da PRL ao estresse**

No experimento 1, os resultados demonstram que a manipulação neonatal reduz a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas na fase do estro. Além disso, ratas não-manipuladas na fase do estro apresentaram uma maior resposta da PRL ao estresse por contenção do que ratas do mesmo grupo nas fases do proestro e do diestro. Em ratas manipuladas observou-se um aumento da resposta da PRL ao estresse na fase do estro quando comparadas às ratas manipuladas na fase do diestro. Não foram observadas diferenças significativas entre ratas manipuladas nas fases do estro e proestro.

No experimento 2, observou-se nos ratos machos o efeito do tratamento hormonal e do estresse por éter sobre as concentrações plasmáticas de PRL. A gonadectomia diminuiu as concentrações plasmáticas de PRL em ratos não-manipulados e a gonadectomia seguida do tratamento com testosterona aumentou as concentrações plasmáticas de PRL em ratos não-manipulados e manipulados. O efeito da manipulação neonatal não foi observado.

Em fêmeas foram observados efeitos significativos do tratamento hormonal e do estresse e na interação entre manipulação neonatal x tratamento hormonal x estresse. Ratas não-manipuladas e manipuladas ovariectomizadas tratadas com E2 demonstraram aumento das concentrações plasmáticas de PRL. Ratas não-manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia ou ovariectomizadas e ratas manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia responderam ao estresse com aumento das concentrações plasmáticas de PRL, como esperado. Contudo, ratas não-manipuladas ovariectomizadas e tratadas com E2 responderam ao estresse com uma diminuição das concentrações plasmáticas de PRL, como já é previamente descrito. Em fêmeas manipuladas ovariectomizadas tratadas com E2, não foi observada a queda da concentração plasmática da PRL em resposta ao estresse.

Há algum tempo é conhecido que a PRL é um hormônio que embora menos estudado que a corticosterona e o ACTH, também têm suas concentrações plasmáticas alteradas por estímulos estressantes (DEMAREST *et al.*, 1985; BÁNKY *et al.*, 1994; CALDEIRA & FRANCI, 2000; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). A regulação da secreção de PRL é extremamente complexa e os hormônios esteróides gonadais, principalmente o estradiol, possuem um papel modulatório sobre a secreção de PRL (GUDELSKY *et al.*, 1981; CALIGARIS & TALESNIK, 1983; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). Neste estudo, como já é conhecido, observamos o efeito estimulatório dos hormônios esteróides gonadais, pois ratas na fase do estro, que tiveram picos das concentrações de estradiol na tarde da fase anterior, proestro, apresentaram uma maior resposta da PRL ao estresse.

A conhecida ação estimulatória dos estrógenos sobre a liberação de PRL pode ocorrer em vários locais como no lactotrofo e no núcleo arqueado do hipotálamo (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). No lactotrofo, a estimulação da transcrição gênica da PRL é observada 24 horas após a administração de estradiol (SHULL & GORSKI, 1989). O estradiol também pode diminuir a sensibilidade do lactotrofo a dopamina através da redução do número de receptores dopaminérgicos (RAYMOUND *et al.*, 1978). Além disso, a proliferação dos lactotrofos no estro pode ser devida à ação das altas concentrações de estradiol durante à tarde do proestro sobre os mecanismos neurais que engatilham a proliferação dos lactotrofos (HASHI *et al.*, 1995). Esta ação do estradiol não ocorre diretamente no lactotrofo, mas em mecanismos neurais que estimulam a produção destas células na adenohipófise na fase do estro (HASHI *et al.*, 1995). A participação do sistema dopaminérgico do núcleo arqueado hipotalâmico sobre a resposta da PRL ao estresse não parece ser a mais significativa, visto que neste núcleo existe apenas um pequeno percentual de células dopaminérgicas imunorreativas a receptores de estradiol (SAR, 1984). Além disso, o aumento das concentrações plasmáticas de PRL induzido por estresse ocorre mesmo sob infusão contínua de DA (SHIN, 1979) e o bloqueio do pico pré-ovulatório de PRL é acompanhado de uma diminuição do conteúdo de NA, mas não de DA no MBH e POA (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997). Estas evidências sugerem que o aumento de PRL não seja somente devido à inibição dos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, mas que ele depende também de outro sistema liberador de PRL, no qual a NA pode ser incluída.

No experimento 2, ratas manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia apresentaram redução da concentração plasmática de PRL 2 minutos após a aplicação do estresse por éter quando comparadas às ratas não-manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia, confirmando a hiporresponsividade da PRL ao estresse em ratas manipuladas. Em ratas ovariectomizadas a hiporresponsividade da PRL ao estresse não foi observada em fêmeas manipuladas, indicando que a das gônadas é necessária para o aparecimento do efeito da manipulação neonatal. A ovariectomia seguida de reposição com E2 aumentou drasticamente as concentrações basais de PRL e o estresse promoveu uma queda das concentrações plasmáticas de PRL em fêmeas não-manipuladas, como esperado e observado na literatura (POLETINI, 1998; DONADIO *et al.*, 2004). Contudo, em fêmeas manipuladas tratadas com E2 não se observou a queda das concentrações plasmáticas de PRL. Portanto, o efeito da manipulação neonatal quando o E2 é repostado foi observado, reforçando a hipótese de que a presença das gônadas é necessária para o aparecimento do efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse.

Em ratos machos, foram observados apenas os efeitos do tratamento hormonal e do estresse. O efeito da manipulação neonatal não foi significativo provavelmente devido à ação mais pronunciada da testosterona do que da própria manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse.

Em conclusão, a manipulação neonatal reduz a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas apenas na fase do estro quando comparados aos animais não-manipulados. A redução da resposta da PRL ao estresse por éter não foi observada em ratas ovariectomizadas, contudo, ratas



manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia apresentaram uma redução da resposta da PRL ao estresse quando comparadas às ratas não-manipuladas submetidas à ovariectomia fictícia. Além disso, a queda da concentração plasmática de PRL em ratas ovariectomizadas tratadas com E2 submetidas a estresse não foi observada em ratas manipuladas. Estes resultados indicam que o estado hormonal de ratas influencia o efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse. Assim, a modulação dos efeitos da manipulação neonatal pelos esteróides gonadais envolve mecanismos neurais relacionados a comportamentos e a resposta da PRL ao estresse, visto que ambos são afetados e relacionados com a manipulação neonatal, a fase do ciclo estral e com a presença de hormônios esteróides gonadais.

### **6.3. Resposta do LH ao estresse**

No experimento 1, os resultados deste estudo revelaram que a manipulação neonatal reduz a resposta do LH ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas nas fases do diestro, proestro e estro.

No experimento 2, em ratos machos foi observado efeito significativo do tratamento hormonal e do estresse sobre a secreção do LH induzida por estresse por éter. A gonadectomia provocou um aumento das concentrações plasmáticas de LH quando comparada à gonadectomia fictícia e a gonadectomia seguida de reposição com testosterona. Em ratas, foi observado somente o efeito significativo do tratamento hormonal tanto em não-manipuladas quanto em manipuladas, não havendo efeito da manipulação neonatal. Como esperado, a ovariectomia aumentou as concentrações plasmáticas de LH, por outro lado, a ovariectomia seguida de reposição com

E2 reduziu as concentrações plasmáticas de LH quando comparadas às ratas submetidas à ovariectomia fictícia.

A ciclicidade dos hormônios esteróides gonadais durante o ciclo estral influencia a resposta do LH ao estresse (para revisão ver KALRA & KALRA, 1989). Neste estudo, verificamos as maiores respostas nas fases do proestro e estro, confirmando a influência das variações dos hormônios ovarianos sobre a resposta do LH ao estresse.

Os hormônios esteróides gonadais, o estradiol e a testosterona, atuam no SNC modulando a secreção de neurônios LHRH para regular a secreção do LH em ratos com as gônadas intactas conforme as oscilações da quantidade de LHRH atuante na circulação porta hipofisária com precisão rigorosa (para revisão ver KALRA & KALRA, 1989). Em ratos, a gonadectomia aumenta as concentrações plasmáticas de LH, por outro lado, a gonadectomia seguida de reposição com testosterona ou estradiol diminui a secreção deste hormônio (para revisão ver KALRA & KALRA, 1989; KAWAKAMI & WINTERS, 1999; HOOD & SCHWARTZ, 2000). Os mecanismos responsáveis por esta regulação envolvem mudanças no *binding* de receptores GnRH (CLAYTON & CATT, 1981), na expressão gênica de receptores GnRH (KAYSER *et al.*, 1993) e na inibição GABAérgica sobre neurônios GnRH (HOOD & SCHWARTZ, 2000), entre outros mecanismos. Confirmando a literatura, os resultados deste trabalho demonstraram que a gonadectomia aumentou as concentrações plasmáticas de LH e a gonadectomia seguida de reposição com testosterona e estradiol teve o efeito contrário. No experimento 2, os efeitos dos hormônios esteróides gonadais sobre as concentrações plasmáticas de LH foram mais potentes que os efeitos da manipulação neonatal, que foram observados

somente em ratos com gônadas intactas e em ratas durante as fases do diestro, proestro e estro.

O efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de LH ainda é muito pouco estudado. A resposta desse hormônio ao estresse parece depender do tipo, da intensidade e da duração da aplicação de estímulos estressantes (MARTÍ & ARMÁRIO, 1998). Geralmente, estresses crônicos provocam uma redução das concentrações plasmáticas de LH (TACHE *et al.*, 1976; GRAY *et al.*, 1978; DEMURA *et al.*, 1989). Por outro lado, a aplicação de um estresse agudo induz a liberação desse hormônio (MANN *et al.*, 1986; ARMÁRIO *et al.*, 1993; MARTÍ *et al.*, 1995).

Os mecanismos responsáveis pela regulação da secreção de LH durante o estresse agudo ainda não estão bem esclarecidos. O ACTH, a serotonina, a NA e a progesterona parecem participar deste processo. A administração ICV de ACTH induz um aumento nas concentrações plasmáticas de LH semelhantes às provocadas por estresse (MANN *et al.*, 1986). A ação do ACTH sobre a liberação de LH durante a aplicação de estresse agudo parece não ser mediada pela supra-renal, mas, provavelmente deve-se a um efeito direto do ACTH no SNC (MANN *et al.*, 1986). A administração de antagonistas para serotonina, mianserina e metiotepina, e do inibidor da síntese de serotonina PCPA (p-clorofenilalanina), abolem a liberação da secreção de LH induzida por estresse por contenção (ARMÁRIO *et al.*, 1993). A administração de inibidores da síntese de catecolaminas alfa-metil-p-tirosina (alfa MPT) e DDC e de prazosina, um antagonista dos receptores 2 $\alpha$  adrenérgicos bloquearam a liberação de LH induzida por estresse por contenção (MARTIN *et al.*, 1995). CALLEGARI (2004) demonstrou uma amplificação do pico pré-

ovulatório do LH na manhã do proestro conjuntamente com aumentos na secreção plasmática de progesterona. Este autor também sugere um efeito estimulatório do ACTH sobre a secreção de progesterona, principalmente a oriunda da supra-renal, que por sua vez parece ser um dos fatores responsáveis pela liberação aguda de neurotransmissores excitatórios sobre os neurônios LHRH que induziram a liberação de LH após a aplicação de estresse. Em conjunto, estes resultados da literatura, sugerem que, durante a aplicação de estresses agudos, a secreção de LH induzida por estresse parece estar sendo regulada pela serotonina, ACTH, progesterona e pelo sistema noradrenérgico.

Já há algumas décadas sabe-se que a manipulação neonatal afeta o funcionamento do eixo HPA. Animais manipulados apresentam o eixo HPA hiporresponsivo ao estresse, o que é demonstrado pelas menores concentrações plasmáticas de corticosterona e ACTH em ratos manipulados quando comparados a animais não-manipulados (LEVINE *et al.*, 1994; MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000). Este fenômeno está relacionado com o aumento do número de receptores para glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal, o que por sua vez torna o *feedback* negativo mais eficiente (MEANEY *et al.*, 1996). Assim como o eixo HPA, resultados de nosso laboratório revelaram que a manipulação neonatal afeta também o funcionamento do eixo HPG. Ratos machos e fêmeas manipulados demonstram redução da atividade reprodutiva. Ratos machos apresentam redução do comportamento sexual (PADOIN *et al.*, 2001). Ratas fêmeas apresentam diminuição do comportamento sexual, ciclo estral anovulatório, da concentração plasmática de estradiol, LH e PRL na tarde do proestro (GOMES

*et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2005). Além disso, foi observado um aumento do conteúdo de LHRH na área pré-óptica medial de ratas manipuladas (GOMES *et al.*, 2005).

Observamos que a manipulação neonatal reduz a resposta do LH em ratos machos e fêmeas nas fases do diestro, proestro e estro. Possíveis explicações para esta observação envolvem a participação do ACTH, da progesterona e do sistema noradrenérgico.

Em ratos manipulados, a secreção de ACTH durante a aplicação de estímulos estressantes é menor do que em animais não-manipulados (MEANEY *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2000). Assim, ratos manipulados liberam menos ACTH, o que, por sua vez, provocaria uma menor liberação de LH induzida por estresse. Da mesma forma, ratos manipulados demonstram uma redução das concentrações plasmáticas de progesterona (GOMES *et al.*, 2005), hormônio envolvido na regulação da secreção de LH induzida por estresse. Durante a aplicação de estímulos estressantes, a maior parte da progesterona secretada é oriunda da adrenal e, por sua vez, a progesterona parece regular a atividade dos neurônios LHRH indiretamente através da ação sobre neurotransmissores excitatórios (CALLEGARI, 2004). Uma outra provável explicação para a menor resposta do LH ao estresse em animais manipulados pode estar relacionada com o acúmulo de LHRH na área pré-óptica medial observado em ratas manipuladas na tarde do proestro (GOMES *et al.*, 2005). Esse aumento pode significar uma deficiência no sistema de liberação de LHRH (HELENA *et al.*, 2002). O estradiol é o principal hormônio responsável pela síntese e liberação de LHRH, contudo o mecanismo pelo qual o estradiol estimula os neurônios LHRH ainda não está esclarecido,

embora muitos neurotransmissores participam deste processo (PETERSEN *et al.*, 2003). Assim, uma deficiência na liberação de LHRH durante o estresse em ratos manipulados também poderia ser uma das causas da menor liberação de LH induzida por estresse nesse grupo de animais.

Em conclusão, a manipulação neonatal reduz a liberação de LH em resposta ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas adultos nas fases do diestro, estro e proestro. As variações hormonais ao longo do ciclo estral amplificam a resposta do LH ao estresse e intensificam os efeitos da manipulação neonatal (redução da resposta do LH ao estresse) nas fases do proestro e estro. A ação dos hormônios esteróides gonadais (testosterona e estradiol) e a gonadectomia sobre a resposta do LH ao estresse por éter foi mais potente do que os efeitos da manipulação neonatal.

#### **6.4. Papel do sistema noradrenérgico sobre a liberação de PRL em resposta ao estresse**

Os resultados obtidos no experimento 3, demonstram que as concentrações plasmáticas de PRL aumentaram após a aplicação do estresse por contenção e que tanto ratos machos quanto ratas fêmeas manipuladas apresentam uma menor resposta da PRL ao estresse por contenção quando comparados aos animais do grupo não-manipulado. Além disso, foi observado um aumento da razão MHPG/NA no PVN após aplicação do estresse somente em ratas não-manipuladas.

O estresse por contenção é conhecidamente capaz de modificar as concentrações plasmáticas de PRL. Já há algum tempo sabe-se que as concentrações plasmáticas de PRL são influenciadas por estímulos estressantes (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971, KAWAKAMI, *et al.*,

1979; DEMAREST *et al.*, 1985; BÁNKY *et al.*, 1994; CALDEIRA & FRANCI, 2000; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). As concentrações plasmáticas de PRL, a magnitude e o tipo de resposta ao estresse (redução ou aumento das concentrações plasmáticas) são fortemente influenciados por hormônios esteróides gonadais (CALIGARIS & TALESNIK, 1983; POLETINI, 1998). Os hormônios esteróides gonadais, principalmente o estradiol, provocam aumentos das concentrações plasmáticas de PRL e da magnitude da resposta desse hormônio ao estresse. Desta forma, quando as concentrações plasmáticas de PRL e de hormônios esteróides gonadais são baixos, como em machos e fêmeas em diestro, o estresse provoca um aumento da PRL no plasma (WAKABAYASHI *et al.*, 1971; POLETINI, 1998; SEVERINO *et al.*, 2004). De outro modo, quando as concentrações plasmáticas de PRL e de estradiol pré-estresse são elevadas, como em ratas na tarde do proestro, ratas ovariectomizadas tratadas com E2 e E2+P, ocorre uma redução da PRL plasmática (GALA & HAISENLEDER, 1986; DONADIO *et al.*, 2004). O observado neste estudo foi um aumento das concentrações plasmáticas de PRL após estresse, o que é um resultado esperado, pois foram estudados ratos machos e fêmeas na fase do diestro e ambos apresentam concentrações plasmáticas de PRL e estradiol menores do que ratas na tarde do proestro e ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol. Portanto, o estresse aplicado foi suficientemente capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de PRL.

Existem poucos estudos na literatura que investigaram a resposta da PRL ao estresse em ratos manipulados. Assim como o observado com o eixo HPA, ratos machos e fêmeas manipulados apresentam as concentrações plasmáticas de PRL pré-estresse semelhantes e uma redução na resposta da

PRL quando um estímulo estressante é aplicado (NÚNEZ *et al.*, 1996, MEERLO *et al.*, 1999; SEVERINO *et al.*, 2004). Neste estudo, confirmando a literatura, tanto ratos machos quanto ratas fêmeas manipulados apresentaram uma menor resposta da PRL ao estresse quando comparados aos animais não-manipulados, contudo, as concentrações basais não diferem entre os grupos de animais não-manipulados e manipulados. Este resultado sugere que mecanismos centrais responsáveis pela regulação da secreção de PRL em resposta ao estresse, podem estar sendo alterados pela manipulação neonatal.

A regulação da secreção de PRL é extremamente complexa e o sistema noradrenérgico parece estar envolvido nesse processo. (DODGE & BADURA, 2004). Existem algumas evidências que sugerem um papel estimulatório central da NA na regulação das concentrações plasmáticas de PRL. A administração ICV de dietilditiocarbamato (DDC), um inibidor da síntese de NA, produz uma diminuição da PRL sérica (KALRA *et al.*, 1978). Em ratos, a lesão de vias noradrenérgicas ventrais reduz as catecolaminas no hipotálamo anterior e as concentrações plasmáticas de PRL (LANGELIER & MCCANN, 1977). Em hamsters, a microinfusão do agonista de receptores noradrenérgicos alfa-1b (L-fenilefrina hidrocloreto) no PVN aumenta de forma dose dependente a concentração de PRL no plasma (DODGE & BADURA, 2004). Da mesma forma, a infusão do antagonista alfa 1b cloroeticloclonidina induz uma redução também de forma dose dependente das concentrações plasmáticas de PRL (DODGE & BADURA, 2004). Em conjunto estes resultados sugerem um papel regulatório do sistema noradrenérgico no PVN sobre a regulação da secreção de PRL.



A produção de 3-metoxi-4-hidroxifeniletienoglicol-sulfato (MHPG-sulfato), metabólito da NA, é um indicativo de aumento da atividade de neurônios noradrenérgicos centrais. Portanto, medindo sua produção, podemos inferir a quantidade de NA utilizada (STONE, 1975). Em geral, a aplicação de um estresse agudo provoca uma redução do conteúdo de NA e um aumento do MHPG-sulfato e do *turnover* (MHPG/NA) da NA em várias regiões do sistema nervoso central, entre elas o hipotálamo (TANAKA *et al.*, 1982, IDA *et al.*, 1990, PÁČAK *et al.*, 1992, HELLRIEGEL & D'MELLO, 1997).

Confirmando a literatura, em ratos não-manipulados encontramos um aumento da razão MHPG/NA no PVN após a aplicação do estresse por contenção. Esse tipo de estresse é conhecidamente capaz de estimular a liberação e a utilização de noradrenalina neste núcleo do sistema nervoso central (PÁČAK *et al.*, 1992). A liberação de NA no PVN durante o estresse parece facilitar as respostas de neurônios que contêm CRH e possivelmente contribuir para a ativação do eixo HPA (SZAFARCZYK *et al.*, 1987).

Além disso, estudos prévios sugerem que a NA pode estimular neurônios CRH estimulando a síntese e a liberação de CRH para a circulação porta hipofisária (PLOTSKI, 1987, PACÁK *et al.*, 1995, ITOI *et al.*, 1998, DKEYSER *et al.*, 2000). A NA induz uma liberação de CRH através da ativação dos receptores alfa-1 adrenérgicos, que por sua vez aumentam a liberação de NA (para revisão ver FORRAY & GYSLING, 2004). Dados sugerem que a liberação de PRL induzida por estresse parece ser mediada pelo CRH cuja liberação é estimulada pela NA oriunda de projeções ascendentes. A lesão do LC diminui a secreção de PRL induzida por estresse (POLETINI, 1998). Além disso, a lesão do PVN e a injeção ICV do antagonista CRH R1 abolem a

resposta da PRL ao estresse por contenção (AKEMA *et al.*, 1995) e por hipóxia (XU *et al.*, 2006). Assim, baseado em estudos prévios, existem evidências de uma interação entre NA e CRH em condições basais e na presença de estímulos estressantes.

LIU *et al.*, (2000), observaram que ratos machos manipulados apresentam um aumento dos receptores adrenérgicos inibitórios no LC e uma redução da liberação de NA no PVN induzida por estresse. No presente estudo, avaliamos a atividade noradrenérgica em ratos machos e fêmeas manipulados. Não se observou aumento da razão MHPG/NA após estresse apenas em fêmeas manipuladas, o que indica uma redução da atividade noradrenérgica. Uma explicação para esse resultado seria o fato de que os efeitos da manipulação neonatal parecem ser mais evidentes e pronunciados em fêmeas do que em machos (PAPAIIOANNOU *et al.*, 2002; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004).

Considerando a participação do sistema noradrenérgico sobre a secreção e liberação de PRL em resposta ao estresse, a menor resposta da prolactina ao estresse observada talvez possa ser devida, pelo menos em parte, à menor razão MHPG/NA, um indicativo da atividade noradrenérgica no PVN observada nessas ratas. Como exposto anteriormente, existem evidências que indicam que o CRH liberado após a ativação do PVN parece ser um dos fatores estimulatórios da secreção e liberação da prolactina durante o estresse. Assim, a menor atividade noradrenérgica no PVN em ratas fêmeas manipuladas pode ser um dos fatores responsáveis para a menor resposta da prolactina ao estresse observada nestas ratas.

Em conclusão, a manipulação neonatal diminui a magnitude da resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas adultos. Ratas adultas manipuladas não apresentam aumento da razão MHPG/NA, um indicativo da atividade noradrenérgica no PVN após a aplicação de estresse por contenção (SEVERINO *et al.*, 2005). A ativação noradrenérgica deste núcleo do SNC ocorre comumente após a aplicação de estímulos estressantes (IDA *et al.*, 1990, PÁČAK *et al.*, 1992, HELLRIEGEL & D'MELLO, 1997) e está relacionada com a liberação de PRL induzida por estresse, exercendo um papel estimulatório sobre a secreção deste hormônio (POLETINI, 1998; DODGE & BADURA, 2004). Assim, a menor resposta da PRL ao estresse em ratas manipuladas, parece estar relacionada com a redução da atividade noradrenérgica ao estresse.

---

**CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

A manipulação neonatal promove uma redução da ansiedade e um aumento da atividade exploratória em ratos machos e fêmeas nas fases do diestro, estro e proestro.

Em ratos manipulados, a presença das gônadas parece ser necessária para “revelar” os efeitos da manipulação neonatal sobre a atividade exploratória em machos e fêmeas e a ansiedade e a resposta da PRL ao estresse em fêmeas, sugerindo uma possível mediação dos hormônios esteróides gonadais nos efeitos da manipulação neonatal.

A manipulação neonatal reduz a resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas na fase do estro e reduz a resposta do LH ao estresse por contenção em ratos machos e fêmeas em proestro e estro. Estes resultados sugerem que o estado hormonal de ratas influencia os efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL e do LH ao estresse.

A manipulação neonatal reduz a atividade noradrenérgica no PVN em resposta ao estresse por contenção em fêmeas.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEMA T.; CHIBA A.; SHINOZAKI R.; OSHIDA M.; KIMURA F. & TOYODA J. Acute stress suppresses the N-methyl-D-aspartate-induced luteinizing hormone release in the ovariectomized estrogen-primed rat. **Neuroendocrinology**, 62(3), p.270-276, 1995.

ALVAREZ, E.O. Role of histamine in the increased secretion of prolactin induced by ether in adult male rats. **Journal of Endocrinology**, v.95, p.409-415, 1982.

AMENOMORI, Y.; CHEN C.L. & MEITES, J. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. **Endocrinology**, v. 86, p. 506-510, 1970.

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

ARMÁRIO, A.; MARTÍ, O.; GAVALDÁ, A. & LÓPEZ-CALDERÓN, A. Evidence for the involvement of serotonin in acute stress-induced release of luteinizing hormone in the male rat. **Brain Research Bulletin**, v.31, p.29-31, 1993.

ARNOLD, A.P. Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. **Hormones and Behavior**, v.30, p.495-505, 1996.

BÁNKY, Z.; NAGY, G.M. & HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. **Neuroendocrinology**, v. 59, p. 63-71, 1994.

BECÚ-VIALLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.M.; DÍAZ-TORGA, G.S. & LIBERTUN, C. Ontogenic studies of the neural control of adenohipofyseal hormones in the rat. II. Prolactin. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.12(1), p. 1-19, 1992.

BEN-JONATHAN, N. Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. **Endocrine Review** (6), p. 564-589 , 1985.

BETHEA, C.L.; LU, NZ.; GUNDLAH, C. & STREICHER, J.M. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. **Front Neuroendocrinol**, v.23, p.41-100, 2002.

BESSER, G.M. & MORTIMER. Hypothalamic regulatory hormones: A review. **J. Clin. Path.** V.27:173-184, 1974.

BLAKE, C.A. Effects of "stress" on pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.148, p.813-815, 1975

BOOCKFOR, F.R.; HOEFFLER, J.P. & FRAWLEY, L.S. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. **Am. J. Physiol Endocrinol Metab.**, v.250, p.100-103, 1986.

BOWMAN, R.E.; FERGUSON, D. & LUINE, V.N. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v.113 (2), p.401-410, 2002.

BRAN, D.W. & MAHESH, V.B. Role of corticosteroids in female reproduction. **FASEB J.**, V.5, P.2691-2698, 1991.

BRISKI, K.P. Effects of peripheral vs. central administration of the endogenous glucocorticoid, corticosterona, and the glucocorticoid receptor agonist, RU



28362, on plasma LH levels in male rats. **Brain Research**, v.670, p.66-74, 1995.

BRISKI, K.P. Stimulatory vs. inhibitory effects of acute stress on plasma LH: differential effects of pretreatment with dexamethasone or the steroid receptor antagonist, RU 486. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v.55(1), p.19-26, 1996.

BRISKI, K.P. & SYLVESTER, P.W. Acute inhibition of pituitary LH release in the male rat by the glucocorticoid agonist decadron phosphate. **Neuroendocrinology**, v.54, p.313-320, 1991.

BRINSKI, K.P.; VOGEL, K.L. & McINTYRE, A.R. The antiglucocorticoid, RU 486, attenuates stress-induced decreases in plasma luteinizing hormone concentrations in male rats. **Neuroendocrinology**, v.61, p.238-245, 1995.

BROWN, A.M.; KANIK, J.M.; MURPHREE, E.S.; KING, R. & CALLANHAN, P. Effects of cyclic steroid hormone replacement on prolactin and luteinizing hormone surges in female rats. **Reproduction**, v.128: 373-378, 2004.

BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E. & FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v.94 (6), 1974.

CAGAMPANG, F.R.; CATES, P.S.; SANDHU, S.; STRUTTON, P.H.; McGARVEY, C.; COEN, C.W. & O'BYRNE, K.T. Hypoglycaemia-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats: role of oestradiol, endogenous opioids and the adrenal medulla. **Journal of Neuroendocrinology**, v.9, p.867-872, 1997.

CAGOL, T.S.; MIGUEL, S.R.P.S.; BONZANINI, L.; WINKELMANN, E.C.; LUCION, A.B. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica de neurônios da area pré-óptica-medial em ratas.

**XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.**  
Resumos, 2005.

CALDEIRA, J.C. & FRANCI, C.R. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. **Brain Reserach Bulletin**, v.52, p.483-489, 2000.

CALLEGARI, F.V.R. Influência do estresse agudo no pico pré-ovulatório de LH em ratas. Dissertação de Mestrado em Fisiologia - Universidade de São Paulo- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004.

CALIGARIS, L. & TALESNIK, S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, Sex and daily rhythm. **Acta Endocrinologica**, v. 102, p. 505-510, 1983.

CHARPENET, G.; TACHE, Y.; BERNIER, M.; DUCHARME, J.R. & COLLU, R. Stress-induced testicular hyposensivity to gonadotropin in rats: Role of the pituitary gland. **Biology of Reproduction**, v.27, p.616-623, 1982.

CHEN, H.T. Posnatal development of pituitary lactotropes in the rat measured by reverse hemolytic plaque assay. **Endocrinology**, v.120, p.247-253, 1987.

CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, p. 1244-12152, 1992.

CLARK, M.S.; SEXTON, T.J.; McCLAIN, M.; ROOT, D.; KOHEN, R. & NEUMAIER, J.F. Overexpression of 5-HT1B receptor in dorsal raphe nucleus using Herpes Simplex Virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. **Journal of Neuroscience**, v.22, p.4550-4562, 2002.

CLAYTON, R.N.; CATT, K.J. Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. **Endocrinology**, v.108:887-895, 1981.

CONTI, L.H.; YOUNBLOOD, K.L; PRINTZ, M.P. & FOOTE, S.L. Locus coeruleus electrophysiological activity and responsivity to corticotropin-releasing factor in inbred hypertensive and normotensive rats. **Brain Research**, v. 774, p.27-34, 1997.

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**, v.64, p.477-505, 1995.

D'AGOSTINO, J.; VALADKA, R.J. & SCHWARTZ, N.B. Differential effects of in vitro glucocorticoids on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion: Dependence on sex of pituitary donor. **Endocrinology**, v.127, p.891-899, 1990.

DeGREEF, W.J. & VISSER, T.J. Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. **Journal of Endocrinology**, v.91, p.213, 1981.

DEKEYSER, F.G., LEKER, R.R., WEIDENFELD, J. Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. **Neuroimmunomodulation**, v.7(4): 182-188, 2000.

DELHEZ, M.; HANSENNE, M. & LEGROS, J.J. Andropause and psychopathology: Minor symptoms rather than pathological ones. **Psychoneuroendocrinology**, v.28, p.863-874, 2003.

DEMAREST, K.T. & MOORE, K.E. Sexual differences in the sensitivity of tuberoinfundibular dopamine neurons to the actions of prolactin. **Neuroendocrinology**, v.33, p.230-234, 1981.

DEMAREST, K.Y.; MOORE, K.E. & RIEGLE, G.D. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: evidence for a

differential response in male versus female rats. **Neuroendocrinology**, v41, p.504-511, 1985.

DEMURA, R.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, S.; KOMATSU, H.; ODAQIRI, E. & DEMURA, H. Effect of immobilization stress on testosterone and inhibin in male rats. **J Androl**, v.10(3): 210-213, 1989.

DENT, G.W.; SMITH, M.A. & LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology**, v. 141, p.1593-1598, 2000.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.234(1-2): 19-25,2005.

DIAZ-VELIZ, G.; URRESTA, F.; DUSSAUBAT, N. & MORA, S. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on avoidance responses and others behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 50, p.61-65, 1991.

DOBRAKOVOVÁ, M. & JURCOVICOVÁ. Corticosterone and prolactin responses to repeated handling and transfer of male rats. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v.83 (1), p.21-21, 1984.

DODGE, J.C. & BADURA, L.L. Noradrenergic regulation of prolactin secretion at the level of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: functional significance of the alpha-1b and beta-adrenergic receptor subtypes. **Brain Research**, v.1016, p.240-246, 2004.

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**, v.1006: 59-65, 2004.

DONOSO, A.O.; SELTZER, A.M.; NAVARRO, C.E.; CABRERA, R.J. & NEGRO-VILAR, A. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and

luteinizing hormone secretion by hypothalamic acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27(4): 921-932, 1994.

DUDLEY, C.A.; JAMISON, T.S. & MOSS, R.L. Inhibition of lordosis behaviour in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. **Endocrinology**, v.110 (2), p.677-679, 1982.

ECK, J.B. & KUHN, C.M. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat. **Neuroendocrinology**, v.56, p.605-610, 1992.

EDINGER, K.L. & FRYE, C.A. Testosterone's anxiolytic, anxiolytic, and cognitive-enhancing effects may be due in part to actions of its 5 $\alpha$ -reduced metabolites in the hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v.118(6), p.1352-1364, 2004.

ENNIS, M.; ASTON-JONES, G. & SHIEKHATTAR, R. Activation of *Locus coeruleus* neurons by nucleus paragigantocellular or noxious sensory stimulation is mediated by intracoerulear excitatory amino acid neurotransmission. **Brain Research**, v. 598, p. 185-195, 1992.

EUKER, J.S.; MEITES, J. & REIGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrated, and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, v.96, p.85-92, 1975.

FERNANDEZ-GUASTI, A. & PICAZO, O. Sexual differentiation modifies the allopregnanolone anxiolytic actions in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v.24, p.251-267, 1999.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R.M.; JIMENEZ, P. & TOBENA, A. Infantile stimulation and perinatal administration of Ro 15-1788: additive anxiety-reducing effects in rats. **Eur J Pharmacol**, v.191, p.111-114, 1990.

FICTH, R.H. & DENENBERG, V.H. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. **Behavioral and Brain Sciences**, v.21, p.311-352, 1998.

FORRAY, M.I. & GYSLING, K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Brain Research Reviews**, v.47: 145-160, 2004.

FOSSATI, I.A.M.; TREVIZAN, L. & LUCION, A.L. Interação entre esteróides gonadais e manipulação neonatal sobre comportamento de ratas adultas no labirinto em cruz elevado. **XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos...p.210, 2000.**

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**, v.18, p.971-976, 1997.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone and thyroid-stimulation hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.11391-11395, 1992.

FRANCIS, D.D; DIORIO, J.; LIU, D. & MEANEY, M.J. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. **Biol. Psychiatry**, v.46, p.1153-1166, 1999.

FRANTZ, P.J., GOMES, C.M. & LUCION, A.B. Efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento sexual de ratas. **X Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Resumos p. 225, 1998.**

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: **The Physiology of Reproduction**. Ed. E. Knobil and J. Neil et al. Raven Press, NY, cap. 45, p.613-657, 1994.

FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological reviews**. v.80, p.1523-1631, 2000.

FRYE, C.A. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiology and Behavior*, v.57, p.5-14, 1995.

FRYE, C.A. & SELIGA, A.M. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. **Cognitive, affective, & behavioral neuroscience**, v.1(4), p.371-381, 2001.

FRYE, C.A.; PETRALIA, S.M. & RHODES, M.E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3  $\alpha$ ,5  $\alpha$ -THP. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.67, p.587-596, 2000.

FRYE, C.A. & WALF, A. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. **Hormones and Behavior**, v.41:306-315, 2002.

GALA, R.L. The physiology and mechanisms of stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. **Life Sciences**, v.46, p.1407-1420, 1990.

GALA, R.R. & HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats, influence of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterona. **Neuroendocrinology**, v.43, p.115-123, 1986.

GAULIN, S.J. & FITZGERALD, R.W. Sexual selection for spatial-learning ability. **Animal behavior**, v.37, p.322-331, 1989.

GIBBS, D.M. & NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion *In Vivo*. **Endocrinology**, v.102, p. 1895- 1900, 1978.

GOMES, C.M. Efeito da manipulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de Mestrado (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**, v. 32, p. 1239-1242, 1999.

GOMES, C.M.; RAINEKI, C.; RAMOS DE PAULA, P.; SEVERINO, G.S.; HELENA, C.V.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; SANVITTO, G.L. & LUCION, A.B. Neonatal handling and reproductive function in female rats. **Journal of Endocrinology**, v.184(2), p.435-445, 2005.

GORSKI, R.A.; GORDON, J.H.; SHRYNE, J.E. & SOUTHAM, A.M. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **Brain Research**, v.148, p.333-346, 1978.

GORSKI, R.A. Editorial: estradiol acts via the estrogen receptor in the sexual differentiation of the rat brain, but what does this complex do? **Endocrinology**, v.133(2), p.431-432, 1993.

GOULD, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.743, p.73-93, 1994.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.14, p.239-265, 1981.



GRAY, G.D.; SMITH, E.R.; DAMASSA, D.A.; EHRENKRANZ, J.R.L. & DAVIDSON, J.M. Neuroendocrine mechanisms mediating the suppression of circulating testosterone levels associated with chronic stress in male rats. **Neuroendocrinology**, v. 25, p.247-256, 1978.

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

GRZANNA, R. & MOLLIVER, M.E. The Locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. **Neuroscience**, v.5, p.21-40, 1980.

GUDELSKY, G.A.; NANSEL, D.D. & PORTER, J.C. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. **Endocrinology**, v. 108(2), p.440-444, 1981.

GUNNET, J.W.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Comparison of the effects castration and steroid replacement on incerto-hypothalamic dopaminergic neurons on male and female rats. **Neuroendocrinology**, v.44, p.269,275, 1986a.

GUNNET, J.W.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Effects of gonadal steroids on tuberoinfundibular and tuberohypophysial dopaminergic neuronal activity in male and female rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.183, p.49-98, 1986b.

HAHN, J.D.; KALAMATIANOS, T. & COEN, C.W. Studies on the neuroanatomical basis for stress-induced oestrogen-potentiated suppression of reproductive function: evidence against direct corticotrophin-releasing hormone projections to the vicinity of luteinizing hormone-releasing hormone cell bodies in female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.732-742, 2003.

HARMS, P.G. & OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**, v. 36(3):391-2, 1974.

HASHI, A.; MAZAWA, S.; KATO, J. & ARITA, J. Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on the estrus in female rats. **Endocrinology**, v.136, p.4665-4671, 1995.

HASS, D.A.; BORGUNDAAG, B.; STURTRIDGE, W.C. & GEORGE, S.R. Hypothalamic corticotrophin-releasing factor immunoreactivity is reduced during induction of pituitary tumors by chronic estrogen treatment. **Life Science**, v.41, p.2101-2106, 1987.

HAMON, M.; GOETZ, C.; EUVRARD, C.; PASQUALINI, C.; Le DAFNIET, M.; KERDELHUE, B. et al. Biochemical and functional alterations of central GABA receptors during chronic estradiol treatment. **Brain Research**, v.279, p.141-152, 1983.

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

HELLRIEGEL, E.T. & D'MELLO, A.P. The effect of acute, chronic and chronic intermittent stress on the central noradrenergic system. **Pharmacol Biochem Behav**, v,57: 207-214, 1997.

HESEN, W. & JOELS, M. Modulation of 5-HT<sub>1a</sub> responsiveness in CA1 pyramidal neurons by in vivo activation of corticosteroid receptors. **Journal of Neuroendocrinology**, v.8, p.433-438, 1996.

HENTSCHEL, K.; FLECKENSTEIN, A.; TONEY, T.W.; LAWSON, D.M.; MOORE, K.E. & LOOKINGLAND, K.J. Prolactin regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons; immunoneutralization studies. **Brain Research**, v.852, p.28-36, 2000.

HERITAGE, A.S.; STUMPF, W.E.; SAR, M. & GHRAF, R. Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. **Science**, v.201, p.1377-1379, 1980.

HIROI, R. & NEUMAIER, J.F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioral Brain Research**, v.166, p.93-100,2006.

HOEFFLER, J.P.; BOOCKFOR, F.R. & FRAWLEY, L.S. Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. **Endocrinology**, v.117, p.187-195, 1985.

HOLT, J.A.; RICHERDS, J.S.; MIDGLEY,R.A.& REICHERT, L.E. Effect of prolactin on LH receptor in rat luteal cells. **Endocrinology**, v.98, p. 1005-1013, 1976.

HOOD, S.C & SCHWARTZ, N.B. Sex difference in serum luteinizing hormone postgonadectomy in the rat: role of gamma-aminobutyric acid-ergic inhibition. **Endocrine**, v.12(1): 35-40, 2000.

HSU, F-C.; ZHANG, G-J.; RAOL, Y.S.H.; VALENTINO, R.R.; COULTER, D.A. & BROOKS-KAYAL, A.R. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABAA receptors and behavioral stress responses. **PNAS**, v.110 (1), p.12213-12218, 2003.

IDA, Y., TSUDA, A., TSUJIMARU, S., SATOH, M., TANAKA, M. Pentobarbital attenuates stress-induced increases in noradrenalina release in specific brain regions of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.36: 953-956, 1990.

ITOI, K., SEASHOLTZ A.F.& WATSON, S.J. Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotrophin-releasing hormone neurons. **Endocr J**, v.45: 13-33, 1998.

JORGENSEN, H.; KNIGGE, U. & WARBERG, J. Effect of serotonin 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on the prolactin response to restraint and ether stress. **Neuroendocrinology**, v.56, p.371-377, 1992.

KAJI, H.; CHIHARA, K.; KITA,T; KASHIO, Y., OKIMURA, Y. & FUJITA, T. Administration of antisera to vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine attenuates ether-induced prolactin secretion in rats. **Neuroendocrinology**, v.41, p.529-531, 1985.

KALRA, S.P & KALRA, P.S. Do testosterone and estradiol-17 $\beta$  enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion? **Biology of Reproduction**, v.41:559-570, 1989.

KALRA, S.P.; PSUHPA, S.K.; CHEN, C.L. & CLEMENS, J.A. Effect of norepinephrine synthesis inhibitors and a dopamine antagonist on hypothalamic LHRH, serum gonadotrophin, and prolactin levels in gonadal steroid treated rats. **Acta Endocrinol**, v.89, p.1-9, 1978.

KAMBERI, I.A.; MICAL, R.S. & PORTER, J.C. Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. **Endocrinology**, v.88, p.1288-1293, 1971.

KARMAN, B.N. & TISCHKAU, S.A. Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. **Biol Reprod**, v.75(4): 624-632, 2006.

KAYSER, U.B.; JAKUBOWIAK, A.; STEINBERGER, A. & CHIN, W.W. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. **Endocrinology**, v.133:931-934, 1993.

KAWAKAMI, S & WINTERS, S.J. Regulation of luteinizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perfused pituitary cells from male monkeys and rats. **Endocrinology**, v.140(8): 3587-3593, 1999.

KELLY, D.D. Sexual differentiation of the nervous system. In: Kandel, E.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M., eds. **Principles of Neural Sciences**. New York: Elsevier, p.959-973, 1991.

KITAZAWA, S.; SHIODA, S. & NAKAI, Y. Catecholaminergic innervation of neurons containing corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. **Acta Anat.** (Basel), v.129. p.337-343, 1987.

KNIGGE, U.; MATZEN, S. & WARBERG, J. Histaminergic mediation of stress-induced release of prolactin in male rats. **Neuroendocrinology**, v.47, p.68-74, 1988.

KONSTANDI, M.; JOHNSON, E.; LANG, M.; MALAMAS, M. & MARSELOS, M. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. **Pharmacological Research**, v.41, p. 341-346, 2000.

KOOB, G.F. & HEINRICHS, S.C. A role for corticotrophin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. **Brain Research**, v.848, p. 141-152, 1999.

KRIEG, R. J. JR.; LAMBERTS, S.W.J. & MACLEOD, R.M. Paradoxical suppression of prolactin secretion: involvement of catecholaminergic mechanisms and the adrenal gland. **Acta Endocrinologica**, v. 105, p. 463-467, 1984.

KUHN, C.M., PAUK, J. & SCHANBERG, S. M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Psychobiology**, v.23, p. 395-410, 1990.

LAMBADJIEVA, N.D. Influence of testosterone on some behavioral reactions of male immature rats. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.20:673-677, 1998.

LANGELIER, P. & McCANN, S.M. The effects of interruption of the ventral noradrenergic pathway on the proestrous discharge of prolactin in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.154, p.553-557, 1977.

LENOX, R.H.; KANT, G.J.; SESSIONS, G.R.; PENNINGTON, L.L.; MOUGEY, E.H. & MEYERHOFF. Specific hormonal and neurochemical responses to different stressors. **Neuroendocrinology**, v.30, p.300-308, 1980.

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

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

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

LEVINE, R.S., HALTMEYER, G.C. KARAS, G.G. & DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**, v.2, p.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**, v. 24, p. 547-558, 1991.

LITTERIA, M. Long-term effects of neonatal ovariectomy on cerebellar development in the rat: a histological and morphometric study. **Developmental Brain Research**, v.81, p.113-120, 1994.

LIU, D.; CALDJI, C.; 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**, v.12, p.5-12, 2000.

LIU, D.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v.277, p.1659-1662, 1997.

LONG, J.A. & EVANS, H.M. The oestrus cycle in the rat and its related-phenomena. **Mem. Univer. Calif.**, v.6, p.1-148, 1922.

LOOKINGGLAND, K.J.; IRELAND, L.M.; GUNNET, J.W.; MANZANARES, J.; TIAN, Y. & MOORE, K.E. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations in discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. **Brain Research**, v.559 (1): 82-88, 1991.

LOPEZ-CALDERON, A.; GONZALEZ-QUIJANO, M.I.; TRESGUERRES, J.A. & ARIZNAVARRETA, C. Role of LHRH in the gonadotrophin response to restraint stress in intact male rats. **Journal of Endocrinology**, v. 124(2), p.241-246, 1990.

LUCION, A.B.; MACHADO, F.; TREVIZAN, L. & FOSSATI, I.A.M. Gonadectomy before puberty annuls the effects of neonatal handling on behavior of adult males. **International Society for Developmental Psychobiology Annual**, 1999.

LUCION, A.B.; CHARCHAT, H.; PEREIRA, G.A.M. & RASIA-FILHO, A. A influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiology and Behavior**, v.60, p.1419-1423, 1996.

LUCION, A.B., PEREIRA, F.M., WINKELMAN, E.C., SANVITTO, G.L., ANSELMO-FRANCI, J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behav Neurosci**, v.117: 894-903, 2003.

McCANN, S.M.; KARANTH, S.; MASTRONARDI, C.A.; DEES, W.L.; CHILDS, G.; MILLER, B.; SOWER, S. & YU, W.H. Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin. **Arch. Med. Res.** V.32(6):476-485, 2001.

McCANN, S.M.; KIMURA, M.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V. & YU, W.H. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRH, NO, cytokines, and leptin. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15(5), p.333-344, 1998.

MACLEOD, R.M. & LEHMEYER. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. **Endocrinology**, v. 94, p. 1077-1085, 1974.

MAEDA, K.I.; CAGAMPANG, F.R.A.; COEN, C.W. & TSUKAMURA, H. Involvement of the catecholaminergic input to the paraventricular nucleus and of corticotrophin-releasing hormone in the fasting-induced suppression of luteinizing hormone release in female rats. **Endocrinology**, v.134, p.1718-1722, 1994.

MAGGI, A. & PEREZ, J. Progesterone and estrogens in rat brain: modulation of GABA ( $\alpha$ -aminobutyric acid) receptor activity. **Eur J Pharmacol**, v.103, p.165-168, 1984.

MANN, D.R.; EVANS, D.C.; JACOBS, V.L. & COLLINS, D.C. Influence of acute intracerebroventricular (i.c.v) administration of adrenocorticotrophin (ACTH) on LH secretion in male rats: effect of pretreatment (i.c.v) with ACTH antiserum on the serum LH response to an acute ether stress. **Journal of Endocrinology**, v.108, p.275-280, 1986.

MANN, D.R. & ORR, T.E. Effect of restraint stress on gonadal proopiomelanocortin peptides and the pituitary-testicular axis in rats. **Life Science**, v.46, p. 1601-1609, 1990.



MARTÍ, O. & ARMARIO, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. **Int.J.Devl. Neuroscience**, v.16, p.241-260, 1998.

MARTIN, A.L.; FERNANDEZ-RUIZ, J. & LÓPEZ-CALDERÓN, A. Effects of catecholamine syntheses inhibitors and adrenergic receptor antagonists on restraint-induced LH release. **Journal of Endocrinology**, v.144(3), p.511-515, 1995.

MASWOOD, S.; BARTER, J.E.; WATKINS, L.R. & MAIER, S.F. Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Brain Research**, v.783, p.115-120, 1998.

McCORMICK, C.M.; FUREY, B.F.; CHILD, M.; SAWYER, M.J. & DONOHUE, S.M. Neonatal sex hormones have organizational effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. **Brain Research Developmental Brain Research**, v.105(2), p.295-307, 1998.

McGIVERN, R.F. & REDEI, E. Adrenalectomy reverses stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in long-term ovariectomized rats. **Physiology and Behavior**, v. 55, p.1147-1150, 1994.

MEADOR-WOODRUFF, J.H.; MANSOUR, A.; BUNZOW, J.R.; VAN TOL, H.H.M.; WATSON, S.J. & CIVELLI, O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.7625-7628, 1989.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; WIDDOWSON, J.; LaPLANTE, P.; CALDJI, C.; EEKL, J.R. & PLOTSKY, P.M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Dev Neurosci**, v.18, p.49-72, 1996.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 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 behavioural stress reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, v.11, p.925-933, 1999.

MELIA, K.R. & DUMAN, R.S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.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**, 1978. p. 215-246.

MITCHELL, J.C.; LI, X.F.; BREEN, J.; THALABARD, C. & O'BYRNE, K.T. The role of the *Locus coeruleus* in corticotrophin-releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v.146(1), p.323-331, 2005.

MOGUILEVSKY, J.A.; CARBONE, S. & SZWARCFARB, B. Changes in the effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on prolactin secretion during sexual maturation in female rats. **Endocrinology**, v.131(1), p.458-462, 1992.

MOHANKUMAR, P.S; MOHANKUMAR, S.M.; L.; QUADRI, S.K. & VOOGT, J.L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopaminergic neurons. **Brain Res Bull**, v.42, p.435-441, 1997.

MOHANKUMAR, P.S; MOHANKUMAR, S.M.; ARBOGAST, L.; QUADRI, S.K. & VOOGT, J.L. Effects of chronic hyperprolactinemia on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.217, p.461-465, 1998.

MURPHY, A.Z.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T. & BEHBEHANI, M.M. Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of Fos

expression in discrete areas of the rat brainstem. A double-labeling study for Fos and catecholamines. **J. Comp. Neurol.** V.349, p.36-50, 1994.

NATHORST-BOOS, J.; VON SCHOULTZ, B. & CARLSTROM, K. Elective ovarian removal and estrogen replacement therapy – effects on sexual life, psychological well-being, and androgen status. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology**, v.14, p.283,293, 1993.

NEILL, J.D. Effect of “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, v. 87, p. 1192-1197, 1970.

NOEL, G.L.; SUH, H.K.; STONE, J.G. & FRANTZ, A. G. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other condition of stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.35, p. 840-851, 1972.

NÚÑEZ, J.F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, M.; TOBEÑA, A. & FÉRNANDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. **Physiology & Behavior**, v.60(5), p.1355-1359, 1996.

OJEDA, S.R.; JAMESON, H.E. & McCANN, S.M. Plasma prolactin levels in maturing intact and cryptorchid male rats: development of stress response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.151, p.310-315, 1976.

OLIVEIRA, M.C.; MORAES, J.T; BARROS, H.M.T. & BARBOSA-COUTINHO, L.M. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.521-525, 1996.

ONO, N.; LUMPKIN, M.D.; SAMSON, W.K.; McDONALD, J.K. & McCANN, S.M. Intrahypothalamic action of corticotrophin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. **Life Science**, v.35, p.1117-1123, 1984.

PACÁK, K., ARMANDO, I., FUKUHARA, K., KVETNANSKY, R., PALKOVITS, M., KOPIN, I.J., GOLDSTEIN, D.S. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, 589, 91-96, 1992.

PACÁK, K. & PALKOVITS, M. stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v.22 (4), p. 502-548, 2001.

PACÁK, K., PALKOVITS, M., KVETNANSKY, R., YADID, G., KOPIN, I.J., GOLDSTEIN, D.S. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and the pituitary-adrenocortical axis. **Ann N Y Acad Sci**, v.771: 115-130, 1995.

PADOIN, M.J., CADORE, L.P. & LUCION, A.B. Efeito do estresse crônico neonatal sobre comportamento sexual de machos e agressivo maternal de ratos. **X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p.36, 1995.

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**, v.115(6), p.1332-1340, 2001.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain Research**, v.59: 449-450, 1973.

PANAGIOTAROPOULOS, T., PAPAIOANNOU, A. PONDIKI, S., PROKOPIOU, A., STYLIANOPOULOU, F., GEROZISSIS, K. (2004). Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. **Neuroendocrinology**, 79 (2), 109-118.

PAPAIOANNOU, A. GEROZISSIS, K., PROKOPIOU, A., BOLARIS, S. STYLIANOPOULOU, F. Sex differences in the effects of neonatal handling on

the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behavior. (2002). **Behav Brain Res**, 129(1-2), 131-139.

PAXINOS, G. & WATSON, C. In: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition New York: Academic Press, 1986.

PEARLSTEIN, T.; ROSEN, K. & STONE, A.B. Mood disorders and menopause. **Endocrinology and Metabolism Clinical Studies in North America**, v.26, p.279-294, 1997.

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

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. **Mol Brain Res**, v.18, p.195-200, 1993.

PLOTSKI, P.M. Facilitation of immunoreactive corticotrophin-releasing factor secretion into the hypophyseal-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. **Endocrinology**, v.121: 924-930, 1987.

PLOTSKY, P.M., Cunningham, E.T., Widmaier, E.P. Catecholaminergic modulation of corticotrophin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. **Endocrine Rev**, v.10: 437-458, 1989.

POLETINI, M. de O. Participação do *Locus coeruleus* na secreção de prolactina induzida por estresse em ratos machos e em fêmeas em diferentes condições hormonais. Dissertação de Mestrado em Fisiologia - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1998.

PONTIROLI, A.E.; BAILO, G.; STELLA, L.; ET ALL. Effects of naloxene on prolactin, luteinizing hormone, and cortisol responses to surgical stress in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.55, p- 378-380, 1982.

PORTER, T.E.; CHAPMAN, L.E.; VAN DOLAH, F.M. & FRAWLEY, L.S. Normal differentiation of prolactin cells in neonatal rats requires a maternal signal specific to early lactation. **Endocrinology**, v.128, p.792-796, 1991a.

PORTER, T.E. & FRAWLEY, L.S. Stimulation of prolactin differentiation in vitro by a milk-borne peptide. **Endocrinology**, v.129, p.2707-2713, 1991b.

RASIA-FILHO, A.A. & LUCION, A.B. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. **Hormones and Behavior**, v.30, p.251-258, 1996.

RAYMOND, V.; BEAULIEU, M.; LABRIE, F. & BOISSIER, J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. **Science**, v.200, p.1173, 1175, 1978.

RICHARD, P.; MOOS, F. & FREUND-MERCIER, M.J. Central effects of oxytocin. **Physiol. Ver.**, v.71, p.31-70, 1991.

RIVIER, C.; BROWN, M. & VALE, W. Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by  $\beta$ -endorfina. **Endocrinology**, v.100, p.751-754, 1977.

RIVIER, C.; RIVIER, J. & VALE, W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: Role of endogenous corticotrophin-releasing factor. **Science**, v.231, p.607-609, 1986.

RIVIER, C.; VALE, W.; LING, N.; BROWN, M. & GUILLEMIN, R. Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by  $\beta$ -endorfina. **Endocrinology**, v.100, p.238-241, 1977.

ROOZENDAAL, M.M.; SWARTS, H.J.; WIEGANT, V.M. & MATTHEIJ, J.A. Effect of restraint stress on the preovulatory luteinizing hormone profile and ovulation in the rat. **Eur J Endocrinol**, v.133, p.347-353, 1995.

ROOZENDAAL, M.M.; SWARTS, H.J.; WOLBERS, W.B. THREELS, A.; WIEGANT, V.M. & MATTHEIJ, J.A. Effect of CRH on the preovulatory LH and FSH surge in the cyclic rat: a role for arginine vasopressin? **Journal of Neuroendocrinology**, v.8, p.765-770, 1996.

RUBIN, B.S. Hypothalamic alterations and reproductive aging in female rats: evidence of altered luteinizing hormone-releasing hormone neuronal function. **Biol. Reprod.** V.63(4): 968-976, 2000.

RUBINOW, D.R.; SCHMIDT, P.J. & ROCA, C.A. Estrogen-serotonin interactions: implications for affective regulation. **Biol Psychiatr**, v.44, p.839,850, 1998.

SAGAE, S.C.; DONADIO, M.V.F.; RAINEKI, C.; TREVIZAN, L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & SANVITTO, G. Efeito da microinjeção de losartan no núcleo arqueado sobre a concentração de prolactina em resposta ao estresse em ratas lactantes. **XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos...p.161**, 2001.

SAKLY, M. & KOCH, B. Ontogenetical variations of transcortin modulate glucocorticoid receptor function and corticotropic activity in the pituitary gland. **Hormone and Metabolic Research**, v.15, p.92-96, 1983.

SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanism and the stress hyporesponsive period. **Brain Res Ver**, v. 11, p.65-76, 1986.

SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance or glucocorticoid endangerment of hippocampus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.746, p.294-307, 1994.

SAR, M. Estradiol is concentrated in tyrosine hydroxylase-containing neurons of the hypothalamus. **Science**, v.223, p.938-940, 1984.

SAWCHENCO, P.E.& SWANSON, L.W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Res. Ver.**, v.4, p.285-325, 1982.

SEVERINO, G.S. Efeito da manipulação neonatal sobre a liberação de prolactina em resposta ao estresse em ratas. Dissertação de Mestrado em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

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 and the behavior and prolactin stress response in male and females rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology and Behavior**, v. 81, p.489-498, 2004.

SHAAR, C.J. & CLEMENS, J.A . The role of catecholamines in the release of anterior pituitary *In Vitro*. **Endocrinology**, v. 95, p. 1202-1212, 1974.

SHARPE, R.M. & MCNEILLY, A.S. The effect of induced hyperprolactinemia on Leydig cell function and LH-induced loss of LH-receptors in the rat testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 16, p.19, 1979.

SHIN, S.H. Prolactin secretion in acute stress is controlled by prolactin releasing factor. **Life Sciences**, v.25, p.1829, 1979.

SHULL, J.D. & GORSKI, J. Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17  $\beta$ -estradiol dose. **Endocrinology**, v.124, p.279-285, 1989.

SIEGEL, R.A.; WEIDENFELD, J.; FELDMAN, S.; CONFORTI, N. & CHOWERS, I. Neural pathways mediating basal and stress-induced secretion



of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone in the rat. **Endocrinology**, v.108, p.2302-2307, 1981.

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. **The Journal of Comparative Neurology**, v.294, p.76-95, 1990.

SLOB, A.K.; BOGERS, H. & VAN STOLK, M.A. Effects of gonadectomy and exogenous gonadal steroids on sex differences in open field behavior of adult rats. **Behavior Brain Research**, v.2(3), p.347-362, 1981.

SMITH, M.A; KIM, S-Y.; VAN OERS, H.J..J. & LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. **Endocrinology**, v.138, p.4622-4628, 1997.

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 associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v.96, p. 219-226, 1975.

STAMATAKIS, A.; MANTELAS, A.; PAPAIOANNOU, A.; PONDIKI, S.; FAMELI, M. & STYLIANOPOULOU, F. Effect of neonatal handling on serotonin 1A subtype receptors in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 1440, p,1-11, 2006.

STONE, E.A. Neurochemical and behavioral effects of severe stress. **Psychopharmacol Bull**, v. 11(3):71-71, 1975.

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

SVARE, B.; BARTKE, A.; MASON, I.; MICHAEL, S.D. & SMITH, M.S. Hyperprolactinemia suppresses copulatory behavior in male rats and mice. **Biology of Reproduction**, v.21, p. 529, 1979.

SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F.; LAURENT, A.; GIBAUD, R. & ASSENMACHER, I. Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat. **Endocrinology**, v. 121(3):883-892, 1987.

SZAWKA, R.E.; POLETINI, M. de O.; FRANCI, C.R. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Estudo do pico secundário de prolactina na tarde de estro: participação do estradiol e do Locus coeruleus. **XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos...p. 204**, 2000.

SWANSON, L.W. & SAWWCHENKO, P.E. Hypothalamic ontegration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Ann Rev Neurosci**, v.6: 269-324, 1983.

TACHE, Y.; DuRUISSEAU, P.; TACHE, J.; SELYE, H. & COLLU, R. Shift in adenohipophyseal activity during chronic intermittent immobilization of rats. **Neuroendocrinology**, v. 22, p.325-336, 1976.

TAKAHASHI, L.K. Role of CRF (1) and CRF (2) receptors in fear and anxiety. **Neuroscience Biobehavior**, v.25, p.627-636, 2001.

TANAKA, M., KOHNO, Y., NAKAGAWA, R., IDA, Y., TAKEDA, S., NAGASAKI, N. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v.16: 315-319, 1982.

TJURMINA, O.A., GOLDSTEIN, D.S. PALKOVITS, M., KOPIN, I.J. Alfa2-Adrenoceptor-mediated restraint of norepinephrine synthesis, release, and turnover during immobilization in rats. **Brain Research**, v.826: 243-252, 1999..

TODESCHIN, A. S. Efeito da manipulação e da separação dos filhotes no período neonatal sobre o comportamento da mãe. **Dissertação (Mestrado em Neurociências)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

TODESCHIN, A.S.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; AIMI, M.; CECCONELLO, A.L. & LUCION, A.B. A manipulação neonatal provoca redução do número de neurônios parvocelulares ocitocinérgicos no PVN em ratas adultas. **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos, 2005.

TURPEN,C.; JOHNSON, D.C. & DUNN, J.D. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. **Neuroendocrinology**, v.20, p.339-351, 1976.

VALENTINO, R.J. & FOOTE, S.L. Activation of noradrenergic Locus coeruleus by hemodynamic stress in due to local release of corticotropin-releasing factor. **Brain Research**, v. 555, p.25-34, 1991.

VALENTINO, R.J.; CURTIS, A.L. & PAGE, M.E. Activation of the *Locus coeruleus* brain noradrenergic system during stress: circuitry, consequences, and regulation. **Adv. Pharmacol.**, v.42, p.781-784, 1998.

VASQUEZ, J.M.; NAZIAN, S.J. & MAHESH, V.B. Pituitary sensitivity to LHRH in hyperprolactinemia induced by perphenazine and renal pituitary transplants in female rats. **Biology of Reproduction**, v.22, 986, 1980.

VELLÉE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; LE MOAL, M.; SIMON, H. & MACCARI, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p.2626-2636, 1997.

XU, J-F.; CHEN, X-Q. & DU, J-Z. CRH receptor type 1 mediates continual hypoxia-induced changes of immunoreactive prolactin and prolactin mRNA expression in rat pituitary. **Hormones and Behavior**, v.49, p.181-189, 2006.

YU, W.H & McCANN, S.M. Feedback of follicle-stimulating hormone to inhibit luteinizing hormone and stimulate follicle-stimulating hormone release in male rats. **Neuroendocrinology**, v.53, p.453-459, 1991.

WAKABAYASHI, I; ARIMURA, A . & SCHALLY, A .V. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.137, p.1193-1198, 1971.

WALF, A.A. & FRYE, C.A. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Neuropsychopharmacology**, v.30(7), p. 1288-1301, 2005.

WALKER C-L.; PERRIN, M.; VALE, W. & RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 118 (4), p. 1445-1451, 1986.

WARREN ,S.G. & JURASKA, J.M. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. **Behavioral Neuroscience**, v.111(2), p.259-266, 1997.

WILLIAMS, C.L. & MECK, W.H. The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. **Psychoneuroendocrinology**, v.16, p.155-176, 1991.

WINKELMANN, E.C.; CAGOL, T.S.; LUCION, A.B.; BITTENCOURT, L.C.; SCHUH, A.S. & SANVITTO, G.L. Efeito da manipulação neonatal na densidade de neurônios do hipocampo. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. **Resumos**, 2005.