

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

**Efeito do estresse sobre o comportamento sexual de fêmeas: participação da
Angiotensina II**

Dissertação de Mestrado

Helena Cláudia de Pelegrin Basso Feil

Porto Alegre, 2010

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

**Efeito do estresse sobre o comportamento sexual de fêmeas: participação da
Angiotensina II**

Helena Cláudia de Pelegrin Basso Feil

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Dissertação 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 Mestre em Fisiologia.

Porto Alegre, 2010

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Gilberto Sanvitto, pela oportunidade de ingressar na sua linha de pesquisa; pelo auxílio e pelos ensinamentos em todos os momentos do desenvolvimento desta dissertação.

Ao professor Dr. Celso Rodrigues Franci e à professora Dra. Carla Dalmaz, pela assistência nas dosagens hormonais. Também à Luisa Diehl, sempre disposta a contribuir.

À professora Dra. Matilde Achaval, pela disponibilidade dos equipamentos do seu laboratório. À Lígia Centenaro, pelo auxílio técnico.

À Ana Lúcia, pela dedicação que transcende as atribuições de uma colega de laboratório: auxílio nas técnicas, nas leituras e na escrita; e, especialmente, pelo carinho e afeto.

À Déborah, à Vanise e ao Bruno, pelo nosso ótimo convívio e pelo auxílio na parte experimental.

À Marcinha, à Kika, ao Adolfo e ao Felipe, pelos bons momentos vividos no laboratório e fora dele. Aos demais colegas do laboratório 11, pelas conversas e pelas trocas de experiências.

À minha família, Grimalda, Lauri e Eloísa, pelo apoio, pela torcida e pela permanente sensação de conforto.

Ao Gabriel, pela companhia, pelos bons momentos compartilhados e pelo incentivo constante.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Estresse.....	9
1.2 Estresse e Comportamento Sexual.....	12
1.3 Hormônio Liberador de Corticotropina e Comportamento Sexual.....	16
1.4 Angiotensina II.....	19
1.5 Núcleo Paraventricular Hipotalâmico.....	25
2. HIPÓTESE.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Desenho Experimental.....	29
4.2.1 Experimento I: <i>Efeito da administração sistêmica crônica de Losartan sobre a inibição do comportamento de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção</i>	29
4.2.2 Experimento II: <i>Efeito da microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, sobre a inibição do comportamento de fêmeas produzida pelo estresse agudo de contenção</i>	30
4.3 Verificação do Ciclo Estral.....	31
4.4 Seleção dos machos utilizados.....	32
4.5 Anestesia.....	32
4.6 Cirurgia Estereotáxica.....	33
4.7 Microinjeção de Losartan e Salina.....	35

4.8 Administração crônica de Losartan na água de beber.....	35
4.9 Estresse por Contenção.....	35
4.10 Comportamento Sexual.....	36
4.11 Histologia.....	37
4.12 Dosagem Hormonal.....	38
4.13 Manuseio de Reagentes e Destino dos Resíduos da Pesquisa.....	38
4.14 Análise Estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Experimento I: <i>Efeito da administração sistêmica crônica de Losartan sobre a inibição do comportamento de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção</i>	39
5.2 Experimento II: <i>Efeito da microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, sobre a inibição do comportamento de fêmeas produzida pelo estresse agudo de contenção</i>	41
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

Ang II: angiotensina II

CRH: hormônio liberador de corticotropina

ECA: enzima conversora de angiotensinogênio

GABA: ácido gama-aminobutírico

GnRH: hormônio liberador de gonadotropinas

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPG: eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

LC: locus coeruleus

LH: hormônio luteinizante

MeA: amígdala medial

MPOA: área pré-óptica medial

NA: noradrenalina

POMC: pró-opiomelanocortina

PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico

SNA: sistema nervoso autônomo

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

RESUMO

Situações estressantes provocam a ativação dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e simpato-adrenal. A ativação destes sistemas leva a alterações comportamentais e periféricas que melhoram a habilidade do organismo para enfrentar a ameaça estressora e retornar à homeostase, aumentando, desta forma, a sua chance de sobrevivência. Dentre as alterações produzidas pela resposta ao estresse inclui-se a inibição da função reprodutiva, atribuída à ação central do hormônio liberador de corticotropina (CRH). Além da ativação dos eixos HPA e simpato-adrenal, os estímulos estressantes aumentam o nível de Angiotensina II (Ang II) central e periférico. Além das múltiplas funções bem conhecidas na regulação do equilíbrio hídrico e da pressão arterial, a Ang II exerce também um papel inibidor do comportamento sexual e é um importante estimulador do eixo HPA, por estimular a secreção do CRH. Neste trabalho foi testada a hipótese de que a inibição do comportamento sexual, produzida pelo estresse, ocorre via estimulação do eixo HPA, pela Ang II, na porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). Para tanto, o trabalho foi dividido em dois experimentos. O primeiro estudou o “Efeito da administração sistêmica crônica de Losartan sobre a inibição do comportamento de fêmeas, produzido pelo estresse agudo de contenção”, enquanto o segundo analisou o “Efeito da microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, sobre a inibição do comportamento de fêmeas produzido pelo estresse agudo de contenção”. Foram utilizadas ratas Wistar adultas, com ciclos estrais regulares, divididas em quatro grupos, em cada experimento. A administração de Losartan se deu de forma sistêmica (na água de beber) ou local (microinjeção na porção parvocelular do PVN), conforme o experimento. O protocolo de estresse agudo utilizado foi o de contenção, o qual teve duração de 15 minutos. O registro do comportamento sexual, com a finalidade de analisar a receptividade sexual da fêmea, teve duração de 30 minutos. Imediatamente após tal registro, todos os animais foram decapitados para coleta de sangue e posterior dosagem hormonal de corticosterona. Os resultados mostraram que o estresse agudo por contenção, na noite do proestro, provoca uma redução significativa no quociente de lordose da fêmea e que esse efeito é prevenido pela administração de Losartan, na água de beber ou injetado localmente no PVN. Estes resultados indicam uma participação da Ang II na inibição do comportamento sexual produzida pelo estresse; esta ação ocorre por meio dos receptores AT1, na porção parvocelular do PVN. Este contexto sugere a possibilidade de que a inibição do comportamento sexual, provocada pelo estresse, não se dá por um efeito direto da Ang II sobre áreas moduladoras deste comportamento, e sim por meio do aumento da secreção de CRH, sabidamente um inibidor direto do comportamento sexual.

ABSTRACT

Stressful situations cause the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and the sympathetic-adrenal axis. The activation of those systems leads to behavior and peripheral alterations that improve the ability of the organism to face the stressful threat and return to homeostasis, increasing, this way, the chances of survivor. Among the alterations produced by the answer to the stress it is included the reproductive function, given to the central action of the corticotropin-releasing hormone (CRH). Beyond the activation of the HPA axis and the sympathetic-adrenal axis, the stressful stimulus increases the level of Angiotensin II (Ang II) central and peripheral. Besides the multiple well-known functions in the regulation of the water balance and blood pressure, the Ang II also performs an inhibitor role of the sexual behavior and is an important stimulator from HPA axis, for stimulating the CRH secretion. In this paper was tested the hypothesis that the inhibition of the sexual behavior, produced by the stress, happens by way of stimulation of the HPA axis, by the Ang II, in the parvocellular portion of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). For this, the paper has been divided into two experiments. The first studied the "Effect of the chronic systemic administration of Losartan about the inhibition on the behavior of females, produced by the acute restraint stress", while the second one analyzed the "Effect of microinjection of Losartan in the parvocellular portion of the PVN, about the inhibition on the behavior of females produced by the acute restraint stress." Wistar adults females rats were used, with regular estrous cycles, divided into four groups, in each experiment. Losartan was used in a systematic way (in their drinking water) or local (microinjection in the parvocellular portion of the PVN), according to the experiment. The protocol of acute stress used was restraint, in which lasted for 15 minutes. The sexual behavior registry, aimed to analyze the sexual acceptance of the female, lasted for 30 minutes. Right after the registry, all animals were beheaded to blood collection and afterwards the measurements of hormonal corticosterone. The outcome showed that the acute stress of restraint, in the night of the proestrus, causes a relevant decrease in the lordosis quotient of the female and that this effect is prevented by using Losartan, in the drinking water or injected in the PVN. These results imply a role of Ang II in the inhibition of the sexual behavior produced by the stress; this action happens by means of the AT1 receptors, in the parvocellular portion of the PVN. This context suggest the possibility that the inhibition of the sexual behavior, caused by the stress, isn't due to a direct effect of Ang II about the modulating areas of this behavior, and yes by the increase of the CRH secretion, well-known direct inhibitor of sexual behavior.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

O estresse é resultado de um acúmulo de mudanças fisiológicas e psicológicas que ocorrem em resposta a alterações ambientais e estimulações nocivas aplicadas ao corpo de um animal (SELYE, 1936). Em outras palavras, pode-se afirmar que o estresse compreende qualquer fator que induza tensão fisiológica ou psicológica ao indivíduo (HAUSSMANN *et al.*, 2007). Restrição de espaço, exposição a baixas temperaturas e estimulações nocivas têm sido indicadas como indutoras de uma variedade de doenças, incluindo úlcera gástrica, hipertrofia adrenal e desordens funcionais no sistema nervoso autônomo (SNA) e no sistema endócrino (CHROUSOS & GOLD, 1992; TANAKA *et al.*, 1998; KOOB, 1999). Está bem estabelecido que as desordens relacionadas ao estresse ocorrem devido à ativação dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e/ou simpato-adrenal (HORI *et al.*, 2004). A ativação destes sistemas leva a alterações comportamentais e periféricas que melhoram a habilidade do organismo para ajustar a homeostase e aumentar a sua chance de sobrevivência (CHROUSOS & GOLD, 1992).

A ativação do eixo HPA envolve a liberação central do hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual provoca um aumento nas secreções do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol (em humanos)/corticosterona (em roedores), bem como a ativação do sistema nervoso simpático, com aumento na liberação de glicose, elevação dos batimentos cardíacos e da pressão sanguínea. Por sua vez, a ativação, pelo estresse, do eixo simpato-adrenal, resulta na liberação de noradrenalina e acentuado estado de alerta e ansiedade (CHROUSOS & GOLD, 1992; CHROUSOS *et al.*, 2007).

Pode-se, ainda, definir o estresse como sendo uma condição em que um animal é incapaz de manter um estado fisiológico normal, devido a vários fatores que estão afetando seu bem-estar (FRANCIS-FLOYD, 1997). Nessa perspectiva, as situações estressantes evocam respostas adaptativas nos organismos, numa tentativa de restabelecer a homeostasia. A resposta adaptativa ao estresse parece depender do tipo (físico ou emocional), da intensidade e duração do estímulo (agudo ou crônico), bem como das características e do estado psicológico do organismo em questão (DE WIED, 1977).

O organismo reage ao estresse ativando um complexo repertório de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais, através do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP); entretanto, se tais respostas forem inadequadas ou excessivas e/ou prolongadas, podem afetar a personalidade e o comportamento, além de causar muitas consequências adversas no crescimento, na circulação, na reprodução e na resposta imune (CHROUSOS, 2002).

Várias estruturas cerebrais estão envolvidas na resposta ao estresse. O conjunto de componentes mobilizados para a adaptação do organismo a situações estressantes é designado como sistema de estresse, o qual possui componentes do SNC e do SNP. O controle central deste sistema está localizado no hipotálamo e no tronco cerebral e inclui os neurônios parvocelulares, do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), que secretam o hormônio liberador de corticotropina e a vasopressina, e o locus coeruleus. Por sua vez, os componentes periféricos incluem o eixo hipófise-adrenal, juntamente com o sistema eferente simpático-adrenomedular, além dos componentes do sistema parassimpático (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). Uma reação apropriada do sistema de estresse é uma condição prévia essencial para a sensação de bem estar, performance de trabalho e interação social. Por outro lado, uma reação inapropriada desse sistema pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento, além de

causar distúrbios endócrinos, metabólicos, auto-imunes e psiquiátricos (CHARMANDARI, 2005).

Os componentes centrais do sistema de estresse trabalham numa perspectiva de facilitar as funções neurais, acentuando o estado de alerta e de vigília, a cognição e a atenção. Além disso, provocam aumento na analgesia e elevações na temperatura corporal, com concomitante inibição das funções vegetativas, tais como apetite, alimentação e reprodução. Alterações periféricas ocorrem principalmente para promover um redirecionamento de energia corporal; deste modo, oxigênio e nutrientes são direcionados para o SNC e para locais corporais ameaçados. Aumentos no tônus cardiovascular, na pressão sanguínea, na frequência respiratória e no metabolismo intermediário (gliconeogênese e lipólise), juntos, promovem a disponibilidade de substratos vitais (CHROUSOS *et al.*, 2007).

Em situações não-estressantes, o hormônio liberador de corticotropina e a vasopressina são secretados no sistema hipofisário portal de forma circadiana, pulsátil, com uma frequência de, aproximadamente, dois a três episódios secretórios por hora. Em humanos, durante o estresse agudo a amplitude e a sincronização das pulsações de CRH e vasopressina, no sistema porta, notavelmente aumentam, resultando, portanto, em uma ampliação dos episódios secretórios do ACTH e de cortisol (CHROUSOS, 1992). O ACTH circulante é um regulador chave da secreção de glicocorticóides, pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides são os efetores finais do eixo HPA e participam do controle da homeostase corporal e da resposta do organismo ao estresse. Eles exercem papel regulatório na atividade basal do eixo HPA e no término da resposta ao estresse, pela ação em centros extra-hipotalâmicos (tais como hipocampo e córtex pré-frontal), no hipotálamo e na glândula hipófise (DE KLOET, 1991; CHROUSOS *et al.*, 2007). O *feedback* negativo dos glicocorticóides, na resposta secretória do ACTH, atua para limitar a duração da exposição

dos tecidos aos glicocorticóides, minimizando, assim, os efeitos catabólicos, anti-reprodutivos e imunossupressores destes hormônios.

O locus coeruleus e outros grupos celulares noradrenérgicos da medula e da ponte constituem o sistema locus coeruleus/noradrenalina (LC/NA). A noradrenalina cerebral funciona como um sistema de alarme que diminui as funções neurovegetativas, tais como alimentação e sono, e contribui para o aumento das respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse, incluindo a ativação do eixo HPA. Conexões neurais recíprocas existem entre o CRH e o sistema locus coeruleus/noradrenalina, com o CRH e a noradrenalina estimulando um ao outro (CHROUSOS, 1998). Muitos neurotransmissores, incluindo a serotonina e a acetilcolina, excitam os neurônios CRH e LC/NA (WONG *et al.*, 1994). Por sua vez, os glicocorticóides, o ácido gama-aminobutírico (GABA), o ACTH e muitos peptídeos opióides inibem ambos os neurônios CRH e LC/NA (CALOGERO *et al.*, 1988).

Diante das consequências adversas causadas pelas situações estressantes, para o foco deste trabalho, a mais relevante é a interrupção da fisiologia e do comportamento reprodutivo.

1.2 Estresse e Comportamento Sexual

No comportamento sexual de roedores uma característica relevante do comportamento de receptividade sexual da fêmea é sua postura durante a cópula, denominada reflexo de lordose. Tal movimento se refere à flexão dorsal da coluna vertebral, em resposta à monta do macho, tendo papel na intromissão peniana (PFAFF *et al.*, 1994). O reflexo de lordose é um aspecto biologicamente importante do comportamento sexual da fêmea, porque a elevação da parte traseira do animal (iniciado quando o macho monta na fêmea) expõe o períneo e permite que a fertilização ocorra (PFAFF & SCHWARTZ-GIBLIN, 1988). Na ausência deste reflexo, a intromissão e a ejaculação não são possíveis.

O comportamento reprodutivo das ratas varia de acordo com a fase do ciclo estral em que o animal se encontra. Na primeira fase do ciclo, denominada estro, com duração de aproximadamente 36 horas, células epiteliais cornificadas estão presentes no muco vaginal. O estro vaginal é seguido por um período no qual células cornificadas estão em número reduzido e leucócitos, bem como algumas células epiteliais nucleadas, aparecem. Este estágio é denominado diestro vaginal e tem duração de aproximadamente 48 horas. O primeiro dia do diestro é referido como diestro I (ou metaestro) e o segundo dia é frequentemente chamado de diestro II. A próxima fase é caracterizada pela presença de muitas células epiteliais nucleadas, bem como pela dramática redução no número de leucócitos. Este estágio final é denominado proestro vaginal, e dura aproximadamente 12 horas (NELSON, 1995).

O comportamento de lordose é iniciado na presença dos hormônios sexuais, estrogênio e progesterona, e ocorre em resposta à informação sensorial tátil, normalmente fornecida pela monta do macho (NELSON, 1995). O comportamento sexual de ratas ocorre predominantemente na noite do proestro (estro comportamental), já que nesse momento, a fêmea já foi exposta a altos níveis de estrogênio e progesterona.

Além de depender da ação dos hormônios esteróides gonadais, o reflexo de lordose é resultado da ativação de uma circuitaria neural e, por este motivo, muitas estruturas estão envolvidas na execução desse reflexo. Sendo assim, a medula espinhal é a estrutura que recebe as informações somatossensoriais durante a cópula. Além disso, ela modula as saídas dos neurônios motores que resultam no movimento de lordose. A integração da informação sobre as correções momento-a-momento da postura do animal é realizada no tronco cerebral inferior. O mesencéfalo, por sua vez, recebe informações do hipotálamo e de outros locais do cérebro e traduz e integra estes sinais para mediar o disparo de neurônios reticuloespinhais, no tronco cerebral inferior. O hipotálamo é a estrutura responsável por adicionar o componente endócrino a esse mecanismo comportamental, uma vez que os efeitos do estrogênio e da

progesterona nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios, a transcrição de RNA e a síntese de novas estruturas e outras proteínas, são primariamente mediadas nessa estrutura cerebral (PFAFF & SCHWARTZ-GIBLIN, 1988; NELSON, 1995).

Durante a cópula, as informações sensoriais atingem o sistema nervoso da fêmea via receptores cutâneos localizados nos flancos, na anca e no períneo do animal. A informação destes receptores chega à medula espinhal e é enviada para a formação reticular medular. Esta via para o tronco cerebral, onde os neurônios motores que controlam os músculos envolvidos na lordose estão localizados, é necessária, mas não suficiente para que o reflexo ocorra. Cabe enfatizar que a conexão desta região do tronco cerebral com fibras descendentes do mesencéfalo irá permitir a execução da lordose, somente quando os hormônios esteróides sexuais estiverem disponíveis para os neurônios no mesencéfalo ou para as células do hipotálamo ventromedial (NELSON, 1995).

A atividade reprodutiva é uma das funções alterada e inativada durante a resposta adaptativa ao estresse (JOHNSON *et al.*, 1992). O estresse ambiental e/ou social exerce efeito deletério na função reprodutiva de vertebrados, atuando, inclusive, na inibição do reflexo de lordose. Em mamíferos, dentre os efeitos supressivos do estresse na fisiologia reprodutiva e no comportamento da fêmea, encontram-se desordem na ovulação e inibição do comportamento receptivo sexual (WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). Por sua vez, em machos, o estresse induz uma supressão na secreção de testosterona, na espermatogênese e na libido (JOHNSON *et al.*, 1992).

Retana-Márquez e colaboradores (1996) demonstraram que o estresse crônico por imobilização, intermitentes choques elétricos nas patas, imersão em água fria ou cirurgia, produzem um aumento nos níveis circulantes de ACTH, bem como um efeito inibitório generalizado na função hipófise-gônadas, tanto em machos quanto em fêmeas. Em machos, o potencial copulatório total (frequência ejaculatória) e o limiar ejaculatório, foram

significativamente modificados após estresse por choques elétricos nas patas e imersão em água fria. Além disso, o componente motivacional do comportamento sexual masculino também foi afetado.

O estresse físico ou emocional pode, portanto, afetar a função reprodutiva. Estudos têm demonstrado que a aplicação de diferentes paradigmas de estresse agudo (contenção por 10 minutos, contenção por 1 hora e éter por 1 minuto) em ratas, na manhã do proestro, altera os mecanismos responsáveis pelo controle da ovulação, provocando uma redução no número de ovócitos. Além disso, 1 hora de contenção na tarde do proestro provoca uma redução significativa no quociente de lordose. Tais evidências indicam que o estresse agudo, no dia do proestro, pode afetar o comportamento sexual e a ovulação de ratas (DONADIO *et al.*, 2007).

Outro estudo indica que o estresse físico crônico modifica o comportamento sexual de ratas, através de um mecanismo que envolve mudanças complexas nos hormônios sexuais, em fatores endócrinos e nos neurotransmissores (YOON, 2005). Cabe salientar, entretanto, que o efeito do estresse, no comportamento sexual, depende da natureza e, em algumas condições, da duração do agente estressor (RETANA-MÁRQUEZ *et al.*, 1996).

O sistema reprodutivo feminino, em humanos e roedores, é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPG). O principal regulador desse eixo é o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), produzido pelos neurônios da área pré-óptica medial (MPOA) e do núcleo arqueado do hipotálamo, e secretado dentro do sistema hipofisário portal. Na hipófise, o GnRH estimula a produção do hormônio luteinizante (LH), o qual ativa o ovário a secretar estradiol e progesterona (RIVEST & RIVIER, 1995; FERIN, 1996). É importante enfatizar que a secreção pulsátil e o pico de LH dependem da atividade dos neurônios GnRH (KALRA & KALRA, 1983).

1.3 Hormônio Liberador de Corticotropina e Comportamento Sexual

Sítios de ligação para o hormônio liberador de corticotropina têm sido localizados em muitas áreas do cérebro, incluindo naquelas envolvidas no controle da secreção de GnRH e gonadotropinas. O CRH tem sido proposto como regulador negativo da secreção de GnRH; alguns estudos sugerem um efeito inibitório central do CRH no sistema reprodutivo, atuando, possivelmente, sobre os neurônios GnRH (MACLUSKY *et al.*, 1988; JEONG *et al.*, 1999). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal induzida pelo estresse, reduziria a pulsatilidade do GnRH, privando o folículo ovariano de adequado suporte de gonadotropinas e resultando em anovulação (MOREIRA *et al.*, 2005). O CRH pode, também, aumentar a secreção de beta-endorfina, a qual pode suprimir a liberação de GnRH e/ou de LH (OLSTER & FERIN, 1987).

Mitchell e colaboradores (2005) demonstraram que o CRH, atuando indiretamente através de vias noradrenérgicas do locus coeruleus, exerce um papel central na supressão do eixo HPG, especialmente atuando no pulso gerador de GnRH, e provocando, portanto, uma disfunção reprodutiva. A administração de CRH, no locus coeruleus, resulta em uma diminuição dose-dependente na frequência de pulsos de LH, em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol. Uma vez que os neurônios que se originam no LC se projetam diretamente para regiões da área pré-óptica, ricas em GnRH, e lesões seletivas no LC resultam em diminuição nos níveis de noradrenalina dentro da área pré-óptica, os neurônios LC podem diretamente alterar a atividade do sistema neural do GnRH. Isso sugere, portanto, que aumentos na atividade noradrenérgica resultam na supressão do pulso gerador de GnRH.

A MPOA poderia ser um dos alvos através do qual o CRH atua para interferir na atividade dos neurônios responsáveis pela função reprodutiva, uma vez que há evidências anatômicas do CRH atuando diretamente nos neurônios GnRH, na MPOA de ratos. Esses resultados indicam que a influência do CRH na atividade neuronal do GnRH poderia ser via

contatos sinápticos diretos entre terminais axonais de CRH e dendritos de neurônios secretores de GnRH, localizados na MPOA. Embora os neurônios CRH pareçam se projetar para a MPOA e pareçam inervar os neurônios GnRH, a origem destas fibras permanece incerta, e se essa área é um local para o efeito inibitório do CRH na função reprodutiva também permanece obscura. Nesse sentido, a exata via pela qual os neurônios CRH podem interferir na atividade neuronal do GnRH, durante o estresse, permanece incompreensível. Esse neuropeptídeo faz parte de uma longa lista de neuromoduladores que, juntos, interagem com várias estruturas cerebrais, incluindo a MPOA e interferem na atividade dos neurônios GnRH, em animais estressados (RIVEST & RIVIER, 1995).

A administração de CRH resulta em uma imediata diminuição na pulsatilidade do GnRH e na liberação de LH, em macacas *rhesus* ovariectomizadas. Esses dados são consistentes com a hipótese de que a elevação nos níveis endógenos de CRH pode contribuir com a diminuição da secreção de gonadotropinas e, desse modo, interromper a função reprodutiva de primatas, sob condições de estresse (OLSTER & FERIN, 1987). Os efeitos inibitórios de um estímulo físico estressante, tal como choque elétrico nas patas, na secreção de GnRH e gonadotropinas, são prevenidos pelo co-tratamento com um antagonista de CRH ou seu anticorpo (RIVIER *et al.*, 1986).

Sendo assim, se rigoroso o suficiente, o estresse pode inibir completamente o sistema reprodutivo feminino. De fato, os neurônios CRH inibem direta ou indiretamente, através dos neurônios produtores de pró-opiomelanocortina (POMC), o eixo gonadal (RIVEST & RIVIER, 1995). Além disso, os glicocorticóides, secretados pelo córtex adrenal, atuam, principalmente, na hipófise para suprimir o eixo HPG (SAKAKURA *et al.*, 1975; RABIN *et al.*, 1990). A administração de glicocorticóides reduz significativamente o pico do hormônio luteinizante em resposta ao GnRH intravenoso, sugerindo um efeito inibitório dos glicocorticóides nos gonadotrofos hipofisários (SAKAKURA *et al.*, 1975).

Nessa perspectiva, o CRH, os peptídeos derivados da pró-opiomelanocortina e os glicocorticóides adrenais desempenham importante função na modulação dos efeitos do estresse sobre a função reprodutiva (RIVIER & RIVEST, 1991). A influência desses hormônios sobre o eixo HPG se dá em três níveis: no hipotálamo, através da inibição da secreção de GnRH; na glândula hipófise, por interferência do GnRH na liberação dos hormônios luteinizante e folículo estimulante; e nas gônadas, por alteração do efeito estimulatório das gonadotropinas na secreção dos esteróides gonadais. Dessa forma, o eixo HPA, quando ativado pelo estresse, apresenta um efeito inibitório geral no sistema reprodutivo feminino (CHEN *et al.*, 1992).

Os glicocorticóides atuam em múltiplos níveis, suprimindo a secreção de GnRH e das gonadotropinas e inibindo a secreção de testosterona e estradiol, pelos testículos e ovários, respectivamente. A capacidade destes hormônios de suprimir a função reprodutiva em diferentes níveis pode ter um papel no atraso da reprodução em períodos de estresse. Os glicocorticóides claramente inibem o crescimento uterino, estimulado pelo estrogênio. A administração de glicocorticóides também está associada à diminuição na concentração de receptores de estradiol. Dessa forma, um outro mecanismo pelo qual o eixo HPA pode influenciar a função reprodutiva durante o estresse, é através de um efeito direto dos glicocorticóides nos tecidos alvo de esteróides sexuais (RABIN *et al.*, 1990).

Sendo assim, uma vez que os glicocorticóides e o CRH afetam a pulsatilidade dos neurônios GnRH, provavelmente na MPOA, pode-se inferir que essa ação acaba por interferir na secreção dos hormônios esteróides gonadais, os quais são imprescindíveis para a execução do comportamento de lordose, pela fêmea. Nesse sentido, pode-se compreender porque, em situações de estresse, a fêmea tem seu comportamento sexual inibido.

O CRH é um neuropeptídeo encontrado, predominantemente, em corpos celulares da divisão parvocelular do PVN, exercendo um papel crítico nas respostas endócrinas e

comportamentais ao estresse (DUNN & BERRIDGE, 1990; SCHAFER *et al.*, 1997). Algumas das fibras que se originam nesses corpos celulares se projetam para a eminência mediana, enquanto outras percorrem o tronco cerebral, presumivelmente para inervar núcleos envolvidos em mecanismos autonômicos e comportamentais responsáveis por mediar a resposta ao estresse. Um núcleo do tronco cerebral que recebe tal inervação é o locus coeruleus (SWANSON *et al.*, 1983), o qual é constituído por neurônios adrenérgicos (GRZANNA & MOLLIVER, 1980), os quais estão envolvidos na ativação comportamental e na mediação da resposta ao estresse. Dessa forma, os efeitos do CRH na atividade neuronal do LC poderiam constituir um mecanismo para amplificar e coordenar muitos dos efeitos exercidos pelo CRH (VALENTINO *et al.*, 1983).

A partir destas constatações, num ponto de vista funcional, a supressão da reprodução durante o estresse pode ser vista como uma adaptação. Isso porque a peculiaridade da resposta ao estresse é a mobilização de consideráveis quantidades de energia para, imediatamente, abastecer a fisiologia muscular e cardiovascular, estruturas mais requisitadas nesse período de perturbação da homeostase corporal (WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). Frente a isso, o estresse toma uma conotação mais favorável, indicando todas as forças ou estímulos no meio ambiente, interno ou externo, que podem induzir a mudanças e adaptações no organismo para ajudá-lo a melhor se adaptar ao seu ambiente, em vez de uma conotação negativa, em que ele é entendido como algo hostil e adverso a saúde do animal e para o interesse econômico dos seres humanos (STOTT, 1981).

1.4 Angiotensina II

O octapeptídeo Angiotensina II (Ang II) foi inicialmente descrito como um hormônio de origem periférica (BRAUN-MENENDEZ *et al.*, 1940), o princípio ativo final do clássico

sistema renina-angiotensina (PAGE, 1987). A molécula precursora, o angiotensinogênio, origina-se no fígado e é clivada pelo rim, através da renina, a um inativo decapeptídeo, a Angiotensina I. Esta é convertida à Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), predominantemente localizada no pulmão (VALLOTON, 1987). A Ang II circulante produz vasoconstrição, liberação de aldosterona, retenção de sódio e água, além de ter um papel chave na regulação da pressão sanguínea e na homeostase (PAGE, 1987).

A Ang II é um importante hormônio relacionado ao estresse, tendo a sua concentração aumentada no plasma e no SNC, em resposta à estimulação estressante (YANG *et al.*, 1996). O estresse agudo aumenta o conteúdo de Ang II em muitas regiões do cérebro (incluindo o hipotálamo), além de aumentar a expressão do receptor AT1 na porção parvocelular do núcleo paraventricular, no órgão subfornicial, na eminência mediana e na hipófise anterior (SAAVEDRA *et al.*, 2005).

Além disso, um estudo concluiu que a administração de Ang II, na amígdala medial (MeA), provoca um efeito inibitório no comportamento sexual de ratos machos, mediado por seus receptores AT1 e AT2. Essa inibição foi impedida pela co-injeção de antagonista de AT1, Losartan, ou de antagonista de AT2, CGP 42112 (BREIGEIRON *et al.*, 2002). De forma semelhante, a administração de Ang II na amígdala medial de ratas, causa uma redução significativa no quociente de lordose, sugerindo uma participação desse peptídeo na modulação do comportamento sexual de fêmeas (CECCONELLO *et al.*, 2010).

Além de estar relacionada ao estresse, a Ang II exerce importante papel no controle da pressão sanguínea e das concentrações de sódio e água no organismo, bem como na estrutura e na função cardiovascular. Para produzir seus efeitos fisiológicos, atua em receptores específicos nas membranas celulares. Em humanos, há dois receptores para a Angiotensina II, o AT1 e o AT2 (JOHNSTON, 1998), inicialmente caracterizados farmacologicamente com base em suas afinidades para diferentes peptídeos e não-peptídeos ligantes (TIMMERMANS

et al., 1993; DE GASPARO *et al.*, 2000). Tais receptores contêm sete domínios hidrofóbicos transmembrana e pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. As sequências de aminoácidos deduzidas mostram que esses receptores são estruturalmente diferentes, com homologia de aproximadamente 33%, mas com efeitos fisiológicos frequentemente opostos (FOGO, 2004).

O AT1 é responsável pela maioria dos efeitos da Ang II sobre os órgãos-alvo, atuando na manutenção da pressão arterial (através da regulação da contração da musculatura lisa), bem como na homeostase hidroeletrolítica relacionada à secreção de aldosterona e consequente retenção de sódio e água (INAGAMI *et al.*, 1999). Além disso, a ativação do receptor AT1 promove esteroidogênese adrenal, ativação neuronal, transporte de íons e proliferação/crescimento celular. Algumas das ações induzidas pelo AT1 são reguladas pelo AT2, o qual antagoniza o efeito proliferativo em vários órgãos, como o endotélio, miocárdio e ovários (DE GASPARO *et al.*, 2000).

Ambos os tipos de receptores, AT1 e AT2, são encontrados no cérebro de muitas espécies de mamíferos (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991), incluindo humanos (BARNES *et al.*, 1993). Enquanto o AT1 predomina em animais adultos, o AT2 é altamente expresso nos cérebros em desenvolvimento. Os receptores AT1 foram identificados em áreas relacionadas ao controle neuroendócrino e à regulação autonômica da função cardiovascular e do sistema límbico. Por outro lado, os receptores AT2 são expressos em áreas relacionadas ao controle e aprendizagem da atividade motora, em áreas envolvidas no controle da função visual, em áreas sensoriais e em duas áreas do sistema límbico (no núcleo septal medial e no núcleo amigdalóide medial). Além disso, os receptores AT2 poderiam exercer um papel na função visual, motora, sensorial e límbica, especialmente durante o desenvolvimento, uma vez que tais receptores estão pouco presentes ou, até mesmo ausentes, em ratos adultos (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991). Dessa forma, o papel da Ang II é múltiplo e complexo,

não se limitando ao papel regulatório no controle dos sistemas autonômicos e hormonais. Esse peptídeo também tem participação no desenvolvimento cerebral, nos processos sensoriais, na cognição e na regulação do fluxo cerebrovascular (SAAVEDRA, 1992).

Os receptores AT1 estão concentrados na porção parvocelular do PVN, no sítio da formação do CRH e na eminência média, de onde o CRH é liberado para a circulação portal, para estimular a secreção de ACTH. Existem muitos receptores AT1 no órgão subfornicial, enviando projeções para o PVN e em centros superiores, tais como a amígdala, uma área que controla a resposta emocional ao estresse. Receptores AT1 são também altamente expressos nas glândulas hipófise e adrenal. Deste modo, esses receptores estão concentrados por todo o eixo HPA e em centros superiores que controlam a resposta do eixo HPA ao estresse (SAAVEDRA *et al.*, 2005).

A participação do sistema angiotensinérgico nas respostas estressantes é visível quando se administra uma injeção prévia de Losartan (antagonista do receptor AT1 de Ang II), o qual atua prevenindo o efeito do hormônio (DONADIO *et al.*, 2007). Os antagonistas de receptores de Ang II constituem uma nova classe de drogas anti-hipertensivas, que agem através do bloqueio do receptor AT1 de Ang II (JOHNSTON, 1998).

Como já discutido, a exposição crônica a agentes estressores ativa o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal ao mesmo tempo em que reduz a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (RETANA-MÁRQUEZ *et al.*, 2003). A ativação do eixo HPA, provocada pela Ang II durante a resposta ao estresse (CECCONELLO, 2009), estimula a secreção do CRH, pelos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico (SWANSON & SAWCEHNKO, 1983). O CRH ativa o lobo anterior da glândula hipófise, ocasionando a liberação de ACTH, o qual ativa o córtex adrenal (VALE *et al.*, 1981). Resultados obtidos com roedores indicam que estressores físicos ou emocionais atuam sobre o hipotálamo, alterando a secreção de fatores liberadores ou inibidores de hormônios hipofisários. Nessas

situações, a liberação de CRH promove aumento da produção de ACTH, o qual, por sua vez, estimula a liberação de cortisol, além da ativação do sistema nervoso simpático, com aumento da liberação de glicose, do nível cardíaco e da pressão sanguínea (FERIN, 1999). Dessa forma, a ativação do eixo HPA é caracterizada pelo aumento da expressão de CRH, no PVN, e pelo conseqüente aumento de ACTH e de glicocorticóides adrenais no plasma (LIVEZEY *et al.*, 1985, KOOB, 1999).

O CRH humano é sintetizado na forma de um precursor de 91 aminoácidos, denominado pré-pró-CRH, o qual, posteriormente, é processado a um peptídeo de 41 aminoácidos. A atividade biológica do CRH está contida na região amino-terminal. A estrutura do CRH é preservada entre as diferentes espécies, sendo o CRH humano idêntico ao do rato e diferente do CRH ovino em apenas sete aminoácidos. A transcrição do gene do CRH aumenta de forma significativa durante períodos de estresse (AYALA, 2002).

Estudos com macacos *Rhesus* ilustram essas afirmações. Macacos criados, na ausência das mães, respondem ao estresse do isolamento social com uma ativação mais vigorosa do eixo HPA e com elevações do CRH no líquor cefalorraquidiano, quando comparados àqueles criados em condições normais. De forma semelhante, a privação materna, no rato, aumenta os níveis de ACTH, na adenohipófise, e de CRH, no hipotálamo (AYALA, 2002).

Várias alterações comportamentais são percebidas em ratos que receberam administração intracerebroventricular de CRH. Estes comportamentos, que incluem aumento na atividade locomotora e agressividade no ambiente familiar, diminuição na alimentação e na atividade sexual, são todos similares àqueles que ocorrem em ratos estressados (CHROUSOS, 1992). Dessa forma, o CRH coordena as respostas comportamentais, autonômicas e hormonais ao estresse. A ativação do eixo HPA, com estimulação do CRH e da vasopressina (liberados dos neurônios hipotalâmicos parvocelulares), e a conseqüente secreção de ACTH,

pela hipófise anterior, e glicocorticóides, pelo córtex adrenal, são as maiores respostas endócrinas ao estresse (AGUILERA *et al.*, 2007).

Nesse sentido, o excesso da produção de CRH pode acarretar em distúrbios comportamentais, psiquiátricos, metabólicos, imunes e reprodutivos (AGUILERA *et al.*, 2006). O aumento nos níveis plasmáticos de corticosteróides, resultado da resposta ao estresse, tem sido associado à falha na função reprodutiva em muitas espécies de vertebrados, tanto em fêmeas como em machos. O desempenho sexual de ratos é facilmente afetado por diferentes estressores, tanto aqueles aplicados de forma crônica como os de forma aguda (RETANA-MÁRQUEZ *et al.*, 1998).

No entanto, o CRH não atua apenas no eixo HPA. Ele é, também, um importante neurotransmissor e mediador da resposta neuroendócrina, cardiovascular, autonômica e imunológica, desempenhando assim um papel fundamental na resposta adaptativa e comportamental que ocorre durante períodos de estresse. Cerca de 90% do CRH circulante está ligado a uma proteína de alta afinidade, denominada proteína carreadora do CRH (*CRH binding protein* ou CRH-BP). A CRH-BP está presente, também, na placenta, no SNC e no fígado, e parece ser uma das principais reguladoras da atividade biológica do CRH. Esse hormônio exerce sua ação no momento em que se liga ao seu receptor de membrana celular acoplado à proteína G, aumentando, assim, os níveis intracelulares de AMP cíclico e o influxo de cálcio. Esse processo ativa a fosforilação da proteína quinase A intracelular de complexos proteicos, cujo resultado final é o aumento da transcrição do gene da pró-opiomelanocortina, o precursor imediato do ACTH e da beta-endorfina (AYALA, 2002).

1.5 Núcleo Paraventricular Hipotalâmico

O núcleo paraventricular hipotalâmico é um pequeno núcleo adjacente ao terceiro ventrículo (BADOER, 1996) e constitui-se num importante centro de integração neuroendócrina. Ele pode ser dividido em oito subnúcleos, três magnocelulares e cinco parvocelulares, os quais ocupam distintas partes do PVN (SWANSON & SAECHENKO, 1980). A subdivisão magnocelular é constituída por neurônios grandes, secretores de vasopressina e de ocitocina que se projetam para a hipófise posterior, onde estes hormônios são liberados diretamente na circulação, com a finalidade de atuar na regulação hormonal da reabsorção renal de água, na tonicidade muscular da vasculatura lisa e na ejeção de leite após o parto (BADOER, 1996).

A porção parvocelular está relacionada, principalmente, com as vias neurais envolvidas no controle da atividade simpática. É constituída de neurônios pequenos, que se projetam para a eminência média onde liberam fatores que influenciam a liberação de hormônios da hipófise anterior, os quais, por suas vezes, projetam-se para dentro do SNC. Sendo assim, o PVN parvocelular está relacionado à liberação de hormônios hipotalâmicos reguladores. Outros neurônios parvocelulares se projetam para numerosas regiões do SNC, como o tronco cerebral e a medula espinhal, incluindo diversas estruturas envolvidas no controle cardiovascular e no equilíbrio hidroeletrólítico (SWANSON & SAECHENKO, 1980; KISS, 1988; BADOER, 1996).

O PVN envia projeções para a medula ventrolateral rostral, bem como para a coluna de células intermédio lateral da medula espinhal, com o intuito de influenciar o fluxo simpático (CAVERSON *et al.*, 1984). Dessa forma, esse núcleo controla a atividade nervosa simpática e a pressão sanguínea. Uma ativação dos neurônios do PVN, com estimulação elétrica e microinjeção de agonista do receptor de glutamato ou antagonista do receptor

GABA, induz um profundo aumento na atividade nervosa simpática e na pressão sanguínea, em ratos anestesiados e ratos conscientes (KANNAN *et al.*, 1989). Inversamente, a inibição do PVN (com GABA ou agonista do receptor GABA) suprime descargas basais nervosas simpáticas e diminui a pressão sanguínea basal (ALLEN, 2002).

2. HIPÓTESE

Considerando que estímulos estressantes aumentam a concentração de Angiotensina II central, bem como inibem o comportamento sexual, pretende-se testar a hipótese de que essa inibição ocorre pela ação da Ang II, na porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico, ativando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

3. OBJETIVOS

Avaliar a participação da Angiotensina II, por meio da administração sistêmica crônica de Losartan, sobre a inibição do comportamento sexual de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção.

Avaliar a participação da Angiotensina II, por meio da microinjeção de Losartan na porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico, sobre a inibição do comportamento sexual de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos (n=76), da variedade *Wistar*, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura média de 21° C, ciclo “claro-escuro” de 12h e água e ração comercial *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o National Institute of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (projeto número 2007902).

4.2 Desenho Experimental

A fim de testar a hipótese já mencionada, o presente trabalho foi dividido em dois experimentos.

4.2.1 Experimento I: *Efeito da administração sistêmica crônica de Losartan sobre a inibição do comportamento de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção*

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo I (n=9): controle (animais sem administração prévia de Losartan e não submetidos ao estresse)

Grupo II (n=9): los+s/est (animais com administração prévia de Losartan, não submetidos ao estresse)

Grupo III (n=9): est (animais sem administração prévia de Losartan, submetidos ao estresse)

Grupo IV (n=10): los+est (animais com administração prévia de Losartan e submetidos ao estresse)

Na figura 1, pode-se visualizar o desenho experimental em detalhe.

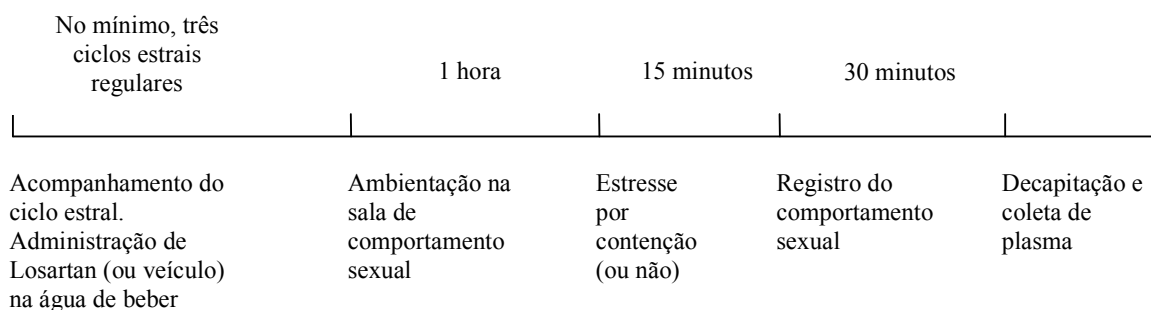


Figura 1: Desenho experimental do experimento I.

4.2.2 Experimento II: *Efeito da microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, sobre a inibição do comportamento de fêmeas produzida pelo estresse agudo de contenção*

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo I (n=10): controle (animais submetidos à microinjeção de solução salina, na porção parvocelular do PVN e não submetidos ao estresse)

Grupo II (n=9): los+s/est (animais submetidos à microinjeção de Losartan (DUP 753, Du Pont, Welmington, DE, U.S.A), na porção parvocelular do PVN e não submetidos ao estresse)

Grupo III (n=10): sal+est (animais submetidos à microinjeção salina, na porção parvocelular do PVN e ao estresse)

Grupo IV (n=10): los+est (animais submetidos à microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN e ao estresse)

Nas figuras 2 e 3, é possível visualizar o desenho experimental em detalhe.

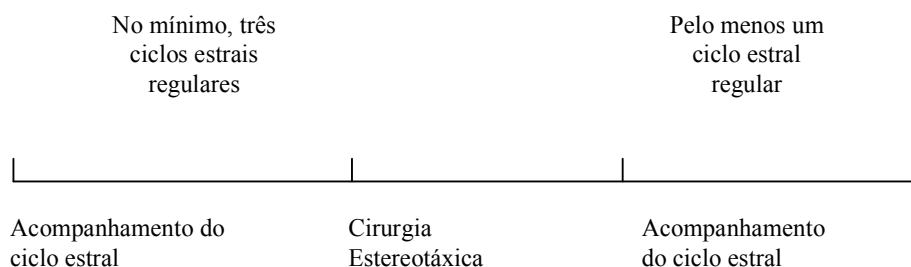


Figura 2: Desenho experimental do experimento II.

Na noite do proestro:

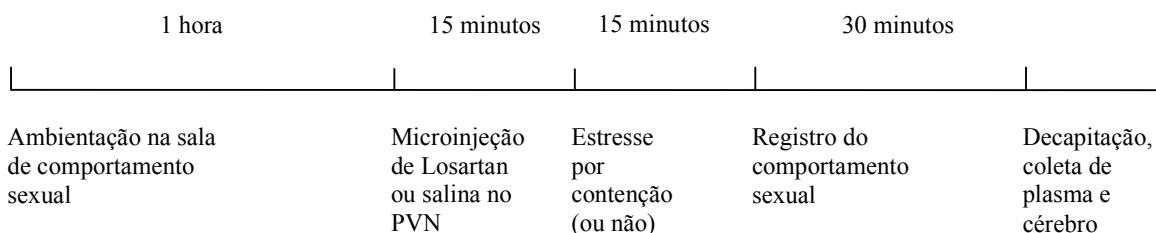


Figura 3: Continuação do desenho experimental do experimento II.

4.3 Verificação do Ciclo Estral

Uma vez que o comportamento sexual de ratas acontece, preferencialmente, durante a fase do ciclo estral denominada proestro, foi necessário realizar o acompanhamento do ciclo destas fêmeas. A análise se deu através da técnica de esfregaço vaginal, a qual foi realizada,

diariamente, às 11 horas. Foram utilizadas nos experimentos somente as fêmeas que apresentaram, no mínimo, três ciclos estrais regulares.

4.4 Seleção dos machos utilizados

Para testar o desempenho sexual dos machos foi feito um registro, com duração de dez minutos, do comportamento sexual do macho perante uma fêmea adulta, a qual foi ovariectomizada e recebeu reposição hormonal (48 horas antes: benzoato de estradiol - benzo-ginoestril ap® 5mg-SARSA na dose de 20 µg/rata e 6 horas antes: injeções de progesterona-Sigma na dose de 2,5 mg/rata + benzoato de estradiol, na dose de 20 µg/rata). Somente os machos que obtiveram mais de seis montas, em dez minutos, foram considerados sexualmente ativos (GOMES, 2001) e separados para serem incluídos no experimento de avaliação da receptividade sexual da fêmea, na noite do proestro. Foram selecionados dez machos sexualmente ativos, com idade entre 90 e 180 dias. Para testar o desempenho sexual dos machos, foram utilizadas quatro fêmeas castradas, com reposição hormonal. Tanto os machos quanto as fêmeas castradas não entraram no pedido de animais feito ao Biotério do ICBS, pois foram utilizados animais de descartes, provenientes de grupos controles de outros experimentos realizados no laboratório.

4.5 Anestesia

Para os procedimentos cirúrgicos foi utilizado o pré-anestésico Xilazina (Ronpum 100 mg/ml – Profarb, MG), que atua como relaxante muscular e analgésico central. Além disso, foi utilizado Cloridrato de Cetamina (Ketalar 50 mg/ml – Parke-Davis, SP), o qual atua como anestésico dissociativo. Ambos os anestésicos foram aplicados, via intraperitoneal, na dose de

100mg/kg/rato. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em local aquecido, para adequada recuperação da anestesia.

4.6 Cirurgia Estereotáxica

Foram submetidas à cirurgia estereotáxica somente as fêmeas adultas que apresentaram, no mínimo, três ciclos estrais regulares. Após a cirurgia, as fêmeas retornaram ao acompanhamento do ciclo estral e somente aquelas que tiveram, no mínimo, um ciclo estral regular, foram incluídas no experimento na fase do proestro.

As ratas foram anestesiadas para implantação unilateral de cânulas na região parvocelular do PVN. O animal foi fixado no aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.) através de pinos colocados no conduto auditivo externo e com os dentes incisivos presos (figura 4). Depois disso, o rato foi submetido a uma incisão longitudinal na pele, na linha média da região superior do crânio, expondo o periósteo (figura 5). Nesse local, foi realizada a técnica de trepanação, a qual consistiu em utilizar uma broca, com largura adequada para a passagem da cânula de maneira oblíqua ao cérebro. Para localização precisa, foi utilizado o atlas de cérebro de ratos (PAXINOS & WATSON, 1986), de onde foram retiradas as medidas para o acesso cirúrgico e feitas as devidas adaptações para correta localização do núcleo desejado.

As coordenadas utilizadas foram: ântero-posterior = - 2,1mm; látero-lateral = - 1,5mm; dorso-ventral = - 4,9mm.

A linha média do bregma foi considerada como ponto zero. A medida da coordenada vertical foi considerada a partir das membranas meníngeas. A cânula, colocada obliquamente, com um ângulo de 10°, ficou 2 mm acima do PVN, e o acesso ao interior do núcleo foi

realizado com o auxílio de uma agulha injetora. Depois de introduzida a cânula, ela foi fixada com polímero sintético.



Figura 4: Posicionamento da fêmea no aparelho estereotáxico.



Figura 5: Exposição do crânio.

4.7 Microinjeção de Losartan e Salina

Na noite do proestro, quinze minutos antes do início do estresse, foi injetado, unilateralmente, via cânula, 20pmol/0,3µL de Losartan (antagonista AT₁) ou 0,3 µL de salina (0,9%), conforme o grupo experimental, na região parvocelular do PVN. As injeções foram realizadas com auxílio de uma seringa de Hamilton, na dose de 1µl. Em sua extremidade foi acoplado um tubo de polietileno de 30 cm e uma agulha de anestesia odontológica descartável, de 12 mm de comprimento (2 mm mais longa que as cânulas-guia). O volume injetado foi administrado durante um minuto. A agulha injetora foi retirada lentamente após 30 segundos do término da administração da dose.

4.8 Administração crônica de Losartan na água de beber

A administração oral de Losartan foi feita através de uma solução de Losartan 10mg/kg/220ml de água de beber por dia, trocada a cada 24 horas. Os animais foram pesados a cada 48 horas para correção das doses do antagonista. A solução foi administrada durante o período de 7 a 10 dias.

4.9 Estresse por Contenção

O estresse por contenção consistiu em manter os animais individualmente, em um cilindro de plástico (4,7 cm de diâmetro, 9 cm de largura e 11 cm de comprimento) transparente e ventilado (figura 6). O tempo de duração do estresse foi de 15 minutos, sempre no período escuro (a partir das 18:30h). Imediatamente após esse período de estresse, foi realizado o registro do comportamento sexual dos animais.



Figura 6: Estresse por contenção, com duração de 15 minutos, na noite do proestro.

4.10 Comportamento Sexual

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

No início do período escuro (às 17:30h), na noite do proestro, os animais foram levados para a sala de filmagem, onde permaneceram por uma hora, para a adaptação ao novo ambiente. Os animais dos grupos estressados do experimento I permaneceram, por 15 minutos, no contensor, enquanto aqueles dos grupos sem-estresse permaneceram em suas caixas. Passado esse tempo, foi iniciado o registro comportamental.

Em relação ao experimento II, passada uma hora de ambientação, todos os animais sofreram uma microinjeção prévia, de salina ou Losartan, na porção parvocelular do PVN.

Passados 15 minutos, os animais dos grupos estressados foram colocados no contensor, onde permaneceram por 15 minutos. Os demais animais permaneceram em suas caixas. Passado esse tempo, a fêmea foi colocada junto ao macho sexualmente ativo, iniciando-se, imediatamente, a sessão de registro do comportamento sexual, a qual consistiu em filmar os animais, durante 30 minutos. Posteriormente, o filme foi visualizado e analisado através do programa de análise comportamental *The Observer* (Noldus Information Technology).

Seguem abaixo, os parâmetros comportamentais analisados:

Frequência do comportamento de lordose: toda vez que a fêmea elevou a parte traseira do dorso na presença da monta pelo macho;

Frequência de monta: toda vez que o macho usou as patas dianteiras para agarrar a fêmea pelos flancos, independente de lordose da fêmea;

Quociente de lordose: número de lordose dividido pelo número de montas;

Duração de locomoção da fêmea: tempo de deslocamento da fêmea, durante os 30 minutos do registro de comportamento sexual.

4.11 Histologia

Imediatamente após o término do registro comportamental, os animais foram decapitados (trata-se de um dos métodos mais adequados quanto à eficácia e rapidez do procedimento, pois minimiza, ao máximo possível, o sofrimento dos animais). O cérebro dos animais que sofreram a cirurgia estereotáxica foi coletado e, posteriormente, fixado em solução de formalina 4% (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.). Os cortes histológicos, com espessura de 100 μm , foram feitos com o auxílio de um vibrátomo (Leica, Germany) e analisados em microscópio óptico, para verificação da posição da cânula e do local da

microinjeção. Somente os animais que tiveram a localização correta da injeção (porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico) foram incluídos na análise.

4.12 Dosagem Hormonal

Logo após a decapitação, o sangue de cada animal, coletado do tronco cerebral e colocado em tubos heparinizados, foi centrifugado, durante 20 minutos, a uma velocidade de 3000 rpm. Em seguida o plasma foi coletado e armazenado em freezer -70° , para posterior dosagem de corticosterona, por radioimunoensaio.

4.13 Manuseio de Reagentes e Destino dos Resíduos da Pesquisa

Todos os reagentes foram manipulados pelo pesquisador com uso de luvas, máscara e avental. As carcaças dos animais foram encaminhadas ao Biotério Central, para seguir protocolo de descarte.

4.14 Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I: Efeito da administração sistêmica crônica de Losartan sobre a inibição do comportamento de fêmeas, produzida pelo estresse agudo de contenção

O estresse agudo por contenção, com duração de 15 minutos, na noite do proestro, inibiu significativamente o comportamento sexual de ratas ($P < 0,05$). Conforme mostra a figura 7, é possível notar que, o grupo submetido ao estresse agudo por contenção, teve uma redução significativa no quociente de lordose, quando comparado aos demais grupos. Entretanto, tal redução foi prevenida pela administração de Losartan, na água de beber, uma vez que o grupo losartan+estresse não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($P > 0,05$). Por sua vez, os animais que não sofreram estresse, mas que receberam a administração sistêmica de Losartan, não mostraram diferença significativa no quociente de lordose, quando comparados ao grupo controle ($P > 0,05$).

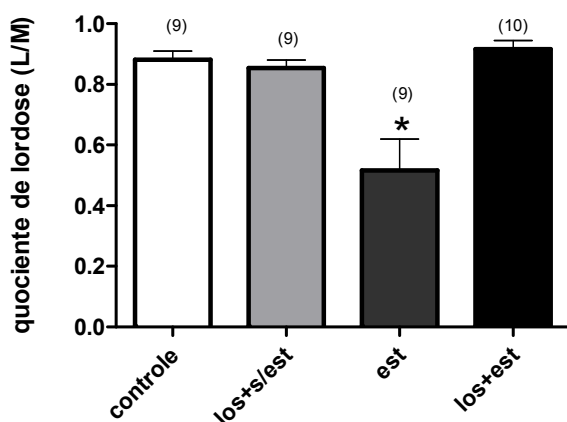


Figura 7: Efeito da administração sistêmica de Losartan (100mg/kg/220ml água/dia) ou veículo, associada ou não ao estresse de contenção por 15 minutos, sobre o comportamento sexual de ratas. **controle** (sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **est** (estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os valores foram expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado. * indica $p < 0,05$, quando comparado aos demais grupos.

Por sua vez, conforme mostra a figura 8, pode-se notar que a duração da locomoção da fêmea não teve diferença significativa entre os grupos submetidos ao estresse e aqueles que não sofreram estresse agudo por contenção ($P>0,05$).

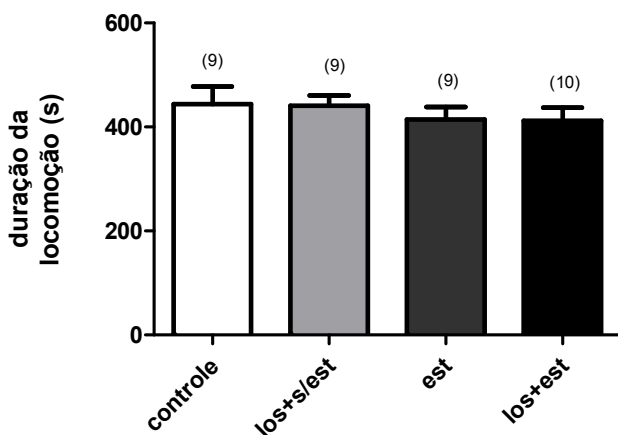


Figura 8: Duração da locomoção de ratas após administração sistêmica de Losartan (100mg/kg/220ml água/dia) ou veículo, associada ou não ao estresse de contenção por 15 minutos, durante o comportamento sexual. **controle** (sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **est** (estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado.

A análise da concentração plasmática de corticosterona, 30 minutos após o estresse agudo por contenção, não demonstrou diferença significativa ($P>0,05$) entre os animais estressados e aqueles que não foram submetidos ao protocolo de estresse (figura 9).

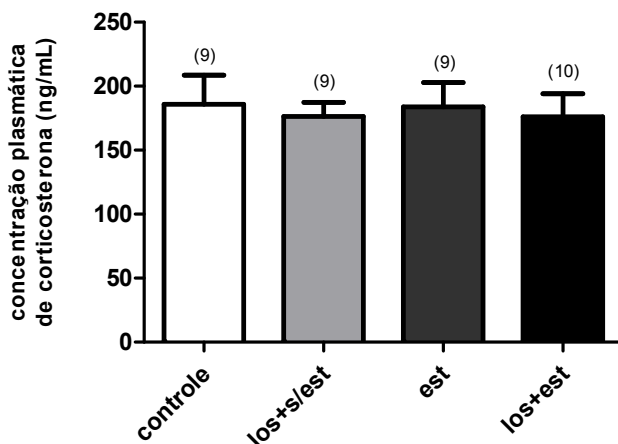


Figura 9: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos, na noite do proestro, sobre a concentração plasmática de corticosterona, em ratas, 30 minutos após o término do estresse. **controle** (sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **sal+est** (estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os valores foram expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado.

5.2 Experimento II: Efeito da microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, sobre a inibição do comportamento de fêmeas produzida pelo estresse agudo de contenção

De forma semelhante ao experimento I, o estresse agudo por contenção, com duração de 15 minutos, na noite do proestro, inibiu o comportamento sexual de ratas. A figura 10 mostra que o grupo salina+estresse teve uma redução significativa no quociente de lordose, quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$). Entretanto, tal redução foi prevenida pela microinjeção de Losartan, na porção parvocelular do PVN, uma vez que o grupo losartan+estresse não mostrou diferença significativa, quando comparado ao grupo salina+sem estresse ($P > 0,05$). Por sua vez, os animais que não sofreram estresse, mas que receberam uma microinjeção de Losartan, no PVN, não mostraram diferença significativa no quociente de lordose, quando comparados ao grupo controle ($P > 0,05$).

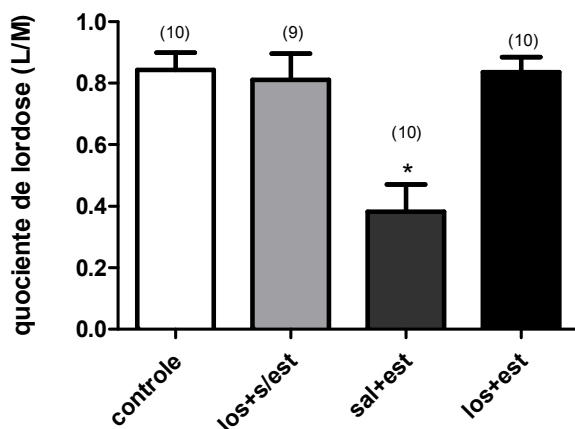


Figura 10: Efeito da microinjeção de Losartan ou salina, na porção parvocelular do PVN, associada ou não ao estresse de contenção por 15 minutos, sobre o comportamento sexual de ratas. **controle** (salina/sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **sal+est** (salina/estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os valores foram expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado. * indica $p < 0,05$, quando comparado aos demais grupos.

Em relação à duração da locomoção da fêmea, a figura 11 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao estresse e aqueles que não sofreram estresse agudo por contenção ($P > 0,05$).

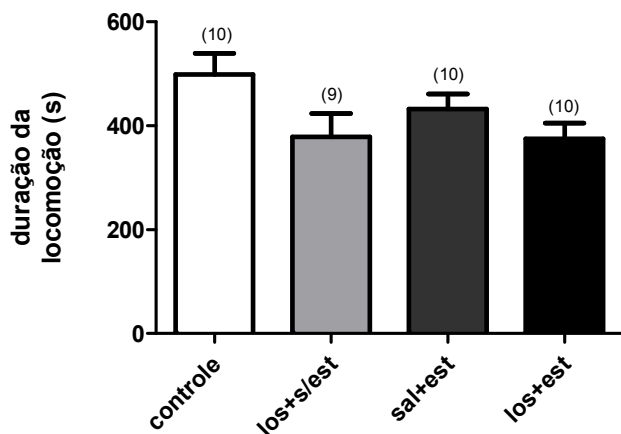


Figura 11: Duração da locomoção de ratas após microinjeção de Losartan ou salina, associada ou não ao estresse de contenção por 15 minutos, durante o comportamento sexual. **controle** (salina/sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **sal+est** (salina/estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os valores foram expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado.

De forma semelhante ao experimento I, a concentração plasmática de corticosterona, 30 minutos após o término do estresse, não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os quatro grupos (figura 12).

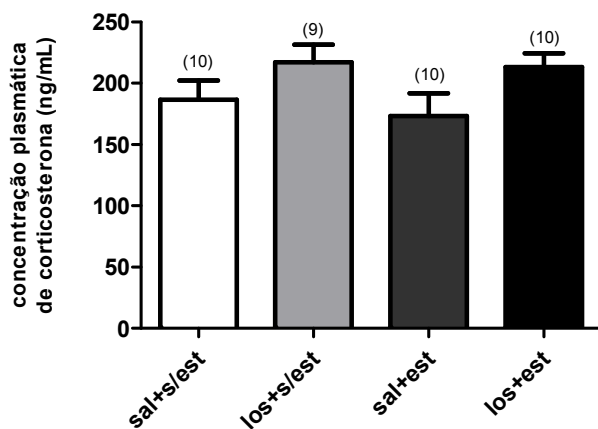


Figura 12: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos, na noite do proestro, sobre a concentração plasmática de corticosterona, em ratas, 30 minutos após o término do estresse. **controle** (salina/sem estresse); **los+s/est** (losartan/sem estresse); **sal+est** (salina/estresse); **los+est** (losartan/estresse). Os valores foram expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido de teste Bonferroni, quando indicado.

6. DISCUSSÃO

Considerando que estímulos estressantes aumentam o nível de Angiotensina II central, bem como inibem o comportamento sexual, neste trabalho foi testada a hipótese de que essa inibição ocorre via estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, pela Ang II, na porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico.

De fato, os resultados mostraram que a aplicação de estresse agudo por contenção, durante 15 minutos, na noite do proestro, reduz o quociente de lordose, e, portanto, o comportamento sexual de ratas. Os resultados mostraram também, que o Losartan (antagonista do receptor AT1 de Ang II) administrado na água de beber, bem como injetado na porção parvocelular do PVN, previne esse efeito do estresse.

Sabe-se que a amígdala medial é uma importante estrutura reguladora do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas, estando envolvida nas respostas ao estresse (CECCONELLO, 2010). A neurotransmissão noradrenérgica está elevada na MeA em situações de estresse por imobilização aguda e a noradrenalina liberada nessa região, durante o estresse, facilita a ativação do eixo HPA. Sendo assim, a noradrenalina pode estimular o eixo HPA agindo diretamente no PVN, mas também atuando em regiões extra-hipotalâmicas. Um exemplo disso é que a NA, agindo na MeA, aumenta a atividade do eixo HPA, durante a resposta ao estresse agudo por contenção (MA & MORILAK, 2005).

Corroborando o fato de que situações estressantes aumentam a concentração de Ang II periférica e central (YANG *et al.*, 1996) e que a MeA apresenta os dois tipos de receptores para a Ang II, AT1 e AT2, além de produzir esse neuropeptídeo (OLMOS *et al.*, 2004), pode-se inferir que o estresse provoca aumento de Ang II, inclusive na MeA. Uma vez que existem projeções eferentes da MeA ao PVN, supõe-se que a Ang II, na MeA, possa estimular este núcleo, já que a Ang II modula a ativação do eixo HPA, alterando a síntese e a secreção de

CRH, pelo PVN (SWANSON & SAWCEHNSKO, 1983; RETANA-MÁRQUEZ *et al.*, 2003; ARMANDO *et al.*, 2007). Nesse sentido, há liberação de CRH, o qual, indiretamente, através de vias noradrenérgicas do locus coeruleus, exerce um papel central na supressão do eixo HPG, especialmente atuando no pulso gerador de GnRH, o regulador neural central da secreção de LH e FSH, provocando, portanto, uma disfunção reprodutiva (MITCHELL *et al.*, 2005). Essa ideia é aceita já que outro experimento mostra que fatores inibitórios, incluindo o CRH, poderiam interferir nos mecanismos envolvidos na ativação dos motoneurônios GnRH, na área preóptica medial, durante o ciclo ovulatório (RIVEST & RIVIER, 1995).

Além de atuar nos neurônios GnRH, o CRH também ativa o lobo anterior da glândula hipófise, provocando a liberação de ACTH, o qual ativa o córtex adrenal a secretar os glicocorticóides, produtos finais do eixo HPA (VALE *et al.*, 1981). Os glicocorticóides atuam, também, de forma a suprimir o eixo HPG. Um estudo mostra que a administração de glicocorticóides reduz significativamente o pico do hormônio luteinizante em resposta ao GnRH intravenoso, sugerindo um efeito inibitório dos glicocorticóides nos gonadotrofos hipofisários (SAKAKURA *et al.*, 1975; RABIN *et al.*, 1990). Dessa forma, juntos, CRH e glicocorticóides, perturbam o eixo HPG atuando no hipotálamo (inibindo a secreção de GnRH); na glândula hipófise (por interferência do GnRH na liberação dos hormônios luteinizante e foliculo estimulante); e nas gônadas (por alteração do efeito estimulatório das gonadotropinas na secreção dos esteróides gonadais) (CHEN *et al.*, 1992). No presente estudo, entretanto, este efeito direto do glicocorticóide pode ser descartado, pois a concentração plasmática de corticosterona ainda não está alterada, quando o comportamento sexual já está comprometido.

Esta via da Ang II estimulando o PVN parece ter sentido na ativação do eixo HPA, já que os presentes resultados mostraram que o bloqueio do receptor AT1 de Ang II, através da microinjeção de Losartan na porção parvocelular do PVN, previamente ao estresse, previne a

redução do reflexo de lordose, provocada por situações estressantes. Nessa situação, com tais receptores bloqueados, não há ação da Ang II potencializando a ativação do eixo HPA, e, portanto, não há liberação de CRH e glicocorticóides. Isso porque, em situações fisiológicas, não há o efeito da Ang II na inibição do comportamento sexual; este efeito ocorre apenas quando houver aumento na secreção deste hormônio.

Situações estressantes causam a ativação do eixo simpato-adrenal, provocando, portanto, aumento na secreção de noradrenalina. Esse hormônio atua, nessas situações, diminuindo as funções neurovegetativas e contribuindo para o aumento das respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse, incluindo a ativação do eixo HPA (CHROUSOS, 1998). Nesse sentido, o eixo HPA pode ser ativado tanto pela ação da Ang II, bem como pela ação da noradrenalina.

Considerando que existem evidências anatômicas do CRH atuando diretamente nos neurônios GnRH, na MPOA de ratos, esta área poderia ser um dos alvos através do qual o CRH atua para interferir com a atividade dos neurônios responsáveis pela função reprodutiva. O CRH poderia atuar via contatos sinápticos diretos entre terminais axonais de CRH e dendritos de neurônios secretores de GnRH, localizados na MPOA (RIVEST & RIVIER, 1995).

A partir de todas estas constatações, pode-se sugerir que, no presente estudo, o estresse agudo por contenção, aplicado durante 15 minutos, na noite do proestro, provocou aumento na concentração de Ang II em várias regiões periféricas e cerebrais. No cérebro, a MeA, estimulada pela Ang II, estimulou o PVN, o qual, por sua vez, ativando o eixo HPA, provocou aumento na secreção de CRH. O CRH, por meio de vias noradrenérgicas do locus coeruleus e/ou por um efeito direto sobre neurônios GnRH, exerceu efeito inibitório sobre a secreção de GnRH, na área pré-óptica medial, causando a inibição do comportamento sexual. Com a secreção de GnRH inibida, pode ter havido também perturbação na secreção dos

hormônios estrogênio e progesterona, os quais são indispensáveis para que a circuitaria neural do reflexo de lordose ocorra.

Os animais que receberam uma microinjeção prévia de Losartan na porção parvocelular do PVN ou até mesmo aqueles submetidos à ingestão sistêmica crônica de Losartan na água de beber, previamente ao estresse, não apresentaram disfunção sexual, ou seja, o quociente de lordose foi igual àquele apresentado pelas fêmeas controles (sem o fármaco e sem o estresse). Nessa perspectiva, pode-se inferir que o Losartan, bloqueando os receptores AT1, de Ang II, no PVN, impediu o efeito da Ang II. Com esse hormônio sendo secretado em suas taxas normais, não houve ativação do eixo HPA, e, portanto, não houve aumento na secreção de CRH e de glicocorticóides. Nesse sentido, tais animais tiveram o seu desempenho sexual inalterado, da mesma forma que os animais controles.

De forma semelhante ao estudo de Cecconello e colaboradores (2010), a inibição do comportamento sexual, causada pelo estresse agudo de contenção, com duração de 15 minutos, não foi devida a uma inibição motora geral, uma vez que a locomoção do animal não foi afetada por este paradigma de estresse. Além disso, a administração de Losartan, na ausência de estresse, não provocou redução do quociente de lordose, mostrando que esta droga não apresenta atividade intrínseca.

Se situações estressantes provocam a ativação do eixo HPA, supõe-se a concentração plasmática de glicocorticóides esteja elevada. Entretanto, nos presentes resultados, é possível perceber que este aumento não ocorreu, já que não houve diferença significativa nas concentrações deste hormônio nos animais submetidos ao estresse e naqueles que não sofreram o estresse agudo por contenção. Uma possível explicação para isto se deve ao fato de que a coleta de sangue dos animais ocorreu 30 minutos após o término do estresse. Conforme Cecconello (2009), que realizou um protocolo semelhante a este (em que foi usado o mesmo paradigma de estresse e pelo mesmo período de tempo), houve diferença

significativa entre os grupos apenas quando a coleta sanguínea aconteceu 75 minutos após o término do estresse. Sendo assim, nessa situação, pode-se sugerir que a redução do comportamento sexual não foi provocada por uma ação direta dos glicocorticóides, uma vez que a concentração plasmática de corticosterona não se elevou nos animais submetidos ao estresse. Essa diminuição ocorreu, provavelmente, por ação do CRH nos neurônios GnRH, um importante estimulador do comportamento sexual em ratas.

Cabe salientar que as concentrações plasmáticas basais de corticosterona sofrem alterações ao longo do dia, apresentando, em ratos, um aumento significativo um pouco antes do início do período escuro. Este aumento se mostra mais pronunciado nas fêmeas em proestro quando comparadas com fêmeas em outras fases do ciclo estral ou com machos (ATKINSON & WADDELL, 1997). Dessa forma, como os níveis plasmáticos de corticosterona já estavam mais elevados no período da coleta de sangue, isso pode ser uma possível explicação para o fato de não ter dado diferença significativa entre os grupos, em relação à concentração desse hormônio.

Analisando resultados da literatura, pode-se notar que a alteração na concentração plasmática de corticosterona varia de acordo com o paradigma de estresse utilizado e com o tempo no qual o animal permaneceu com o agente estressor. Dessa forma, Vahl e colaboradores (2005) mostraram que após o estresse agudo por contenção, durante 30 minutos, a concentração plasmática de corticosterona atingiu o pico em 30 minutos, considerando o início do estresse, ou seja, tal pico se deu exatamente após a aplicação do estresse. O retorno aos níveis basais se deu 120 minutos após o início do estresse.

Por sua vez, Caldeira & Franci (2000) realizaram um estudo no qual ratos machos foram submetidos a lesões no PVN e três semanas após as lesões, os mesmos animais foram submetidos a uma situação de estresse, por exposição ao éter, durante um minuto. A concentração plasmática de corticosterona, nesses animais, começou a aumentar de forma

significativa cinco minutos após o término do estresse e permaneceu elevada até 60 minutos após a exposição ao éter. Esta diferença pode ser atribuída ao paradigma de estresse empregado por estes autores.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a inibição do comportamento sexual, produzida pelo estresse, ocorre devido a uma ação hipotalâmica da Ang II, sendo que esta ação ocorre por meio dos receptores AT1, na porção parvocelular do PVN. Com isso, pode-se sugerir que essa inibição se dá de maneira indireta, mediada pelos neurônios parvocelulares do PVN, provavelmente por estimular a secreção de CRH, sabidamente um inibidor direto do comportamento sexual. Entretanto, não se descarta a possibilidade de um efeito direto da Ang II sobre áreas moduladoras do comportamento sexual (principalmente neurônios GnRH da área pré-óptica medial).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* 39:275-280, 2002.
- AGUILERA, G.; LIU, Y.; CHEN, J.; SUBBURAJU, S.; KAMITAKAHARA, A. Neuroendocrinology of Stress. *Annual Report of the Division of Intramural Research*, 2006.
- AGUILERA, G.; KISS, A.; LIU, Y.; KAMITAKAHARA, A. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress* Jun,10(2):153-61, 2007.
- ARMANDO, I.; VOLPI, S.; AGUILERA, G.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Research* 1142:92-9, 2007.
- ATKINSON, H. C. & WADDELL, B. J. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology*, Vol. 138, No. 9:3842-3848, 1997.
- AYALA, A. R. Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 46(6):619-625, 2002.
- BADOER, E. Cardiovascular Role of Parvocellular Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *News in Physiological Sciences* 11:43-47, 1996.
- BARNES, J. M.; STEWARDS, L. J.; BARBER, P. C.; BARNES, N. M. Identification and characterization of angiotensin II receptors subtypes in human brain. *European Journal of Pharmacology* 230:251-8, 1993.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J. C.; LELOIR, L. F.; MUNOZ, J. M. The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology* (Lond) 98:283-98, 1940.
- BREIGEIRON, M. K.; MORRIS, M.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. Effects of Angiotensin II Microinjected into Medial Amygdala on Male Sexual Behavior in Rats. *Hormones and Behavior* 41, 267-274, 2002.
- CALDEIRA, J. C. & FRANCI, C. R. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. *Brain Research Bulletin*, Vol. 52, No. 6:483-489, 2000.
- CALOGERO, A. E.; GALLUCCI, W. T.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin releasing hormone secretion. *The Journal of Clinical Investigation* 82:767-74, 1988.

- CAVERSON, M. M.; CIRIELLI, J.; CALARESU, F. R. Paraventricular nucleus of the hypothalamus: an electrophysiological investigation of neurons projecting directly to intermediolateral nucleus in the cat. *Brain Research* 305:380-383, 1984.
- CECCONELLO, A. L. Efeito do estresse agudo sobre o comportamento sexual de ratas: Participação do sistema angiotensinérgico central. Tese de Doutorado - PPG Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, 2009.
- CECCONELLO, A. L.; RAINEKI, C.; SEBBEN, V.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: Participation of the central angiotensinergic system. *Behavioural Brain Research* 5; 207(2):429-33, 2010.
- CHARMANDARI, E., TSIGOS, C.; CHROUSOS G. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology* 67:259-284, 2005.
- CHEN, M.; O'BYRNE, K.; CHIAPPINI, S.; HOTCHKISS, J.; KNOBIL, E. Hypoglycemic "stress" and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: role of the ovary. *Neuroendocrinology* 56:666-673, 1992.
- CHROUSOS, G. P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin releasing hormone perspective. *Endocrinology Metabolism Clinics North America* Dec, 21(4):833-58, 1992.
- CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:311-35, 1998.
- CHROUSOS, G. P. Organization and integration of the endocrine system. *Pediatric Endocrinology*, ed. M Sperling, pp. 1-14. Philadelphia: Saunders, 2002.
- CHROUSOS G. P. & GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *The Journal of the American Medical Association* 267:1244-1252, 1992.
- CHROUSOS, G. P.; D, M.; P, F. A. A.; P, M. A. C.; E, M. A. C. Organization and Integration of the Endocrine System. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2(2):125-145, 2007.
- DE GASPARO M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W.; UNGER, T. H. International Union of Pharmacology: XXIII. The angiotensin receptors. *Pharmacological Reviews* 52:415-72, 2000.
- DE KLOET, R. E. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers in Neuroendocrinology* 12:95-164, 1991.
- DE WIED, D. Pituitary – adrenal system hormones and behavior. *Acta Endocrinologica Supplementum* 214:9-18, 1977.
- DONADIO, M. V.; KUNRATH, A.; COREZOLA, K. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; SANVITTO, G. L. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual

- behavior and ovulation in female rats: Participation of the angiotensinergic system. *Physiology & Behavior* 23;92(4):591-600, 2007.
- DUNN, A. J. & BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotrophin-releasing factor administration: Is CRH a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Review* 15:71-100, 1990.
- FRANCIS-FLOYD, R. Stress - Its Role in Fish Disease. Circular 919: Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida, University of Florida, 1997.
- FERIN, M. The menstrual cycle: an integrate view. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*, Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven; 103-21, 1996.
- FERIN, M. Stress and the reproductive cycle. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84:1768-74, 1999.
- FOGO, A. B. Angiotensin receptors: beyond number one. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 13:275-277, 2004.
- GOMES, C. M. Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de Mestrado - PPG Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, 2001.
- GRZANNA, R. & MOLLIVER, M. E. The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5:21-40, 1980.
- HAUSSMANN, M. F.; VLECK, C. M.; FARRAR, E. S. A laboratory exercise to illustrate increased salivary cortisol in response to three stressful conditions using competitive ELISA. *Advances in Physiology Education* 31:110-115, 2007.
- HORI, N.; YUYAMA, N.; TAMURA, K. Biting Suppresses Stress-induced Expression of Corticotropin-releasing Factor (CRF) in the Rat Hypothalamus. *Journal of Dental Research* 83(2): 124-128, 2004.
- INAGAMI, T. KAMBAYASHI, Y.; ICHIKI, T.; TSUZUKI, S.; EGUCHI, S.; YAMAKAWA, T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clinical and Experimental Pharmacology and physiology* 26:544-549, 1999.
- JEONG, K.; JACOBSON, L.; WIDMAIER, E.; MAJZOUB, J. Normal Suppression of the Reproductive Axis Following Stress in Corticotropin-Releasing Hormone-Deficient Mice*. *Endocrinology*, Vol. 140, No. 4, 1702-1708, 1999.
- JOHNSTON, C. I. Angiotensin receptor antagonists for the treatment of hypertension. *Australian Prescriber* 21:95-7, 1998.
- JOHNSON E.; KAMILARIS, T.; CHROUSOS, G.; GOLD, P. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16:115-130, 1992.
- KALRA, S. P.; KALRA, P. S. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology Reviews* 4:311-351, 1983.

- KANNAN, H.; HAYASHIDA, Y.; YAMASHITA, H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256: R1325-R1330, 1989.
- KISS, J, Z. Dynamism of Chemoarchitecture in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Brain Research Bulletin*, Vol. 20 (issue 6):699-708, 1988.
- KOOB, G. F. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biological Psychiatry* 46:1167-1180, 1999.
- LIVEZEY, G.; MILLER, J.; VOGEL, W. Plasma norepinephrine, epinephrine and corticosterone stress responses to restraint in individual male and female rats, and their correlations. *Neuroscience Letters* 62:51-56, 1985.
- MA, S. & MORILAK, D. A. Norepinephrine Release in Medial Amygdala Facilitates Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Acute Immobilisation Stress. *Journal of Neuroendocrinology* 17:22-28, 2005.
- MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F.; LERANTH, C. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Research* 139:391-195, 1988.
- MITCHELL, J. C.; LI, X. F.; BREEN, L.; THALABARD, J.-C.; O'BYRNE, K. T. The Role of the Locus Coeruleus in Corticotropin-Releasing Hormone and Stress-Induced Suppression of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in the Female Rat. *Endocrinology* 146(1):323-331, 2005.
- MOREIRA, S.; LIMA, J.; SOUSA, M.; AZEVEDO, G. Estresse e função reprodutiva feminina. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, Recife, 5(1):119-125, jan/mar, 2005.
- NELSON, R. J. An Introduction to Behavioral Endocrinology. 2nd ed. Sinaver Associates, Inc Publishers Sunderland, Massachusetts, 1995.
- OLMOS, J.; BELTRAMINO, C. A.; ALHEID, G. Amygdala and Extended Amygdala of the rat. a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: *The rat nervous system*. Ed. PAXINOS, G., Elsevier Academy Press, London, 3 ed., 19:509-603, 2004.
- OLSTER, D. H. & FERIN, M. Corticotropin-releasing hormone inhibits gonadotropin secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 65:262–267, 1987.
- PAGE, I. H. Hypertension mechanisms. New York & Grune & Stratton [1102 pp], 1987.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat nervous system. *Australian Academic Press*, 1986.
- PFAFF, D. W. & SCHWARTZ-GIBLIN, S. Cellular Mechanisms of Female Reproductive Behaviors. *The Physiology of Reproduction*, 1988.

- PFAFF, D. W.; SACHWARTZ-GIBLIN, S.; McCARTHY, M. M.; KOW, L. K. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Press, NY, 2 ed., 2:207-220, 1994.
- RABIN, D. S.; JOHNSON, E. O.; BRANDON, D. D.; LIAPI, C.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biology of Reproduction* 42:74-80, 1990.
- RETANA-MÁRQUEZ, S.; SALAZAR, E. D.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* Jan, 21(1):39-50, 1996.
- RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. *Physiology & Behavior* Feb, 1;63(3):367-70, 1998.
- RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VAZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTINEZ-GARCIA, R.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior* Nov, 44(4):327-37, 2003.
- RIVEST, S. & RIVIER, C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocrine Reviews* 16:177-99, 1995.
- RIVIER, C.; RIVIER, J.; VALE, W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 231:607-609, 1986.
- RIVIER, C. & RIVEST, S. Effects of Stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Peripheral and Central Mechanisms. *Biology of Reproduction* 45:523-532, 1991.
- SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews* 13:329-80, 1992.
- SAAVEDRA, J. M.; ANDO, H.; ARMANDO, I.; BAIARDI, G.; BREGONZIO, C.; JUORIO, A.; MACOVA, M. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regulatory Peptides* 128: 227- 238, 2005.
- SAKAKURA, M.; TAKEBE, K.; NAKAGAWA, S. Inhibition of luteinizing hormone secretion induced by synthetic LRH by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 40, No. 5, 1975.
- SCHAFER, M.; MOUSA, S. A.; STEIN, C. Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation. *European Journal of Pharmacology* 323:1-10, 1997.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 4:32, 1936.
- SWANSON, L. W. & SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410-417, 1980.

- SWANSON, L. W. & SAWCENKO, P. E. Hypothalamic ontegration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience* 6:269-324; 1983.
- SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; LIND, R. W. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Progress in Brain Research* 68:169-190, 1986.
- SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W. The organization of ovine corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186, 1983.
- STOTT, G. H. What is Animal Stress and How is it Measured? *Journal of Animal Science* 52:150-153, 1981.
- TANAKA, T.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; TOMITA, M.; TANAKA, M. Expression of aggression attenuates both stress-induced gastric ulcer formation and increases in noradrenaline release in the rat amygdala assessed by intracerebral microdialysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59:27-31, 1998.
- TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C., CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F., BENFIELD, P., CARINI, D. J. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptors antagonists. *Pharmacological Reviews* 45:205-51, 1993.
- TSIGOS, C. & CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53:865-871, 2002.
- TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *American Journal of Physiology* 261:R209-16, 1991.
- VAHL, T. P.; ULRICH-LAI, Y. M.; OSTRANDER, M. M.; DOLGAS, M.; ELFERS, E. E.; SEELEY, R. J. ; D'ALESSIO, D. A.; HERMAN, J. P. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 289:E823-E828, 2005.
- VALE, W.; SPIESS, C.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397, 1981.
- VALENTINO, R. J.; FOOTE, S. L.; ASTON-JONES, G. Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Research* 270:363-367, 1983.
- VALLOTON, M. B. The renin–angiotensin systems. *Trends in Pharmacological Sciences* 8:69-74, 1987.
- WINGFIELD, J. C. & SAPOLSKY, R. M. Reproduction and Resistance to Stress: When and How. *Journal of Neuroendocrinology* 15(8): 711-724, 2003.

WONG, M. L.; LICINIO, J.; PASTERNAK, K. I.; GOLD, P. W. Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology* 135:2275-8, 1994.

YANG, G.; WAN, Y.; Zhu, Y. Angiotensin II - An Important Stress Hormone. *Neurosignals* 5:1-8, 1996.

YOON, H.; CHUNG, W. S.; PARK, Y. Y.; CHO, I. H. Effects of stress on female rat sexual function. *International Journal of Impotence Research* Jan-Feb,17(1):33-8, 2005.