

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

**EFEITO DO ESTRESSE AGUDO SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE
RATAS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ANGIOTENSINÉRGICO CENTRAL**

TESE DE DOUTORADO

Ana Lúcia Cecconello

Porto Alegre

2009

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

**EFEITO DO ESTRESSE AGUDO SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE
RATAS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ANGIOTENSINÉRGICO CENTRAL**

Ana Lúcia Cecconello

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvito

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal Do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Porto Alegre

2009

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me conceder a capacidade de superar as dificuldades encontradas.

Aos orientadores, Professores **Gilberto Luiz Sanvitto e Aldo Lucion** pela oportunidade concedida, pela compreensão e pelos ensinamentos necessários para a minha formação desde a iniciação científica.

A Professora **Maria Flávia Marques Ribeiro** pelos ensinamentos durante a iniciação científica que contribuíram fortemente para minha formação.

Aos Professores **Celso Rodrigues Franci e Carla Dalmaz** por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

A Professora **Matilde Achaval** pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

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

Aos amigos **Carmem Gomes, Charlis Raineiki e Marcio Donadio** pela amizade sincera e pelos ensinamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À colega de curso **Luisa Diehl** pela amizade e pelo apoio técnico.

Às colegas e amigas **Karin, Helena e Natália** por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas de laboratório, **Márcia, Adolfo, Christiane, Patrícia, Caroline, Anelise, Silvana, Ligia, Marcelo Souza, Marcelo Herberts, Jéferson, Sara e Maiara** pelo apoio sempre que necessário e também pelo carinho de todos.

A **Vanise e Bruno**, alunos de iniciação científica, pela ajuda em experimentos e pela amizade.

A **Damián Villalon** pelo carinho, pela amizade e por suas sábias palavras ditas em momentos difíceis encontrados durante a realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pela bolsa de doutorado.

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

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
1. Resposta ao Estresse.....	13
2. Comportamento sexual em ratas.....	16
3. Estresse e função reprodutiva em fêmeas.....	19
4. A Angiotensina II Central e sua participação no controle da resposta ao estresse e das funções reprodutivas.....	20
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO I.....	27
CAPÍTULO II.....	33
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS.....	53

ABREVIATURAS

ACTH - corticotrofina

Ang II - angiotensina II

AOB - bulbo olfatório acessório

ASO - sistema olfatório acessório

AT₁ - receptor angiotensinérgico tipo I

AT₂ - receptor angiotensinérgico tipo II

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HPA - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

LC - *Locus Coeruleos*

LH - hormônio luteinizante

MeA - núcleo medial da amígdala

MPOA - área pré-optica medial

NA - noradrenalina

PRL - prolactina

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo

SNC - sistema nervoso central

VMH - hipotálamo ventromedial

VP - vasopressina

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO:

Figura 1: Esquema representativo das vias neurais envolvidas no controle do comportamento sexual. 18

CAPÍTULO I:

Figura 1: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual..... 18

Figura 2: Efeito da coinjeção de Ang II e Losartan ou PD12319 na MeA sobre o comportamento sexual..... 29

Figura 3: Efeito da microinjeção de Losartan ou PD12319 na MeA no efeito do estresse agudo de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual..... 30

CAPÍTULO II:

Figura 1: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o quociente de lordose de ratas obtido ao longo do tempo de 15 minutos de observação comportamental após o estresse..... 36

Figura 2: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o quociente de lordose avaliado imediatamente após e 60 minutos após o término do estresse..... 43

Figura 3: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre a concentração plasmática de corticosterona..... 43

Figura 4: Efeito da microinjeção de losartan na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual em ratas avaliado imediatamente após o término do estresse..... 44

Figura 5: Efeito da microinjeção de losartan na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre a concentração plasmática de corticosterona avaliada 75 minutos após o término do estresse..... 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

Tabela 1: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro (experimento 1), co-injeção de Ang II com Losartan ou PD12319 na MeA (experimento 2) e microinjeção de Losartan ou PD12319 na MeA de ratas estressadas (experimento 3) sobre a duração da locomoção e número de óvulos.....	30
--	----

RESUMO

O estresse pode influenciar o comportamento reprodutivo em fêmeas, sendo a angiotensina II (Ang II) central um peptídeo que participa das respostas ao estresse e da modulação do comportamento sexual. A amígdala medial (MeA), importante estrutura reguladora deste comportamento, está fortemente envolvida na resposta ao estresse. O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito do estresse agudo por contenção na noite do proestro sobre a receptividade sexual, concentração plasmática de corticosterona e a participação da Ang II e MeA sobre estes efeitos. Foram utilizadas ratas Wistar adultas com ciclos estrais regulares. O protocolo de estresse agudo utilizado foi contenção por 15 min na noite do proestro. A participação da Ang II foi avaliada pela microinjeção de Ang II e antagonistas dos receptores de Ang II (losartan e PD12319) na MeA. Foi avaliado o quociente de lordose e a concentração plasmática de corticosterona em diferentes tempos. O estresse ou a microinjeção de Ang II na MeA provocaram significativa redução do comportamento sexual. O bloqueio dos receptores AT₁ ou AT₂ presentes na MeA preveniram tanto o efeito do estresse como da microinjeção de Ang II neste núcleo sobre a receptividade sexual. O estresse provocou aumento da concentração plasmática de corticosterona e este efeito foi prevenido pelo bloqueio dos receptores AT₁ na MeA. Concluímos que o estresse agudo por contenção na noite do proestro reduz o comportamento sexual e ativa o eixo HPA, e estes efeitos são mediados pela Ang II agindo na MeA.

ABSTRACT

Stress might influence the reproductive behavior in females, and central angiotensin II (Ang II) is a peptide that plays a role in the stress response and in the modulation of sexual behavior. The medial amygdala (MeA), an important structure that regulates this behavior, is strongly involved in the stress response. The aim of the present study was to evaluate the effect of acute restraint stress on the night of proestrus on sexual receptivity, plasma corticosterone concentration and the participation of Ang II and MeA in these effects. Adult female Wistar rats with regular estrous cycles were utilized. The acute stress protocol utilized was the restraint stress for 15 minutes on the night of proestrus. The participation of Ang II was evaluated by injecting Ang II and Ang II receptor antagonists (losartan and PD12319) into the MeA. The lordosis quotient and plasma corticosterone concentration were evaluated. Stress or the microinjection of Ang II into the MeA significantly reduced sexual behavior. The blockade of AT₁ or AT₂ receptors in the MeA prevented the effect of stress and the effect of Ang II microinjection into this nucleus on sexual receptivity. Stress caused an increase in plasma corticosterone and this effect was prevented by blockade of AT₁ receptors in the MeA. We concluded that acute restraint stress on the night of proestrus reduces sexual behavior and activates the HPA, and these effects are mediated by Ang II acting in the MeA.

INTRODUÇÃO

1. Respostas ao Estresse

A manutenção da vida de um organismo depende do complexo e harmonioso equilíbrio dinâmico, denominado homeostase. Para a preservação deste equilíbrio são necessárias constantes adaptações aos estímulos externos ou internos ao organismo, que envolvem mudanças comportamentais, neurovegetativas e endócrinas necessárias para restabelecer a homeostase (Chrousos, 2009).

Indivíduos expostos a situações ameaçadoras apresentam uma série de respostas físicas e mentais (respostas ao estresse), que se contrapõem aos efeitos dos estímulos ameaçadores (estressores). Centralmente, ocorre estimulação de vias neurais que levam ao estado de alerta do indivíduo e, ao mesmo tempo, inibição de vias envolvidas no controle do comportamento alimentar e de funções reprodutivas, que neste momento se tornam secundárias à preservação do indivíduo e da espécie. Periféricamente, é observado aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipnéia, gliconeogênese e lipólise com o objetivo de aumentar a disponibilidade de substratos vitais, principalmente para o SNC e tecido muscular. Essas ações em conjunto asseguram a manutenção da homeostase permitindo ao organismo enfrentar situações desfavoráveis e garantir sua sobrevivência (Chrousos & Gold, 1992; Pacak & Palkovits, 2001; Chrousos, 2009). A resposta adequada ou adaptativa do sistema de estresse é fundamental para a ocorrência da sensação de bem-estar e de interações sociais positivas. Por outro lado, respostas inapropriadas ou não-adaptativas desse sistema causam alterações patológicas do ponto de vista endócrino, imunológico e psiquiátrico (Charmandari *et al*, 2005; Chrousos, 2009).

Os principais componentes envolvidos nas respostas ao estresse são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o *Locus Coeruleos* (LC) e o sistema

neurovegetativo. O estresse induz a ativação do eixo HPA promovendo a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP) por neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), os quais atuam na hipófise anterior promovendo a liberação de corticotrofina (ACTH) e consequentemente a liberação de glicocorticóides pelo córtex da glândula adrenal. Os glicocorticóides, por outro lado exercem um controle de *feedback* negativo sobre o eixo HPA impedindo a secreção em excesso deste hormônio, evitando danos ao organismo (Pacak & Palkovits, 2001; Herman *et al*, 2003; Chrousos, 2009).

O aumento da atividade da divisão simpática do sistema neurovegetativo, durante a resposta ao estresse, resulta na liberação periférica de noradrenalina (NA) a partir dos terminais simpáticos e de adrenalina pela medula adrenal (Aguilera *et al*, 1994; Tsigos & Chrousos, 2002; Chrousos, 2009). A NA central secretada em resposta ao estresse é originada, principalmente, do LC (Pacak & Palkovits, 2001) e liberada em várias regiões do encéfalo envolvidas na resposta ao estresse (Chrousos & Gold, 1992; Morilak *et al*, 2005). A ação conjunta dos glicocorticóides e das catecolaminas resulta na manutenção de aporte energético e modulação das respostas cardiovasculares, imunes e comportamentais necessárias para o organismo restabelecer a homeostasia (Aguilera *et al*, 1994; Morilak *et al*, 2005; Chrousos, 2009).

Estruturas do sistema límbico como amígdala, área septal e habênula, hipocampo e córtices entorrinal, cingulado e piriforme estão envolvidas na organização das respostas ao estresse (Pacak & Palkovits, 2001). Durante a resposta ao estresse, o PVN recebe informações de aferências vindas destas regiões e de núcleos do tronco encefálico, entre eles o LC (Herman *et al*, 2003), resultando em rápido aumento de c-fos (Ceccatelli *et al*, 1989) seguido de síntese de CRH e VP (Lightman & Young, 1987;

1988). O PVN é um centro integrador de respostas endócrinas, vegetativas e comportamentais (Chrousos, 2009), assim como o sistema noradrenérgico central também exerce função integrativa, principalmente por facilitar a transmissão sináptica em áreas do SNC envolvidas na regulação destas respostas (Ma & Morilak, 2004). A NA influencia a atividade do eixo HPA diretamente, agindo no PVN (Russel *et al*, 2008), ou indiretamente por meio de áreas extra-hipotalâmicas, como a amígdala medial e núcleo próprio da estria terminal (Cecchi *et al*, 2002; Ma & Morilak, 2005). Além disso, a atividade do eixo HPA pode ser modulada por outros neurotransmissores e hormônios, tais como angiotensina II (Raasch *et al*, 2006; Müller *et al*, 2009), ocitocina (Ochedalski *et al*, 2007), serotonina (Wang *et al*, 2009), dopamina (Belda & Armario, 2009) e os esteróides gonadais (Ochedalski *et al*, 2007; Larkin *et al*, 2009).

Em geral, os estressores podem ser divididos em quatro principais categorias: 1) *estressores físicos* como calor, intensa radiação, vibração, dor, entre outros; 2) *estressores psicológicos*, os quais envolvem processos emocionais e podem resultar em alterações comportamentais como ansiedade e medo; 3) *estressores sociais*, os quais incluem a entrada do animal no território de outro animal dominante, por exemplo; 4) *estressores que desafiam a homeostasia cardiovascular e metabólica*, como a hemorragia, hipoglicemia e exercício. Muitos modelos de estresse podem apresentar componentes de mais de uma destas categorias, como por exemplo, o estresse por contenção, o qual é considerado como um estressor psicológico acompanhado de componentes de estressores físicos, como dor e alteração da temperatura corporal. Vários tipos de estressores podem evocar diferentes respostas e ativar de forma distinta circuitos neurais envolvidos nestas respostas (Pacak & Palkovits, 2001).

O complexo amigdalóide tem sido fortemente implicado em muitos aspectos da resposta ao estresse incluindo ativação do eixo HPA (Dunn & Whitener, 1986; Ma & Morilak, 2005; Hill *et al*, 2009). Durante a resposta ao estresse psicológico é observado grande atividade neural no núcleo medial da amígdala (MeA) (Dayas *et al*, 1999). Foi demonstrado que a MeA modula a ativação do eixo HPA durante o estresse agudo por imobilização (Ma & Morilak, 2005). Lesões na MeA reduzem a expressão de Fos em neurônios CRH e ocitocinérgicos no PVN em resposta ao estresse por contenção (Dayas *et al*, 1999), sugerindo que a MeA é um importante componente da circuitaria neural envolvida na ativação do eixo HPA neste tipo de estresse.

2. Comportamento Sexual em ratas

A receptividade sexual da rata ocorre na fase do proestro e inclui componentes considerados proceptivos, como a investigação dos genitais do macho, pequenas corridas, vocalizações e contatos físicos efêmeros. Nestes animais, o componente mais proeminente do comportamento sexual é a postura de receptividade assumida pela fêmea no momento da cópula, denominada reflexo de lordose. Esta postura é caracterizada pela flexão dorsal da coluna vertebral em resposta à monta executada pelo macho, auxiliando a intromissão peniana. Na ausência da lordose a intromissão e ejaculação não serão possíveis, demonstrando a importância deste comportamento para o sucesso reprodutivo destes animais (Pfaff *et al*, 1994; Nelson, 2005).

O comportamento sexual é um processo dependente de estrógeno e progesterona, os quais apresentam concentrações plasmáticas elevadas durante a fase do proestro (Pfaff *et al*, 1994; White & Uphouse, 2004; Gomes *et al*, 2005). Cabe ressaltar que os

receptores de progesterona parecem ser mais importantes do que o próprio esteróide, visto que esses podem ser ativados, independente da presença de progesterona, induzindo a receptividade sexual da fêmea (Mani, 2001; Auger, 2001). Estudos demonstram que a dopamina, por exemplo, pode ativar receptores de progesterona e exercer suas ações na modulação do comportamento sexual em ratas (Auger, 2001). Assim como o estrógeno e a progesterona, o pico de prolactina (PRL) que ocorre na tarde do proestro é fundamental para a gênese do comportamento sexual na noite do proestro. Desta forma, a PRL, o estrógeno e a progesterona atuam de modo sincronizado para a organização deste comportamento (Witcher & Freeman, 1985; Pfaff *et al*, 1994)

O comportamento de lordose ocorre quando o macho, durante a monta, produz a estimulação de receptores sensoriais, presentes nos flancos e no períneo da fêmea, iniciando o impulso nervoso que chega até a medula espinhal e posteriormente na formação reticular e substância cinzenta periaquedutal, no mesencéfalo. (Pfaff *et al*, 1994; Pfaus, *et al*, 1993; Holstege, *et al*, 1997). Ao mesmo tempo, outra via sensorial é estimulada pela presença do macho, exercendo efeito estimulatório para o reflexo de lordose. Esta via inclui o sistema olfatório acessório (ASO), o qual é composto pelo órgão vomeronasal (uma região quimicamente sensível aos feromônios localizada dentro da cavidade nasal), pelo bulbo olfatório acessório (AOB) e projeções do AOB para o núcleo MeA (Rajendren *et al*, 1990; Rajendren & Moss, 1993).

A MeA, um importante núcleo envolvido no controle do comportamento de lordose (Rajendren & Moss, 1993; Bennett *et al*, 2002), age como um centro processador de informações vindas do ASO e as envia ao hipotálamo ventromedial (VMH) e área pré-óptica medial (MPOA) permitindo a gênese deste comportamento

(Rajendren *et al*, 1990; 1991; Rajendren & Moss, 1993; Canteras *et al* 1995; Olmos *et al*, 2004). O VMH governa o componente motor do reflexo de lordose incluindo as seguintes projeções: do hipotálamo ventromedial– substância cinzenta periaquedutal - formação reticular bulbar –medula espinhal – músculos envolvidos na execução da lordose (Pfaff *et al*, 1994; Pfaus, *et al*, 1993; Holstege, *et al*, 1997). (Veja Fig. 1)

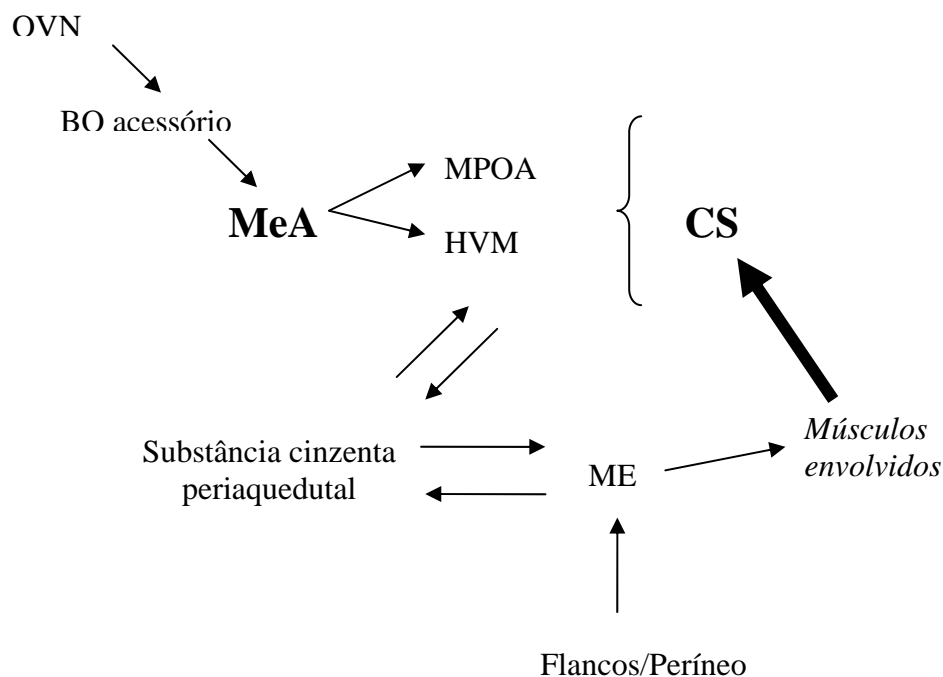


Fig. 1: Esquema representativo das vias neurais envolvidas no controle do comportamento sexual.

Evidências indicam que o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é um importante estimulador do comportamento sexual em ratas (Rajendren & Moss, 1993; Wu *et al*, 2006). Foi observado aumento da expressão de Fos em neurônios GnRH, demonstrando aumento de atividade neuronal, de regiões envolvidas no controle do comportamento sexual, principalmente na MPOA, em resposta aos estímulos sensoriais

relacionados a este comportamento (Rajendren & Moss, 1993). A destruição bilateral da MeA reduz o comportamento de lordose e a expressão de Fos em neurônios GnRH na MPOA (Rajendren & Moss, 1993), demonstrando que a MeA exerce um papel fundamental na ativação do sistema GnRH e conseqüentemente na estimulação deste comportamento.

Foi demonstrado que vias aferentes para a MPOA produzem uma inibição tônica para o comportamento sexual em ratas, pois a destruição destas vias estimula o reflexo de lordose (Yamanouchi & Arai, 1977). Considerando que a MPOA apresenta receptores gabaérgicos tipo A e B (Tanaka *et al*, 2003; Kolaj *et al*, 2004), é possível que este efeito inibitório tônico seja exercido por neurônios gabaérgicos que fazem sinapses com neurônios da MPOA, impedindo-os de responderem aos hormônios gonadais. Se esta inibição for removida, então o animal responderá ao estímulo sexual, possivelmente por ação dopaminérgica (Hull *et al.*, 1999).

3. Estresse e função reprodutiva em fêmeas

Os processos reprodutivos, incluindo o comportamento sexual, ocorrem de forma adequada desde que as condições, tanto externas quanto internas ao organismo, sejam ideais (Chrousos, 2009). O estresse exerce influência inibitória sobre as funções reprodutivas, e esse efeito tem sido observado pela diminuição da secreção de hormônios envolvidos no controle destas funções, como PRL, LH e progesterona (Donadio *et al*, 2007) bem como pela redução do número de óvulos (Donadio *et al.*, 2007). Além disso, tanto o estresse agudo como o estresse crônico, em geral, provocam redução do comportamento sexual em ratas (White & Uphouse, 2004; Yoon *et al*, 2005; Uphouse *et al*, 2007; Donadio *et al*, 2007).

Propõe-se que o CRH seja um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse através da inibição da secreção de LHRH (Li *et al*, 2005; 2006; Mitchell *et al*, 2005). Evidências indicam que o CRH inibe a secreção pulsátil de LHRH diretamente agindo em neurônios GnRH (Mitchell *et al*, 2005). Além disso, o CRH também pode inibir a secreção de GnRH através de vias noradrenérgicas vindas do LC que se projetam para a MPOA (sítio rico em neurônios GnRH), agindo em neurônios gabaérgicos, e que esse circuito exerce um papel fundamental na supressão do pulso de GnRH provocado pelo estresse (Mitchell *et al*, 2005).

4. A Angiotensina II Central e sua participação no controle da resposta ao estresse e das funções reprodutivas

A Angiotensina II (Ang II) é um octapeptídeo sintetizado a partir de Angiotensina I sendo esta reação catalizada pela enzima de conversão da angiotensina (ECA). A Angiotensina I é derivada do angiotensinogênio por ação de renina a qual é liberada pelas células do aparelho justa-glomerular.

A Ang II, sintetizada periféricamente, exerce seus efeitos no sistema nervoso central indiretamente através dos órgãos circunventriculares, já que em condições fisiológicas a Ang II não atravessa a barreira hematoencefálica (Saavedra 1992; Phillips & Oliveira 2008). Além do sistema renina-angiotensina periférico, envolvido com regulação da função cardiovascular, sede, apetite por sal e liberação de vasopressina, a Ang II é, também, um peptídeo produzido dentro do sistema nervoso central (Saavedra

1992) agindo como neurotransmissor ou modulador para influenciar a neurotransmissão e excitabilidade dos neurônios (Pan, 2004). A presença de RNAm para todos os componentes do sistema renina-angiotensina no hipotálamo, sistema límbico e outras regiões do SNC (Saavedra 1992) e a observação de Ang II armazenada dentro de vesículas nos terminais sinápticos em áreas com alta concentração de receptores para Ang II, demonstram que este peptídeo também é produzido dentro do sistema nervoso central agindo diretamente em regiões específicas do mesmo (Pan, 2004). A Ang II central parece contribuir para a regulação fina dos processos fisiológicos. A distância entre o sítio de liberação dessa e o seu receptor é consideravelmente menor quando comparada com a Ang II na circulação periférica, o que permite que a ação da Ang II central seja mais rapidamente ajustada (Phillips, 1987). As concentrações deste peptídeo no tecido nervoso são relativamente baixas e difíceis de serem mensuradas (Phillips, 1987), variando, em ratos, de 590 fmol/g de tecido no hipotálamo a 15 fmol/g de tecido no córtex (Pan, 2004).

A Ang II produz seus efeitos através de seus receptores do tipo 1 (AT₁) ou do tipo 2 (AT₂) (Saavedra *et al*, 2005). No encéfalo de ratos adultos o tipo de receptor predominante é o AT₁ (Murphy *et al*, 1991; Tsutsumi & Saavedra, 1991), embora em algumas áreas coexistam tanto AT₁ quanto AT₂ como, por exemplo, na MeA (Breigeiron *et al*, 2002). Quanto aos mecanismos de ação envolvidos nestes dois sistemas de receptores acoplados a proteínas G, pode-se observar que a estimulação dos receptores AT₁ por Ang II produz redução da corrente de K⁺ e estimulação da corrente de Ca⁺⁺, levando a uma despolarização da membrana destas células, o que classifica este receptor como estimulatório (Zhu *et al*, 1997). Os receptores AT₂, quando estimulados, provocam aumento da corrente de K⁺, causando uma hiperpolarização da

membrana, portanto sendo este um receptor inibitório (Zhu *et al*, 1998; 2000), sugerindo que os receptores AT₁ e AT₂ apresentam efeitos celulares opostos. Por outro lado, a estimulação dos receptores AT₂ provoca aumento na taxa de disparo em neurônios da oliva inferior (Ambuhl *et al*, 1992) e redução da mesma em neurônios no LC (Reagan *et al*, 1996). A expressão do receptor AT₂ encontra-se aumentada na oliva inferior e reduzida no núcleo ventrolateral do tálamo durante a resposta ao estresse em ratos hipertensos (Bregonzio *et al*, 2008). Isso sugere que os receptores AT₂ podem apresentar funções diferentes e serem modulados de forma diferente por um mesmo estímulo conforme sua localização.

Além disso, existem evidências demonstrando que os receptores AT₁ e AT₂ podem atuar de forma sinérgica. A estimulação do receptor AT₂ antagoniza a ação do receptor AT_{1A} no controle da pressão arterial, enquanto que o bloqueio tanto do receptor AT_{1A} como do AT₂ inibem a ingestão hídrica induzida pela injeção icv de Ang II (Li *et al*, 2003). A atividade anorexigênica da Ang II, após ser administrada centralmente, é prevenida pela co-injeção com antagonista AT₂ e parcialmente prevenida com a co-injeção com antagonista AT₁ (Ohinata *et al*, 2008). Com isso, pode-se determinar que existe interação entre estes dois sistemas de receptores e estes podem apresentar efeitos opostos ou semelhantes dependendo do local onde se encontram.

Durante o estresse ocorre aumento do conteúdo de Ang II no hipotálamo e glândulas adrenais (Yang *et al*, 1996), aumento da densidade de receptores de Ang II no PVN e no órgão subfornicial (Castren & Saavedra 1988) e aumento da expressão de RNAm para o receptor AT₁ no PVN e para o receptor AT₂ no LC (Dumont *et al*, 1999). O estresse também produz aumento da concentração plasmática de Ang II (Yang *et al*,

1996), demonstrando que este ativa os dois sistemas angiotensinérgicos periférico e central (Saavedra *et al*, 2005). O bloqueio do receptor AT₁ diminui a resposta do eixo HPA ao estresse, alterando a síntese e liberação de CRH pelo PVN (Jezova *et al*, 1998; Armando *et al*, 2001, 2007), o que evidencia um importante papel da Ang II nesta resposta.

A interação da Ang II com os hormônios que controlam a reprodução está bem caracterizada. O estradiol modifica a concentração de receptores de Ang II em várias regiões do SNC (Jonklaas & Buggy, 1985; Seltzer *et al*, 1993; Jöhren *et al*, 1997). Evidências demonstram que o estrógeno produz redução na ligação de Ang II na hipófise e órgão subfornicial de ratas ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (Kisley *et al*, 1999).

Além disso, a administração intracerebroventricular (icv) de Ang II afeta a liberação de LH de modo dependente dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona (Steele, 1992). De fato, em ratas ovariectomizadas não tratadas com esteróides gonadais, este peptídeo inibe a liberação pulsátil de LH. Ao contrário, em animais com reposição hormonal ela estimula esta liberação (Steele *et al*, 1985). O estímulo da Ang II central para secreção de LH não ocorre diretamente no gonadotrofo (Steele, 1992). A ação indireta da Ang II ocorre presumivelmente através da liberação de noradrenalina (NA) endógena no LC, que por sua vez atua sobre receptores alfa-adrenérgicos da MPOA facilitando a secreção de GnRH ou diretamente sobre neurônios GnRH (Gitler & Barraclough, 1987; Franci *et al*, 1990; Steele, 1992; Ganong, 1993; Dornelles & Franci, 1998). Sabe-se que há aumento do conteúdo de Ang II hipotalâmica no proestro quando comparado com o diestro em fêmeas intactas (Ghazi *et al*, 1994). Conforme Steele *et al*, (1983) a administração icv de Ang II em ratas,

durante a manhã do proestro, aumenta a secreção de LH. Já a microinjeção icv de saralasiã, um antagonista AT₁/AT₂, durante a tarde do proestro, inibe o pico de LH e bloqueia a ovulação, demonstrando a importância da Ang II no controle da ovulação.

Por outro lado, evidências demonstram que a Ang II central inibe o comportamento sexual. Estudos mostram que injeções icv de Ang II diminuem o comportamento sexual em ratos machos (Clark, 1989; Keaton & Clark, 1998). Além disso, microinjeções de Ang II na MeA também diminuem o comportamento sexual em ratos machos e este efeito parece envolver a interação entre os receptores AT₁ e AT₂ (Breigeiron *et al*, 2002).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

- Avaliar o efeito do estresse agudo por contenção sobre o comportamento sexual de ratas.
- Investigar a participação dos receptores AT₁ e/ou AT₂, presentes na MeA, no efeito do estresse agudo por contenção sobre o comportamento sexual de ratas.
- Investigar se a Ang II, agindo na MeA, participa da modulação do eixo HPA durante a resposta ao estresse agudo por contenção.

Objetivos específicos:

- Verificar o efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o quociente de lordose em ratas.
- Verificar o efeito da coinjeção de Ang II com Losartan (antagonista AT₁) ou PD 123 (antagonista AT₂) na MeA sobre o comportamento sexual em ratas.
- Verificar o efeito da microinjeção de losartan ou PD 123 na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o quociente de lordose em ratas.
- Verificar o efeito da microinjeção de losartan na MeA sobre a concentração plasmática de corticosterona em ratas estressadas e correlacionar com os dados de comportamento sexual nestes animais.

CAPÍTULO I

Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: Participation of the central angiotensinergic system. Behavioural Brain Research.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: Participation of the central angiotensinergic system

Ana Lúcia Ceconello*, Charlis Raineki, Vanise Sebben, Aldo Bolten Lucion, Gilberto Luiz Sanvitto

Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90050-170, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2009

Received in revised form 15 October 2009

Accepted 20 October 2009

Available online 29 October 2009

Keywords:

Stress

Sexual behavior

Angiotensin II

Medial amygdala

Females

Losartan

PD12319

ABSTRACT

Stress might influence the reproductive behavior in females, and central angiotensin II (Ang II) is a peptide that plays a role in stress response and in the modulation of sexual behavior. The medial amygdala (MeA), an important structure that regulates this behavior, is strongly involved in stress response. The aim of the present study was to evaluate the effect of acute restraint stress on the night of proestrus on sexual receptivity in female rats and the participation of Ang II and MeA in this effect. Adult female Wistar rats with regular estrous cycles were utilized. The acute stress protocol utilized was the restraint stress for 15 min on the night of proestrus. The participation of Ang II was evaluated by injecting Ang II and Ang II receptor antagonists (losartan and PD12319) into the MeA. The lordosis quotient was recorded. The stress or the microinjection of Ang II into the MeA significantly reduced sexual behavior. The blockade of AT₁ or AT₂ receptors in the MeA prevented the effect of stress and the effect of Ang II microinjection into this nucleus on sexual receptivity. We concluded that acute restraint stress on the night of proestrus reduces sexual behavior in rats, and this effect is mediated by both AT₁ and AT₂ receptors in the MeA.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Different stress paradigms, in general, induce a decreased sexual behavior in female rats [18,58,59,63]. The effect of acute stress on sexual receptivity may vary according to the time at which stress is applied on the day of proestrus, phase of the estrous cycle in which the female is receptive to the male [18].

One of the major stress hormones, Ang II, increases in the plasma as well as in the central nervous system in response to stress stimulation [62]. Stress increases the density of Ang II binding sites in the hypothalamic paraventricular nucleus and subfornical organ of rats [13]. Indeed, the Ang II receptor blockade completely abolishes the HPA response to stress, strongly supporting that Ang II plays a major role as stress hormone [3,4,51].

The medial nucleus of the amygdala (MeA), an important regulatory structure of sexual behavior in male and female rats [6,10,15,16,47,48], is also involved in stress responses. Studies have shown changes in dendritic spine density [32] and an increase in the c-fos expression [17] in the MeA in rats exposed to different stress paradigms. This nucleus expresses both Ang II receptors type AT₁ and AT₂ [7,8,10,57], and also contains Ang II [36]. The microinjec-

tion of this peptide into the ventricular system [14,25] or directly into the MeA [10] promotes a reduction in sexual behavior in male rats.

In the present study, we proposed to investigate the influence of acute stress on the night of proestrus on the sexual behavior of female rats, period in which they show greater sexual receptivity [34]. Considering that stress activates the central angiotensinergic system [62], and that Ang II inhibits sexual behavior in males [10,14,25], and also, that the MeA is involved in stress response [17,32], regulates sexual behavior [6,47,48] and shows specific Ang II binding sites [7,8,10,57], we proposed to analyze the participation of Ang II in the MeA as a mediator of the stress effect on sexual behavior in female rats.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult female Wistar rats were obtained from the colony of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). Animals were housed in a temperature-controlled room (22 ± 1 °C) with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 0600 h) and free access to food (Rodent chow-Nutrilab, Colombo, Brazil) and water. In all experiments vaginal smears were taken daily and only female rats with at least 3 consecutive regular estrous cycles were used. All procedures and care of the animals are in agreement with the National Institute of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committee of UFRGS—registration number of the project 2007841 (accredited with the National Commission of Ethics in Research).

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33083359; fax: +55 51 33083092.

E-mail address: analuciaceconello@yahoo.com.br (A.L. Ceconello).

2.2. Experiment 1: effect of acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus on sexual behavior, number of oocytes and time of locomotion

Adult female rats were submitted to acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus. Acute restraint stress consisted in placing the animals in a plastic cylinder (4.7 cm in diameter and 17.7 cm in length) for 15 min. The animals' behavior was registered for 15 min, immediately after the end of the stress period. These procedures were taken during the dark period of the cycle (from 1900 to 2000 h). In order to register sexual behavior, the female rats were tested with a proven breeder male in the observation cage (70 cm × 70 cm × 35 cm). The behavioral parameters analyzed were: frequency of lordosis, frequency of mounts and time of locomotion (in s) of the female. The lordosis quotient, which is an index of female sexual receptivity, was calculated by dividing the number of lordoses by the number of mounts [54]. In the morning of the estrus (9000 h), the animals were decapitated, the ovaries removed and the oviduct dissected and crushed between two microscope slides. The number of oocytes of both oviduct ampullae was counted under the microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) with a 2.5× lens.

2.3. Experiment 2: effect of coinjection of Ang II with AT₁ antagonist (losartan) and AT₂ antagonist (PD12319) into the MeA on sexual behavior, number of oocytes and time of locomotion

Adult female rats were anesthetized with xylazine (Rompum, Bayer, São Paulo, Brazil; 50 mg/kg, i.p.), followed by ketamine hydrochloride (Francotar, Parke-Davis, São Paulo, Brazil; 100 mg/kg, i.p.) and bilateral guide cannulae (11 mm × 0.6 mm) were inserted 2 mm dorsally to the MeA using a stereotaxic instrument (David Kopf Instruments, Tujunga, USA). The coordinates used were determined in accordance with the atlas of the rat brain (2.7 mm posteriorly to the bregma, 3.5 mm laterally to the sagittal line and 6.4 mm ventrally to the dura mater) [39]. The cannula was anchored to the skull using steel screws and dental cement.

Female rats with at least one regular estrous cycle after surgery on the night of proestrus received the injections into the MeA 15 min before behavioral registry according to the following experimental groups: saline (0.9%); Ang II–Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-Hist-Pro-Phe (Sigma, St Louis, USA; 200 fmol); Ang II (200 fmol) + losartan–AT₁ antagonist (DUP 753, Du Pont, DE, USA; 20 pmol); Ang II (200 fmol) + PD12319–AT₂ antagonist (PD12319, Sigma St Louis, USA; 40 nmol); losartan (20 pmol); PD12319 (40 nmol). Injections were manually given in a volume of 0.3 μL using a 1-μL Hamilton syringe connected by polyethylene tubing (PE10) to an injecting needle that remained in the MeA for 1 min after injection. The injecting needle (13 mm × 0.3 mm) was 2 mm longer than the guide cannulae. The tubing and needle had been previously filled with the solution, which was then infused. The behavior was registered as described in experiment 1. These procedures were taken during the dark period of the cycle (from 1900 to 2000 h).

In the morning of the estrus (9000 h), the animals were decapitated, the ovaries removed and the number of oocytes was counted as described in experiment 1. The brains were removed, fixed by immersion with 4% solution of paraformaldehyde (Merck, Germany) diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3 and sectioned using a vibratome (Leica, Germany). The sections (100 μm) were stained with cresyl violet (Merck, Germany) and analyzed by an optical microscope (Zeiss, Germany) to verify the position of the cannulae and the microinjection site. Only animals with both microinjections within the MeA were included in the data analysis.

2.4. Experiment 3: participation of the central angiotensinergic system and MeA in the effect of acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus on sexual behavior and time of locomotion

Adult female rats were anesthetized and bilateral guide cannulae were inserted 2 mm dorsally to the MeA as described in experiment 2. Rats with at least one regular estrous cycle after surgery on the night of proestrus received microinjections into the MeA 15 min before stress, according to the following experimental groups: NINS (no microinjection/no stress); SaNS (saline microinjection/no stress); SaS (saline microinjection/with stress); LosS (losartan microinjection/with stress); PDS (PD12319 microinjection/with stress).

Losartan and PD12319 doses as well as the procedures for microinjections into the MeA were the same utilized in experiment 2. The female rats were submitted to acute restraint stress for 15 min, followed by 15 min of behavioral registry as described in experiment 1. The histology to verify the position of the cannulae and the microinjection site was performed as described in experiment 2. Only animals with both microinjections within the MeA were included in the data analysis.

2.5. Statistical analysis

The results were expressed as mean (±SEM). The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test. In the case of only 2 experimental groups Student's *t*-test for independent samples was used. Statistical significance was assumed as *P* < 0.05.

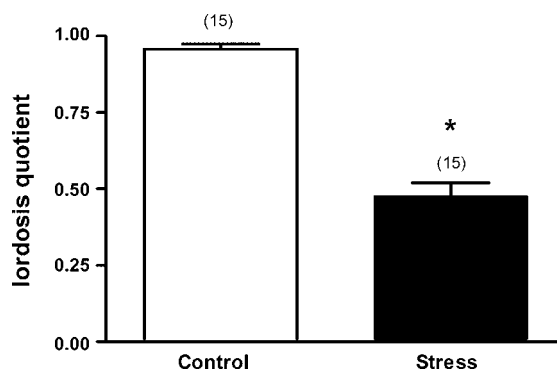


Fig. 1. Effect of acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus on sexual behavior. The values are expressed as mean (±SEM). The data were analyzed by Student's *t*-test and significance was set at *P* < 0.05. * Indicates a significant difference from the control. The number of animals is given in parentheses.

3. Results

In this study, we observed that acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus significantly inhibited the sexual behavior of female rats [*t*(28) = 10.46, *P* < 0.001]. The stressed group showed a significant reduction in the lordosis quotient (0.47 ± 0.04) when compared to the control group (0.95 ± 0.02) (Fig. 1).

The microinjection of losartan or PD12319 into the MeA had no significant effect on the lordosis quotient compared to saline microinjection. However, both losartan and PD12319, at the same doses, prevented the inhibitory effects of Ang II microinjection into the MeA on the lordosis quotient [*F*(5.60) = 20.01; *P* < 0.05] (Fig. 2).

The effect on sexual behavior produced by acute stress was prevented by both losartan and PD12319 microinjections into the MeA. The stressed group receiving saline in the MeA presented a significant reduction in the lordosis quotient, compared with the stressed groups receiving losartan or PD12319 and with the unstressed groups [*F*(4.49) = 22.76, *P* < 0.001] (Fig. 3). Also, in this same experiment, it can be observed that there was no significant difference in the lordosis quotient between the unstressed group that received saline microinjection into the MeA compared with the unstressed group that did not receive microinjection into the MeA, showing that microinjection alone does not affect the lordosis quotient (Fig. 3).

In all experiments, no significant difference between groups was detected as to the time of locomotion (Table 1). It was demonstrated

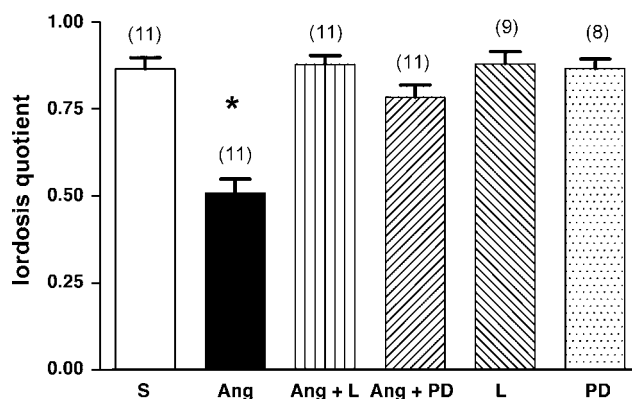


Fig. 2. Effect of Ang II coinjection with losartan or PD12319 into the MeA on sexual behavior. S (microinjection of saline 0.9%); Ang (microinjection of Ang II); Ang + L (Ang II coinjected with losartan); Ang + PD (Ang II coinjected with PD12319); L (microinjection of losartan); PD (microinjection of PD12319). The values are presented as mean (±SEM). The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test. **P* < 0.05 vs. all others. The number of animals is given in parentheses.

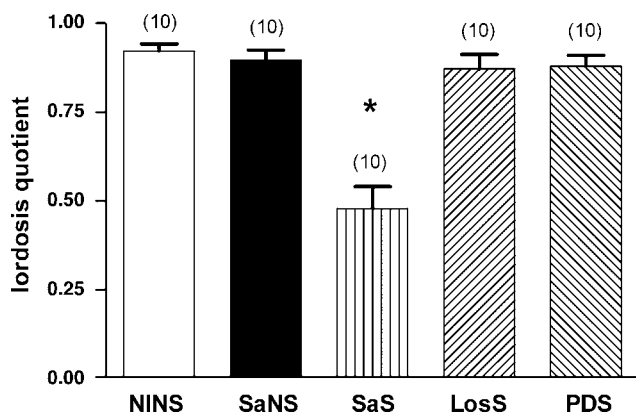


Fig. 3. Effect of microinjection of losartan or PD12319 into the MeA on the effect of acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus on sexual behavior. NINS (no microinjection/no stress); SaNS (saline/no stress); SaS (saline/with stress); LosS (losartan/with stress); PDS (PD12319/with stress). The values are presented as mean (\pm SEM). The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ vs. all others. The number of animals is given in parentheses.

Table 1
Effect of acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus (experiment 1), Ang II coinjection with losartan or PD12319 into the MeA (experiment 2) and microinjection of losartan or PD12319 into the MeA of stressed female rats (experiment 3) on the time of locomotion and number of oocytes.

Groups	Time of locomotion(s)	Number of oocytes
Experiment 1		
Control (15)	376.40 \pm 16.47	9.46 \pm 0.54
Stress (15)	353.70 \pm 20.75	9.26 \pm 0.44
Experiment 2		
Saline in MeA (11)	491.9 \pm 34.58	11.45 \pm 0.52
Ang II in MeA (11)	495.5 \pm 16.87	11.09 \pm 0.45
Ang II + losartan in MeA (11)	476.5 \pm 21.28	9.81 \pm 0.40
Ang II + PD123 in MeA (11)	464.3 \pm 31.80	10.5 \pm 0.5
Los in MeA (9)	485.10 \pm 16.04	9.62 \pm 0.75
PD 123 in MeA (8)	457.80 \pm 31.42	11.13 \pm 0.58
Experiment 3		
No stress no injections (10)	455 \pm 37.3	–
Saline in MeA no stress (10)	464.30 \pm 24.0	–
Saline in MeA + stress (10)	438.50 \pm 32.46	–
Losartan + stress (10)	466.5 \pm 14.75	–
PD 123 + stress (10)	383.0 \pm 23.09	–

The values were presented as mean (\pm SEM). The data were analyzed by Student's *t*-test (experiment 1) and one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test (experiments 2 and 3). Significance was set at $P < 0.05$. The number of animals is given in parentheses.

that both acute stress and the Ang II microinjection within the MeA on the night of proestrus did not cause changes in the number of oocytes (Table 1).

4. Discussion

The present study shows that acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus reduces sexual behavior in female rats (Figs. 1 and 3), similarly to the Ang II microinjection into the MeA on the night of proestrus (Fig. 2). The effect on sexual behavior produced by both acute stress and Ang II microinjection into the MeA on the night of proestrus was prevented by the microinjection of AT₁ or AT₂ antagonists into the MeA (Figs. 2 and 3). These data led us to conclude that Ang II has a modulatory influence on the MeA, which regulates sexual behavior, and that this mechanism is an important mediator of acute stress on the night of proestrus regarding the effect on sexual behavior in female rats. In males, Ang II inhibits sexual behavior when injected into the ventricular system

[14,25] or directly into the MeA, and blockade of AT₁ or AT₂ receptors in this nucleus prevents this effect [10]. The sexual behavior inhibition caused by acute restraint stress for 15 min on the night of proestrus or by Ang II microinjection into the MeA is not due to a gross motor impairment, as locomotion was not modified (Table 1). The single administration of losartan or PD12319 microinjections produced no effect on the analyzed parameter, showing that these drugs have no intrinsic activity (Fig. 2).

Our results are in agreement with previous data that show that acute restraint stress on the afternoon of proestrus inhibits sexual behavior in female rats, although this effect does not involve the angiotensinergic system, since blockade of AT₁ and AT₂ receptors did not prevent this outcome. However, in this case, injection of Ang II antagonists was peripheral [18]. The mechanism of action by which acute stress on the afternoon or on the night of proestrus reduces this behavior remains poorly understood.

Stress response includes mainly the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, causing the release of corticotropin-releasing hormone (CRH) by the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), which acts on the anterior pituitary gland by releasing adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and thus stimulating the release of glucocorticoids by the adrenal cortex. Moreover, the increase in catecholaminergic activity occurs together with the action of other endocrine systems to restore homeostasis [37].

It was demonstrated that the medial nucleus of the amygdala presents modifications in the dendritic spine density and an increase in *c-fos* expression in rats exposed to different stress paradigms [17,32], highlighting the importance of the amygdala in classic response to stress. Ang II, one of the main hormones involved in adaptive response to stress [51], is peripherally synthesized, exerting its effects on the central nervous system indirectly, through circumventricular organs, since under physiological conditions Ang II does not cross the blood-brain barrier [44,50]. The presence of RNAm for all renin-angiotensin system components in different CNS regions [50] and the storage of Ang II within vesicles in synaptic terminals in areas with high concentrations of Ang II receptors show that this peptide is also produced within the central nervous system, acting directly upon its specific regions [38]. During stress, an Ang II increase occurs in the hypothalamus and in adrenal glands [62], as well as an increase in the density of Ang II receptors in the PVN [13] and in the RNAm expression for AT₁ receptor in the PVN and for the AT₂ receptor in the locus coeruleus [19]. Stress also generates an increase in Ang II plasma concentration [62], demonstrating that it activates both the peripheral and central angiotensinergic systems [51]. The blockade of AT₁ receptors decreases HPA axis response to stress, modifying CRH synthesis and release by PVN [3,4,23], which highlights an important participation of Ang II in this response. The MeA, a structure involved not only in stress response [17,32,41] but also in sexual behavior execution [15,16,47,48], expresses both Ang II receptors type AT₁ and AT₂ [7,8,10,57], and also contains Ang II [36]. These facts reinforce the idea that Ang II contributes to the reduction in sexual behavior during stress by acting on the MeA. Moreover, there is some evidence that the release of Ang II is stimulated by central noradrenaline [43], which is released into the MeA during response to acute restraint stress [31]. This suggests that there may be an increase in the release of Ang II into the MeA in our stress model due to noradrenergic stimulation, for instance.

It is interesting to observe in our results that both AT₁ and AT₂ antagonists, when microinjected separately, prevent the effect of Ang II microinjection into the MeA or the one caused by stress, suggesting a possible interaction between the two receptor systems. It seems to be necessary that both receptors be occupied at the same time by Ang II to produce this effect, similar to what occurs in males [10]. In general, AT₁ and AT₂ receptors have opposite effects on cells

[2,53]. AT₁ receptors are classified as stimulatory [55,64] and AT₂ as inhibitory [65]. On the other hand, the AT₂ receptor stimulation causes an increase in the firing rate of inferior olive neurons [1] and its reduction in locus coeruleus neurons [49]. The AT₂ receptor expression is increased in the inferior olive and reduced in the ventrolateral thalamic nucleus during stress response in rats [9]. This suggests that AT₂ receptors may present different functions and be modulated in a different way by the same stimulus according to their location. In the adrenal medulla, AT₁ receptor blockade reduces noradrenaline synthesis, similarly to what is observed in AT₂ blockade [24]. In the central nervous system, AT₂ receptor stimulation antagonizes the action of AT_{1A} receptor in arterial pressure control, while the blockade of both AT_{1A} and AT₂ receptors inhibits the water intake induced by the Ang II *icv* injection [28]. The anorexigenic activity of Ang II, after being centrally administered, is prevented by AT₂ antagonist coinjection and partially prevented with AT₁ antagonist coinjection [35]. We may infer that there is an interaction between these two receptor systems and they may have opposite or similar effects depending on where they are located, and in the MeA, AT₁ and AT₂ act synergistically inhibiting sexual behavior in rats, both in males [10] and females.

In rats, the most prominent characteristic of sexual receptivity behavior is the mating posture assumed by the female when the male mounts, called lordosis reflex. This behavior helps in penile intromission. In the absence of lordosis, intromission will not be possible [34]. One important sensory pathway stimulates the lordosis reflex, including the vomeronasal organ, accessory olfactory bulb, medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus [20,45]. The removal of any component from this pathway significantly reduces the lordosis reflex [45–47,52]. Our results show that alterations caused by Ang II in one of these circuit sites, in this case the MeA, compromise the appropriate expression of this behavior. The medial preoptic area (MPOA), another important site involved in the lordosis reflex [20,56], receives MeA projections [12] and is a region rich in LHRH neurons [11]. Evidence shows that LHRH stimulates sexual behavior in female rats [60]. An increase in the activity of LHRH neurons occurs in regions involved in sexual behavior modulation, mainly in the MPOA during execution of this behavior. Also, the bilateral destruction of MeA considerably reduces the lordosis behavior and the activity of LHRH neurons, supporting the idea of MeA role in the activation of LHRH neuronal system during mating [47].

Evidence shows that a remarkable increase in hypothalamic Ang II in the afternoon of proestrus leads to the release of LHRH [42,43], which stimulates lordosis behavior in female rats [47,60]. However, in our model, the injection of Ang II into the MeA on the night of proestrus, at a very low concentration, but much greater than that which is endogenously released in the afternoon of proestrus [43], reduces sexual behavior. In this case, the activity of Ang II upon the MeA has an inhibitory effect on lordosis behavior, which apparently outweighs the effect of peak endogenous Ang II in the afternoon of proestrus, suggesting that a given moment on the day of proestrus, the specific pathway and possibly the concentration of Ang II may determine the effect of this peptide.

The mechanism by which Ang II, acting on the MeA, inhibits sexual behavior in female rats remains obscure. Studies show that Ang II exerts an excitatory effect on neurons of different areas of the nervous system [5,26,27]. Considering the existence of GABAergic neurons in the MeA [40], projections of this nucleus to the MPOA [12] and inputs to the POA exert a tonic inhibitory influence on the lordosis [61], suggesting that the effect of Ang II injection into the MeA on this behavior could be a result of Ang II excitatory action on the neuronal inhibitory circuit of sexual behavior, for example, in GABAergic afferent inputs to the MPOA, possibly coming from the MeA, considering that GABAergic synapses in the MPOA reduce this behavior in male rats [22].

On the other hand, it has been proposed that CRH is a mediator of anti-reproductive effects caused by stress through the inhibition of LHRH secretion [29,30,33]. There is evidence that CRH inhibits LHRH pulsatile secretion indirectly through the action of noradrenergic pathways of locus coeruleus directed to MPOA acting on GABAergic neurons, and that this circuit plays a pivotal role in the suppression of the LHRH pulse generator induced by restraint stress [33]. Considering the existence of MeA efferent projections to the PVN [36], we can suggest that, in our results, Ang II injection into the MeA can stimulate the PVN, since Ang II modulates the axis activation, altering CRH synthesis and secretion by the PVN [4]. It induces the release of CRH, which, indirectly through noradrenergic pathways of locus coeruleus, causes inhibition of LHRH secretion by the MPOA [33] and consequently the inhibition of sexual behavior, since this hormone has an important participation in the modulation of this behavior [47,60].

Neither the acute restraint stress nor the Ang II microinjection into the MeA affects the number of oocytes produced by these rats (Table 1), suggesting that these interventions applied on the night of proestrus did not affect the ovulation-inducing mechanism. The events that initiate the LH surge, and consequently ovulation, occur on the afternoon of proestrus [21], therefore before the acute stress application or before the Ang II microinjection into MeA on the night of proestrus.

We concluded that acute stress on the night of proestrus reduces sexual behavior in female rats, and this effect is mediated by Ang II acting on its AT₁ and AT₂ receptors in the MeA. Moreover, this effect seems to be specific to sexual receptivity, since no changes in ovulation were observed in these rats.

Acknowledgments

The authors are indebted to Professor Matilde Achaval (Department of Morphological Sciences, UFRGS, Brazil) for her help during the preparation of the manuscript. This work was supported by CAPES, CNPq and FAPESP.

References

- [1] Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensin II and its selective antagonists on inferior olivary neurons. *Regul Pept* 1992;41:19–26.
- [2] Andresen BT, Shome K, Jackson EK, Romero GG. AT₂ receptors cross talk with AT₁ receptors through a nitric oxide- and RhoA-dependent mechanism resulting in decreased phospholipase D activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F763–70.
- [3] Armando I, Carraza A, Nishimura Y, Hoo KL, Barontini M, Terron JA, et al. Peripheral administration of an angiotensin II AT₁ receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation stress. *Endocrinology* 2001;142:3880–9.
- [4] Armando I, Volpi S, Aguilera G, Saavedra JM. Angiotensin II AT₁ receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Res* 2007;1142:92–9.
- [5] Barnes KL, DeWeese DM, Andresen MC. Angiotensin potentiates excitatory sensory synaptic transmission to medial solitary tract nucleus neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1340–53.
- [6] Bennett AL, Gréco B, Blasberg ME, Blaustein JD. Response to male odours in progesterin receptor- and oestrogen receptor-containing cells in female rat brain. *J Neuroendocrinol* 2002;14:442–9.
- [7] von Bohlen, Halbach O, Albrecht D. Mapping of angiotensin AT₁ receptors in the rat limbic system. *Regul Pept* 1998;78:51–6.
- [8] von Bohlen, Halbach O, Albrecht D. Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides* 1998;32:241–5.
- [9] Bregonzio C, Seltzer A, Armando I, Pavel J, Saavedra JM. Angiotensin II AT₁ receptor blockade selectively enhances brain AT₂ receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. *Stress* 2008;11:457–66.
- [10] Breigeiron MK, Morris M, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav* 2002;41:267–74.
- [11] Castañeyra-Perdomo A, Pérez-Delgado MM, Montagnese C, Coen CW. Brainstem projections to the medial preoptic region containing the luteinizing

- hormone-releasing hormone perikarya in the rat. An immunohistochemical and retrograde transport study. *Neurosci Lett* 1992;139:135–9.
- [12] Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 1995;360:213–45.
- [13] Castren E, Saavedra JM. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus subformal organ. *Endocrinology* 1988;122:370–2.
- [14] Clark JT. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rat. *Physiol Behav* 1989;45:220–4.
- [15] Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* 1996;738:67–82.
- [16] Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG. Distribution of fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* 1997;77:1151–61.
- [17] Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not central amygdala. *Eur J Neurosci* 1999;11:2312–22.
- [18] Donadio MVF, Kunrath A, Corezola KL, Rodrigues Franci C, Anselmo-Franci JA, Lucion AB, et al. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. *Physiol Behav* 2007;92:591–600.
- [19] Dumon EC, Raffrafi S, Laforest S, Drolet G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience* 1999;93:877–84.
- [20] García-Horsman SP, Agmo A, Paredes RG. Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Horm Behav* 2008;54:709–16.
- [21] Gomes CM, Raineki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, et al. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 2005;184:435–45.
- [22] Hull EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L, Lumley LA, Putnam SK, et al. Hormone–neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* 1999;105:105–16.
- [23] Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 1998;10:67–72.
- [24] Jezova M, Armando I, Bregonzio C, Yu ZX, Qian S, Ferrans VJ, et al. Angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors contribute to maintain basal adrenomedullary norepinephrine synthesis and tyrosine hydroxylase transcription. *Endocrinology* 2003;144:2092–101.
- [25] Keaton AK, Clark JT. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT1 receptor blockade. *Physiol Behav* 1998;64:339–46.
- [26] Kubo T, Hagiwara Y. Activities of hypothalamic angiotensin II-sensitive neurons are greatly enhanced even in prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 2006;397:74–8.
- [27] Li DP, Chen SR, Pan HL. Angiotensin II stimulates spinally projecting paraventricular neurons through presynaptic disinhibition. *J Neurosci* 2003;23:5041–9.
- [28] Li Z, Iwai M, Wu L, Shiuchi T, Jinno T, Cui TX, et al. Role of AT2 receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H116–21.
- [29] Li XF, Bowe JE, Lightman SL, O'Byrne KT. Role of corticotropin-releasing factor receptor-2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005;146:318–22.
- [30] Li XF, Bowe JE, Kinsey-Jones JS, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Differential role of corticotropin-releasing factor receptor types 1 and 2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2006;18:602–10.
- [31] Ma S, Morilak DA. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *J Neuroendocrinol* 2005;17:22–8.
- [32] Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MFM, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett* 2007;424:16–21.
- [33] Mitchell JC, Li XF, Breen L, Thalabard JC, O'Byrne KT. The role of the locus coeruleus in corticotropin-releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology* 2005;146:323–31.
- [34] Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2005. pp. 660.
- [35] Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP(4) receptor in mice. *FEBS Lett* 2008;582:773–7.
- [36] Olmos J, Beltramino CA, Alheid G. Amygdala and extended amygdala of the rat: a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. London: Elsevier; 2004. p. 509–603.
- [37] Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001;22:502–48.
- [38] Pan H. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *Neuroscientist* 2004;10:422–31.
- [39] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986.
- [40] Perrot-Sinal TS, Davis AM, McCarthy MM. Developmental sex differences in glutamic acid decarboxylase (GAD) and the housekeeping gene GAPDH. *Brain Res* 2001;922:201–8.
- [41] Pezzone MA, Lee W, Hoffman GE, Rabin BS. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res* 1992;597:41–50.
- [42] Phillips MI, Wang H, Kimura B, Rejtman M, Koduri P, Kalra SP. Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993;132:1637–42.
- [43] Phillips MI, Wang H, Kimura B, Speth RC, Ghazi N. Brain angiotensin and the female reproductive cycle. *Adv Exp Med Biol* 1995;377:357–70.
- [44] Phillips MI, Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med* 2008;86:715–22.
- [45] Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. *Neuroendocrinology* 1990;52:368–72.
- [46] Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiol Behav* 1991;50:705–10.
- [47] Rajendren G, Moss RL. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neural system. *Brain Res* 1993;617:81–7.
- [48] Rasia-Filho AA, Peres TMS, Cubilla-Gutierrez FH, Lucion AB. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz J Med Biol Res* 1991;24:1041–9.
- [49] Reagan LP, Yee DK, He PF, Fluharty SJ. Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT2) receptors. *Adv Exp Med Biol* 1996;396:199–208.
- [50] Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 1992;13:329–80.
- [51] Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept* 2005;128:227–38.
- [52] Saito TR, Moltz H. Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 1986;38:81–7.
- [53] Shi ST, Li YF. Interaction of signal transduction between angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in rat senescent heart. *Chin Med J* 2007;120:1820–4.
- [54] Sodersten P, Hansen S. Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. *J Endocrinol* 1977;74:477–85.
- [55] Summers C, Zhu M, Gelband CG, Posner P. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K⁺ and Ca²⁺ currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol* 1996;271:C154–63.
- [56] Takeo T, Chiba Y, Sakuma Y. Suppression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. *Physiol Behav* 1993;53:831–8.
- [57] Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 1991;261:209–16.
- [58] Uphouse L, Hiegel C, Perez E, Guptarak J. Serotonin receptor involvement in effects of restraint on female rat lordosis behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:631–6.
- [59] White S, Uphouse L. Estrogen and progesterone dose-dependently reduce disruptive effects of restraint on lordosis behavior. *Horm Behav* 2004;45:201–8.
- [60] Wu TJ, Glucksmann MJ, Roberts JL, Mani SK. Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 2006;147:2544–9.
- [61] Yamanouchi K, Arai Y. Possible inhibitory role of the dorsal inputs to the preoptic area and hypothalamus in regulating female sexual behavior in the female rat. *Brain Res* 1977;127:296–301.
- [62] Yang H, Wan Y, Zhu Y. Angiotensin II—an important stress hormone. *Biol Signals* 1996;5:1–8.
- [63] Yoon H, Chung WS, Park YY, Cho IH. Effects of stress on female rat sexual function. *Int J Impot Res* 2005;17:33–8.
- [64] Zhu M, Neubig RR, Wade SM, Posner P, Gelband CH, Summers C. Modulation of K⁺ and Ca²⁺ currents in cultured neurons by an angiotensin II type 1a receptor peptide. *Am J Physiol* 1997;273:C1040–8.
- [65] Zhu M, Gelband CH, Moore JM, Posner P, Summers C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 1998;18:679–86.

CAPÍTULO II

Resultados Complementares da Tese

1. Experimentos Complementares:

Com o intuito de avaliar a duração do efeito do estresse agudo por contenção na noite do proestro sobre o comportamento sexual em ratas, e também de conhecer os mecanismos pelos quais a Ang II agindo na MeA inibe o comportamento sexual nestes animais, foram realizados 2 experimentos, os quais estão descritos neste capítulo.

No primeiro experimento foi avaliado o efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual, observado em diferentes tempos e a concentração plasmática de corticosterona, também observado em diferentes tempos. No segundo experimento foi analisado o efeito da microinjeção de losartan na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual e concentração plasmática de corticosterona.

Os animais utilizados nestes experimentos são ratas Wistar adultas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estes animais foram mantidos sob ciclo de claro-escuro de 12 h, com ciclo claro iniciando às 6:00 h. Neste ambiente a temperatura foi mantida entre 21 e 23° C e todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. Em todos os experimentos foram utilizados somente ratas com pelo menos 3 ciclos estrais regulares, analisado pelo esfregaço vaginal coletado diariamente. Todos os procedimentos e cuidados com os animais estão de acordo com o *National Institute of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS - número de cadastro do projeto 2007841 (credenciado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). Em ambos os experimentos, o modelo de estresse agudo por contenção foi o mesmo

utilizado nos experimentos anteriores (experimentos 1 e 3 do artigo publicado – capítulo1).

Os registros de comportamento sexual (filmagem) foram realizados entre 1 e 3 horas após o início do período escuro. Os animais foram levados para a sala de registro comportamental 20 minutos antes do início dos registros para adaptação ao novo ambiente. Durante o registro os animais foram colocados em caixas de observação com dimensões de 70x70x35 cm.

A coleta de sangue foi feita por decapitação em tubos heparinizados para dosagem de corticosterona. O sangue foi imediatamente centrifugado sob refrigeração e os plasmas coletados e armazenados a -70° C. Para as dosagens de corticosterona plasmática foi utilizado o kit comercial - Corticosterone ELISA Kit (CAYMAN Chemical Co – USA). As amostras de plasma foram extraídas com acetato de etila. A sensibilidade do ensaio foi de 24 pg/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 15%.

EXPERIMENTO 1:

Justificativa para realização deste experimento:

Os resultados apresentados no capítulo 1 demonstram que o estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro reduz o comportamento sexual. Neste trabalho, observou-se que ao longo dos 15 minutos de registro comportamental ocorre aumento da receptividade sexual das fêmeas estressadas, porém esta ainda mostra-se

significativamente menor que a do grupo controle, como pode ser observado na figura 1.

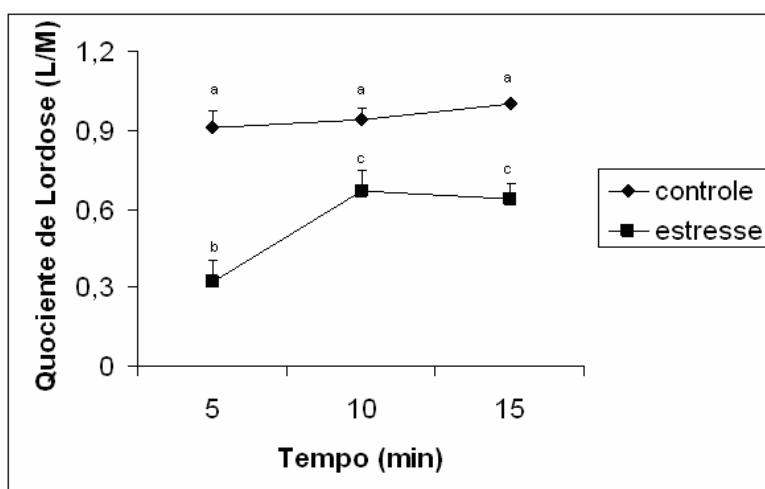


FIGURA 1: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual de ratas. Quociente de lordose (L/M) de ratas obtido ao longo do tempo de 15 minutos de observação comportamental após o estresse. Os valores são expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste de ANOVA para medidas repetidas comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$; letras diferentes demonstram diferença significativa. Ambos os grupos apresentam $n = 15$.

É possível que ao longo do tempo o efeito do estresse agudo desapareça, e a receptividade sexual destas fêmeas volte ao normal. Baseado nisso, propomos investigar o efeito do estresse agudo por contenção na noite do proestro sobre o comportamento sexual avaliado 1 hora após o término do estresse.

Além disso, considerando que o CRH apresenta-se como um mediador dos efeitos anti-reprodutivos do estresse através da inibição da secreção de GnRH (Li *et al* 2005; 2006; Mitchell *et al*, 2005), o qual é importante para a execução do comportamento sexual em ratas (Rajender & Moss, 1993), propomos avaliar as concentrações de corticosterona plasmática após o estresse agudo, como uma medida de liberação de CRH e correlacionar com os dados do comportamento sexual.

Desenho experimental:

Ratas adultas com pelo menos 3 ciclos estrais regulares foram submetidas ao estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro (grupo estressado) ou permaneceram na caixa moradia (grupo controle). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- a) Controle com coleta de sangue 30 minutos depois do estresse (n = 8)
- b) Estressado com coleta de sangue 30 minutos depois do estresse (n = 8)
- c) Controle com coleta de sangue 75 minutos depois do estresse (n = 8)
- d) Estressado com coleta de sangue 75 minutos depois do estresse (n = 8)

Foi realizado o registro do comportamento sexual por 15 minutos, imediatamente após o término do estresse, e coleta de sangue por decapitação realizada 30 minutos após o término do estresse.

Em outro grupo de animais, imediatamente após o término do estresse foi realizado o primeiro registro comportamental, por 15 minutos; e 60 minutos após o término do estresse, foi realizado um segundo registro comportamental de 15 minutos. A coleta de sangue foi feita imediatamente após o segundo registro (75 min após o término do estresse).

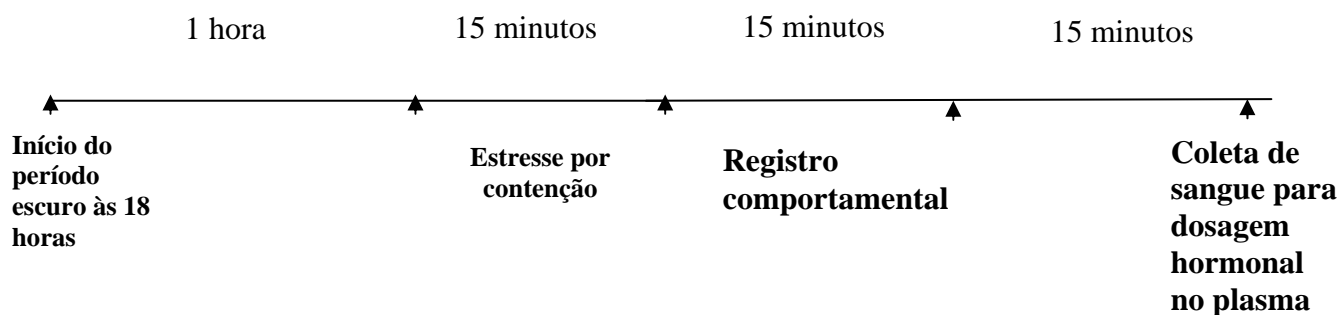
Análise estatística:

Os resultados estão expressos como média (\pm EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas ou por ANOVA de duas vias, seguida de teste de Bonferroni ou do teste de Newman-Keuls.

Representação esquemática do desenho experimental:

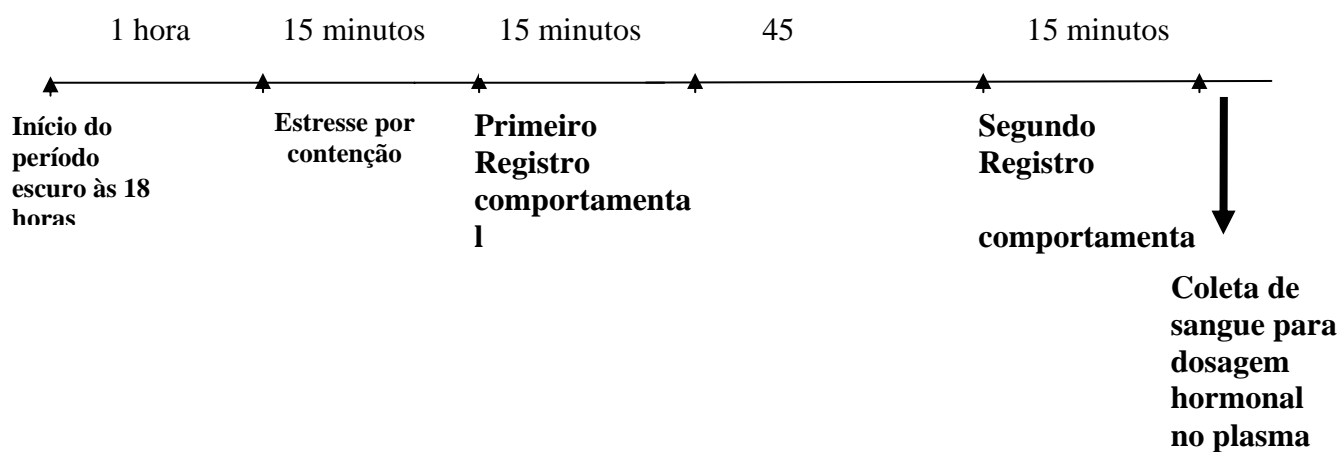
Grupos da coleta de sangue aos 30 minutos:

Na noite do proestro



Grupos da coleta de sangue aos 75 minutos:

Na noite do proestro



EXPERIMENTO 2:

Justificativa para realização deste experimento:

Como observado no capítulo 1, o estresse agudo por contenção na noite do proestro ativa o sistema angiotensinérgico na MeA, provocando redução do comportamento sexual. Tem sido demonstrado que a Ang II modula a atividade do eixo HPA (Raasch *et al*, 2006). É possível que essa ativação do sistema angiotensinérgico na MeA proporcione a ativação do eixo HPA, liberando CRH, uma vez que tem sido demonstrado que a MeA está envolvida na regulação do eixo HPA (Ma & Morilak, 2005). Neste experimento propomos avaliar o efeito da microinjeção de losartan na MeA sobre a concentração plasmática de corticosterona após o estresse, como uma medida de liberação de CRH provocada por ação da Ang II na MeA, e correlacionar com os dados do comportamento sexual.

Desenho experimental:

Ratas com pelo menos 3 ciclos estrais regulares foram anestesiadas e submetidas à implantação bilateral de cânulas guias conforme descrito no capítulo 1 (experimentos 2 e 3 do artigo publicado). Aquelas que tiveram pelo menos 1 ciclo estral regular após a cirurgia, na noite do proestro, receberam microinjeções na MeA, 15 minutos antes do estresse conforme o grupo experimental. A dose de Losartan foi a mesma utilizada nos experimentos descritos no capítulo 1. As microinjeções na MeA foram realizadas

bilateralmente, sendo injetado um lado de cada vez. O volume injetado em cada lado foi de 0,3 μ L. O tempo para cada injeção foi de 1 minuto. Após 30 segundos do término da injeção, a agulha injetora foi retirada lentamente da cânula para evitar refluxo do líquido injetado.

As ratas foram submetidas ao estresse agudo por contenção de 15 minutos. Imediatamente após o término do estresse foi feito o primeiro registro comportamental por 15 min, e 60 minutos após o término do estresse, foi realizado um segundo registro comportamental e a coleta de sangue foi feita imediatamente após o segundo registro (75 min após o término do estresse), assim como realizado na segunda etapa do experimento 1 descrito neste capítulo.

A histologia para verificar a posição da cânula e o local da microinjeção foi realizada conforme descrito nos experimentos do capítulo 1. Somente as ratas que tiveram microinjeções dentro da MeA nos dois lados, foram incluídas na análise de dados.

Grupos experimentais:

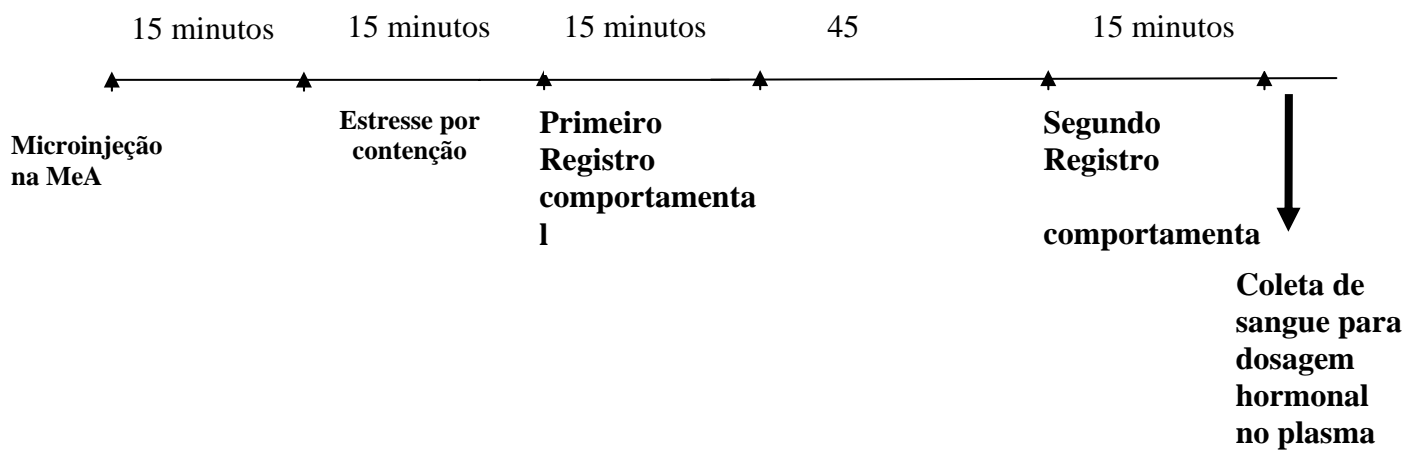
- a) **NESa:** microinjeção de salina/sem estresse (n = 8)
- b) **ESa:** microinjeção de salina/com estresse (n = 8)
- c) **ELos:** microinjeção de losartan/com estresse (n = 8)

Análise estatística:

Os resultados foram expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls.

Representação esquemática do desenho experimental:

Na noite do proestro após 1 hora do início do período escuro:



2. Resultados:

Experimento 1:

Neste experimento foi confirmado que o estresse agudo por contenção na noite do proestro reduz o comportamento sexual em ratas, quando analisado logo após o término do estresse. Esse efeito, no entanto, não foi observado quando analisado 60 minutos após o término do estresse [$F(2, 30) = 34,22; P < 0,001$] (fig. 2).

Aos 30 minutos após o término do estresse, não foi observado diferença significativa na concentração plasmática de corticosterona entre o grupo estressado e o seu respectivo grupo controle. Por outro lado, aos 75 minutos após o estresse, o grupo estressado apresenta um aumento significativo na concentração plasmática de corticosterona, quando comparado com o seu respectivo grupo controle e com os grupos analisados aos 30 minutos após o estresse [$F(2,30) = 16,60; P < 0,05$] (fig. 3)

Experimento 2:

Neste experimento, novamente foi confirmado que o estresse agudo por contenção na noite do proestro reduz o comportamento sexual em ratas e que esse efeito é prevenido pela microinjeção de losartan na MeA [$F(2,23) = 20,03; P < 0,001$] (fig. 4).

Foi observado que o estresse agudo por contenção na noite do proestro provoca um aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona, avaliada 75 minutos após o término do estresse, e que esse efeito foi prevenido pela microinjeção de losartan na MeA [$F(2,23) = 7,12; P < 0,05$] (fig. 5).

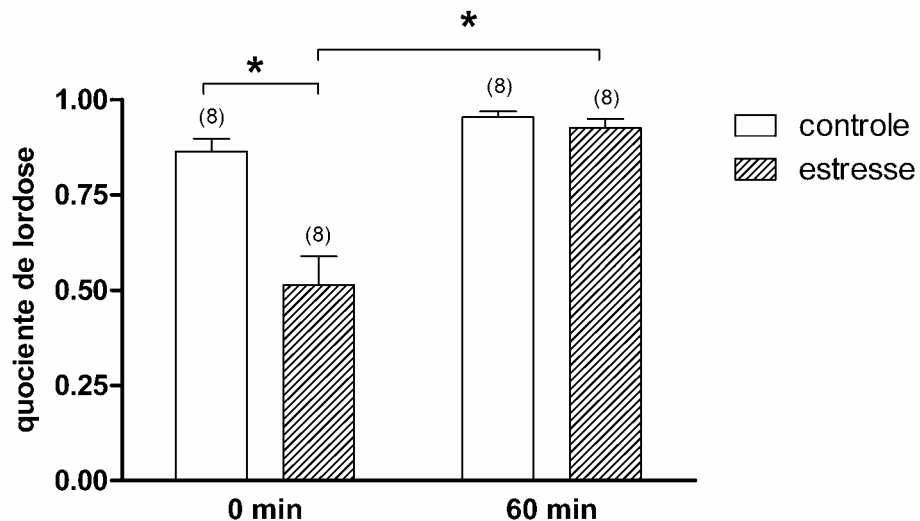


Figura 2: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual em ratas. O quociente de lordose foi avaliado imediatamente após e 60 minutos após o término do estresse. * Indica $P < 0,05$. Os dados estão expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido pelo teste de Bonferroni. O número de animais está entre parênteses.

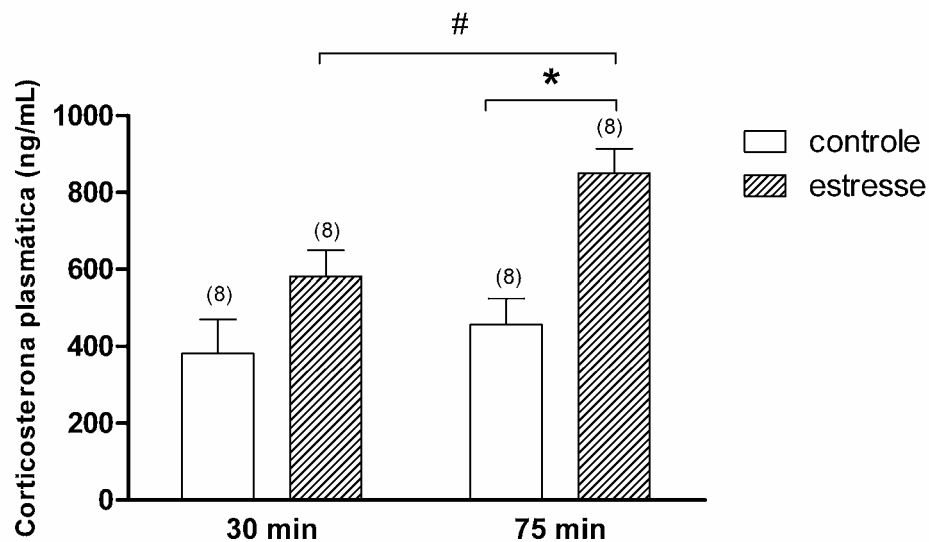


Figura 3: Efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre a concentração plasmática de corticosterona. A concentração plasmática de corticosterona foi avaliada 30 e 75 minutos após o término do estresse. * e # Indicam $P < 0,05$. Os dados estão expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido pelo teste de Bonferroni. O número de animais está entre parênteses.

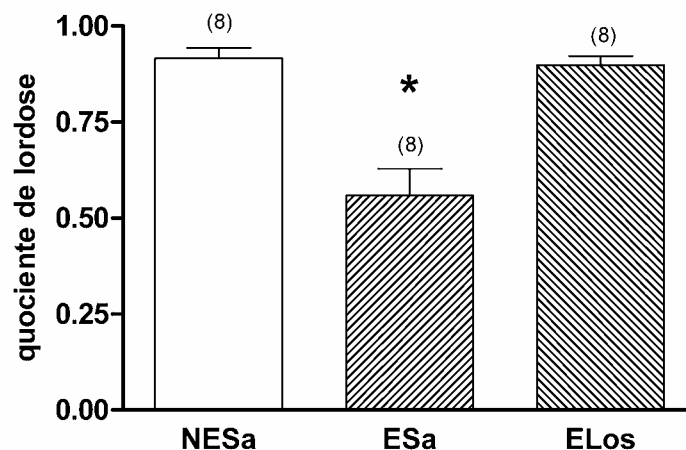


Figura 4: Efeito da microinjeção de losartan na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre o comportamento sexual em ratas. O quociente de lordose foi avaliado imediatamente após o término do estresse. **NESa** (não estressado/saline); **ESa** (estressado/saline); **ELos** (estressado/losartan). * Indica $P < 0,05$ quando comparado com os demais grupos. Os dados estão expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. O número de animais está entre parênteses.

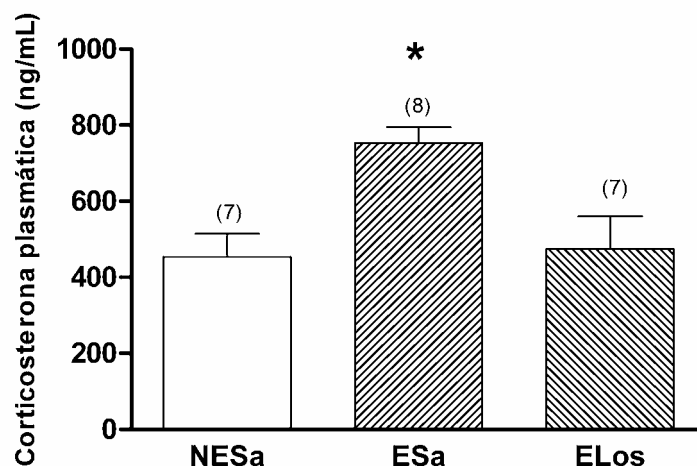


Figura 5: Efeito da microinjeção de losartan na MeA no efeito do estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro sobre a concentração plasmática de corticosterona avaliada 75 minutos após o término do estresse. **NESa** (não estressado/saline); **ESa** (estressado/saline); **ELos** (estressado/losartan). * Indica $P < 0,05$ quando comparado com os demais grupos. Os dados estão expressos por média (\pm EPM). Os dados foram analisados por ANOVA de 1 vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. O número de animais está entre parênteses.

DISCUSSÃO

O estresse agudo por contenção na noite do proestro provoca redução do comportamento sexual em ratas e este efeito envolve a participação dos receptores AT₁ e AT₂ presentes na MeA, conforme demonstrado e discutido no capítulo I.

Para estudar, pelo menos em parte, os mecanismos pelos quais a Ang II, agindo na MeA, reduz o comportamento sexual durante a resposta ao estresse agudo na noite do proestro, foi avaliado a participação de receptores angiotensinérgicos presentes na MeA na ativação do eixo HPA, supondo que o CRH seja o agente inibidor do comportamento sexual neste modelo de estresse, uma vez que esse tem sido indicado como mediador dos efeitos anti-reprodutivos do estresse através da inibição de GnRH (Li *et al*, 2005; 2006; Mitchell *et al*, 2005). Para isso, foi avaliada a ativação do eixo HPA por medida da concentração plasmática de corticosterona, o que é um indicativo de liberação de CRH. Observou-se que o estresse agudo por contenção na noite do proestro provoca aumento da concentração plasmática de corticosterona e que este efeito foi prevenido pela microinjeção de losartan (antagonista AT₁) na MeA (fig. 3 – cap. II). Com isso demonstrou-se que, durante a resposta ao estresse, a Ang II, agindo na MeA, provoca ativação do eixo HPA. Este resultado está de acordo com dados que mostram que a Ang II (Armando *et al*, 2007; Raasch *et al*, 2006), assim como a MeA (Ma & Morilak, 2005) facilitam a ativação do eixo HPA em resposta ao estresse. Desta forma, podemos sugerir que a redução do comportamento sexual provocada pelo estresse agudo na noite do proestro, envolve o sistema angiotensinérgico da MeA, o qual estimula a liberação de CRH.

Neste estudo, a ativação do sistema angiotensinérgico presente na MeA, possivelmente ocorra por ação de NA, a qual está aumentada durante a resposta ao estresse agudo (Chrousos, 2009), pois existem evidências que sugerem que a NA

estimula a liberação de Ang II no hipotálamo (Phillips *et al*, 1995) e induz o aumento da expressão de receptores angiotensinérgicos em cultura de neurônios do hipotálamo e tronco encefálico (Myers & Sumners, 1989). Tem sido demonstrado que a NA, agindo na MeA, aumenta a atividade do eixo HPA durante a resposta ao estresse agudo por contenção (Ma & Morilak, 2005). Considerando que a MeA expressa ambos receptores AT₁/AT₂ (Tsutsumi & Saavedra, 1991; von Bohlen *et al*, 1998; Breigeiron *et al*, 2002) e também contém Ang II (Olmos *et al*, 2004), é possível que, durante a resposta ao estresse, ocorra um aumento de Ang II na MeA, sintetizada no próprio núcleo. Além disso, levando em consideração que existem eferências da MeA para o PVN (Olmos *et al*, 2004), que tanto a Ang II (Armando *et al*, 2007; Raasch *et al*, 2006), como a MeA (Ma & Morilak, 2005) facilitam a ativação do eixo HPA em resposta ao estresse, e que o bloqueio dos receptores AT₁ no PVN previne a redução do comportamento de lordose provocada pelo mesmo modelo de estresse agudo (dados ainda não publicados) de forma muito semelhante ao bloqueio de AT₁ na MeA, é possível especular que, em nosso modelo de estresse, ocorra liberação de Ang II no PVN de neurônios eferentes da MeA, aumentando a atividade do eixo HPA.

Foi observado, neste estudo, que o estresse agudo por contenção de 15 minutos na noite do proestro reduz o comportamento sexual, no entanto este efeito é extinto dentro de 1 hora após o término do estresse (fig 1 e 2- cap II). Por outro lado, não foi observada alteração significativa na concentração plasmática de corticosterona aos 30 min após o estresse, enquanto que aos 75 min após o término do estresse houve aumento significativo na concentração plasmática deste hormônio (fig. 3 – cap. II). Isso sugere que neste caso, a redução do comportamento sexual não foi provocada por ação

direta da corticosterona, como tem sido observado em outros estudos, nos quais a corticosterona inibe o comportamento de lordose (Catanzaro, 1987), mas por efeito do CRH, através da inibição da secreção de GnRH (Li *et al*, 2005; 2006; Mitchell *et al*, 2005), o qual é um importante estimulador do comportamento sexual em ratas (Rajendren & Moss, 1993; Wu *et al*, 2006). Existem evidências de que o CRH inibe a secreção pulsátil de GnRH indiretamente através da ação de vias noradrenérgicas do LC direcionadas para a MPOA agindo em neurônios gabaérgicos e que este circuito é ponto-chave para a supressão do pulso gerador de GnRH induzido pelo estresse (Mitchell *et al*, 2005). Por outro lado, tem sido demonstrado que o CRH inibe o comportamento de lordose por ação direta em áreas que controlam este comportamento, como MPOA e substância cinzenta periaquedutal e este efeito é revertido por infusão de GnRH nestas regiões (Sirinathsinghji, 1985; 1986).

Neste estudo optou-se por realizar a coleta de sangue para dosar a concentração plasmática de corticosterona aos 30 minutos após o término do estresse, baseando-se no fato de que as alterações plasmáticas de glicocorticóides ocorrem com um certo atraso em relação às alterações plasmáticas de ACTH, as quais ocorrem prontamente por estímulo de CRH (Grossman, 1995).

No nosso modelo de estresse observou-se que a alteração da concentração plasmática de corticosterona se dá tardiamente quando comparada com outros modelos de estresse (Burgess & Handa, 1992; Uriarte *et al*, 2009). Esta diferença pode estar relacionada com as variações dos níveis basais de corticosterona antes da aplicação do estresse, encontradas em diferentes estudos.

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 (Atkinson & Waddell, 1997; Malek *et al*, 2007; Girotti *et al*, 2007). 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; Carey *et al*, 1995; Iwasaki-Sekino *et al*, 2009). Este efeito se dá por influência dos esteróides ovarianos, os quais apresentam concentrações plasmáticas elevadas na fase do proestro (Gomes *et al*, 2005), sobre a regulação do eixo HPA (Burgess & Handa, 1992; Carey *et al*, 1995; Iwasaki-Sekino *et al*, 2009).

Ratas castradas que receberam reposição hormonal, apresentam um aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona em resposta ao estresse agudo quando comparadas com aquelas que não receberam reposição hormonal (Burgess & Handa, 1992). Além disso, em ratas castradas sem reposição hormonal, os níveis plasmáticos de corticosterona diminuem rapidamente após a retirada do estresse, enquanto que em fêmeas castradas que receberam reposição hormonal estes níveis permanecem elevados por mais tempo após a retirada do estresse (Burgess & Handa, 1992).

Outra importante observação demonstra que diferentes estressores resultam em diferentes padrões de ativação celular no PVN (Chan *et al*, 1993). Estes dados nos permitem compreender que a magnitude e a duração da atividade do eixo HPA em resposta ao estresse agudo, varia conforme o perfil hormonal que o animal apresenta no momento da aplicação do estresse e também com o paradigma de estresse aplicado.

Neste estudo, não podemos afastar a possibilidade de que o efeito da Ang II na MeA sobre o comportamento sexual seja resultado da ação excitatória da Ang II na circuitaria neuronal inibitória deste comportamento, como por exemplo, em aferências gabaérgicas da MPOA, possivelmente vindas da MeA. Levantamos esta questão,

considerando as seguintes evidências: 1) existem neurônios gabaérgicos na MeA (Perrot-Sinal *et al*, 2001); 2) a MeA envia projeções para MPOA (Canteraras *et al*, 1995); 3) a remoção de aferências para MPOA estimula o reflexo de lordose, sugerindo a existência de entradas inibitórias para esta área na modulação deste comportamento (Yamanouchi & Arai, 1977); 4) sinapses gabaérgicas na MPOA podem reduzir o comportamento sexual em ratos machos (Hull *et al*, 1999); 5) a estimulação de neurônios gabaérgicos nesta área reduz a liberação de GnRH (Mitchell *et al*, 2005), o qual é um importante estimulador do comportamento sexual em ratas (Rajendren & Moss, 1993; Wu *et al*, 2006).

Por fim, este estudo mostra que a Ang II é um importante modulador das respostas ao estresse, agindo na MeA e por consequência ativando o eixo HPA. E o bloqueio dos receptores AT₁ na MeA previne os efeitos negativo do estresse sobre o comportamento sexual em fêmeas. Tem sido demonstrado que a administração oral de antagonistas AT₁ que atravessam a barreira hemato-encefálica previne completamente as variações hormonais e o desenvolvimento de úlcera gástricas provocados pelo estresse (Saavedra & Benicky, 2007). Estes dados sugerem fortemente que o bloqueio dos receptores AT₁ pode ser considerado como uma nova abordagem terapêutica no tratamento de patologias relacionadas ao estresse.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclusões:

Este estudo conclui que o estresse agudo na noite do proestro reduz o comportamento sexual em ratas e este efeito é mediado por Ang II, agindo em seus receptores AT₁ e AT₂ presentes na MeA.

Durante a resposta ao estresse agudo na noite do proestro a Ang II, agindo na MeA ativa o eixo HPA .

O CRH liberado pelo aumento da atividade do eixo HPA neste modelo, possivelmente seja um dos responsáveis pela redução do comportamento sexual, entretanto a corticosterona, por sua vez, não é mediadora desse comportamento.

Perspectivas:

Dando continuidade a este estudo, seria importante investigar mais a fundo a participação do CRH no efeito do estresse agudo na noite do proestro sobre o comportamento sexual em ratas. Para isso, propomos avaliar a participação do CRH, agindo em regiões envolvidas no controle do comportamento de lordose, como a MPOA e/ou substância cinzenta periaquedutal, neste efeito.

Além disso, seria interessante investigar se a redução do comportamento sexual provocada pela Ang II agindo na MeA teria um efeito direto sobre a circuitaria inibitória deste comportamento, como por exemplo em aferências gabaérgicas da MPOA, possivelmente vindas da MeA. Para isso, propomos avaliar o efeito da co-injeção de Ang II na MeA e antagonistas GABA na MPOA sobre o comportamento sexual de ratas.

REFERÊNCIAS

Aguilera G. Regulation of Pituitary ACTH Secretion during Chronic Stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* 15: 321-350, 1994

Atkinson HC, Waddell BJ Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 138: 3842-3848, 1997.

Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensin II and its selective antagonist on inferior olivary neurons. *Regul Pept*, 1992;41: 19–26.

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

Armando I, Carraza A, Nishimura Y, Hoe KL, Barontini M, Terron JA, Falcon-Neri A, Ito T, Juorio AV, Saavedra JM. Peripheral administration of an angiotensin II AT1 receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation stress. *Endocrinology* 142: 3880-3889, 2001.

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 Res* 1142: 92–99, 2007.

Bennett AL, Gréco B, Blasberg ME, Blaustein JD. Response to male odours in progesterin receptor- and oestrogen receptor-containing cells in female rat brain. *J Neuroendocrinol* 114: 442-449, 2002.

Belda X, Armario A. Dopamine D1 and D2 dopamine receptors regulate immobilization stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychopharmacology* 206: 355-652, 2009.

Breigeiron MK, Morris M, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of Angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Hormone & Behavior*, 41: 267-274, 2002.

Bregonzio C, Seltzer A, Armando I, Pavel J, Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively enhances brain AT(2) receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. *Stress* 11: 457-466, 2008.

von Bohlen, Halbach O, Albrecht D. Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides* 32: 241-245, 1998.

Burgess LH, Handa RJ Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131: 1261-1269, 1992

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360: 213-245, 1995.

de Catanzaro D. Alteration of estrogen-induced lordosis through central administration of corticosterone in adrenalectomized-ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 46: 468-74, 1987.

Carey MP, Deterd CH, de Koning J, Helmerhorst F, de Kloet ER. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol* 144: 311-321, 1995

Castren E, Saavedra JM. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus subfornical organ. *Endocrinology* 122: 370-372, 1988.

Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Ho kfelt T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9569-9573, 1989

Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 2002; 112: 13–21.

Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovács KJ, Sawchenko PE. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci.* 13: 5126-38, 1993

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol* 67:259–84, 2005.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. *JAMA, J Am Med Assoc* 267:1244–52, 1992.

Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-81. 2009.

Clark JT. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rat. *Physiology & Behavior* 45: 220-224, 1989.

Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* 738: 67–82, 1996.

Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not central amygdala. *European J Neuroscience* 11: 2312-2322, 1999.

Donadio MVF, Kunrath A, Corezola KL, Rodrigues Franci C, Anselmo-Franci JA, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: Participation of the angiotensinergic system. *Physiol Behav* 92: 591–600, 2007.

Dornelles RCM, Franci CR. Action of AT₁ subtype angiotensin II receptors of the

medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides* 32: 51-55, 1998.

Dunn J, Whitener J. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42: 211-217, 1986

Dumont EC, Rafrafi S, Laforest S, Drolet G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience* 93: 877-884, 1999.

Flanagan-Cato LM, Calizo LH, Daniels D. The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behaviour. *Hormone & Behaviour* 40: 178-182, 2001.

Franci CR, Anselmo-Franci JA, Mccann SM. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. *Braz. J. Med Biol Res* 23: 899-901, 1990.

Ganong WF. Blood pituitary, brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol* 14: 233-249, 1993.

Ghazi N, Grov K L, Wright JW, Phillips MI Speth RC. Variation in angiotensin II release from the rat brain during the estrous cycle. *Endocrinology* 153: 1945-1950, 1994.

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

Gomes CM, Rainecki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 184: 435–445, 2005.

Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology* 148: 2542-52, 2007

Grossman A. Corticotropin-release hormone: basic physiology and clinical applications. In: DeGroot LJ (Ed). *Endocrinology Philadelphia, WB Saunders*, pp 341-354, 1995.

Herman J P, Figueiredo H, Mueller N K, Ulrich-Lai Y, Ostrander M M, Choi D C, Cullinan W E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24: 151–180, 2003.

Hill MN, McLaughlin RJ, Morrish AC, Viau V, Floresco SB, Hillard CJ, Gorzalka BB. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 34: 2733-2745, 2009.

Holstege G, Kerstens L, Mores MC, Vanderhorst VGJM. Evidence for a periaqueductal gray, nucleus retroambiguus, spinal cord pathway in the rat. *Neurosci* 80: 587-598, 1997.

Hull EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L, Lumley LA, Putnam SK, Moses J. Hormone-neurotransmitter interaction in the control of sexual behavior. *Behavior Brain Res.* 105:105-116, 1999.

Iwasaki-Sekino A, Mano-Otagiri A, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34: 226-37, 2009

Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 10:67–72, 1998.

Jöhren C, Sanvitto GL, Egidy G, Saavedra JM. Angiotensin II AT_{1A} receptor mRNA expression is induced by estrgen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. *J Neurosci* 17: 8283-8292, 1997.

Jonklaas J & Buggy J. Angiotensin-estrogen central interation: localization and mechanism. *Brain Research* 326: 239-249, 1985.

Keaton AK & Clark JT. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT1 receptor blockade. *Physiology & Behaviour*, 64: 339-346, 1998.

Kisley LR, Sakai RR, Fluharty SJ. Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT1 receptor binding and mRNA in the female rat. *Brain Research* 844:34-42, 1999.

Kolaj M, Bai D, Renaut LP. GABA_B receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons. *J. Neurophysiol* 92:111-122, 2004.

Larkin JW, Binks SL, Li Y, Selvage D. The role of oestradiol in sexually dimorphic hypothalamic-adrenal-pituitary axis responses to intracerebroventricular ethanol administration in the rat. *J Neuroendocrinol. publicado eletronicamente em*, 2009.

Li XF, Bowe JE, Lightman SL, O'Byrne KT Role of corticotropinreleasing

factor receptor-2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146: 318-322, 2005.

Li XF, Bowe JE, Kinsey-Jones JS, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT Differential role of corticotrophin-releasing factor receptor types 1 and 2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 118: 602-610, 2006.

Li Z, Iwai M, Wu L, Shiuchi T, Jinno T, Cui TX, Horiuchi M. Role of AT2 receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H116-H121, 2003.

Lightman SL, Young WS. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403: 511–523, 1988.

Lightman SL, Young WS. Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature* 6131: 643–645, 1987.

Ma S, Morilak DA. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the HPA axis in response to acute immobilization stress. *J. Neuroendocrinol.* 17, 22–28. 2005.

Ma S, Morilak DA. Induction of Fos expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 124: 963–972, 2004.

Mani S. Ligand-independent activation of progesterin receptors in sexual receptivity. *Hormones & Behaviour* 40: 183-190, 2001.

Malek ZS, Sage D, Pévet P, Raison S. Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology.* 148: 5165-72, 2007

Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MFM, Achaval M, Rasia-Filho A. A. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett* 424:16–21, 2007.

Morilak DA, Barrera G, Echevarria D J, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29 1214–1224, 2005.

Mitchell JC, Li XF, Breen L, Thalabard JC, O'Byrne KT. The role of the locus coeruleus in corticotropin-releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology* 146: 323-331, 2005.

Müller H, Kröger J, Jöhren O, Szymczak S, Bader M, Dominiak P, Raasch W. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *J Endocrinol publicado eletronicamente em*, 2009.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Nature* 315:233-236, 1991.

Myers LM, Summers C. Regulation of angiotensin II binding sites in neuronal cultures by catecholamines. *Am J Physiol* 257: C706-13, 1989.

Nelson RJ. *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers 660 pp., 2005

Ochedalski T, Subburaju S, Wynn PC, Aguilera G. Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 19:189-97, 2007.

Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP(4) receptor in mice. *FEBS Lett* 582: 773-777, 2008.

Olmos J, Beltramino CA, Alheid G. Amygdala and Extended Amygdala of the rat: a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: The rat nervous system. Ed. PAXINOS, G., Elsevier Academic Presss, London.,3d ed., 19: 509-603, 2004.

Pan, H. Brain angiotensin II and synaptic tranmission. *Neurocientist* 10: 422-431, 2004.

Pacak K & Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrinol Reviews* 22: 502-548, 2001.

Perrot-Sinal TS, Davis AM, Mccarthy MM. Developmental sex differences in glutamic acid decarboxylase (GAD) and the housekeeping gene GAPDH. *Brain Res*, 922: 201–208, 2001.

Pfaus JG, Kleopoulos SP, Mobbs CV, Gibbs RB, Pfaff DW. Sexual stimulation activates c-fos winthin estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Research* 624: 253-267, 1993.

Pfaff DW, Schwartz-Giblin S, Mccarthy MM, Kow LM. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Presss, NY.,2d ed., 2: 107-220, 1994.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Ann Rev Physiol*, 49:413-435, 1987.

Phillips MI, Wang H, Kimura B, Speth RC, Ghazi N. Brain angiotensin and the female reproductive cycle. *Adv Exp Med Biol* 377: 357-370, 1995.

Phillips MI, Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med* 86:715–722, 2008.

Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual behavior receptivity in female rats. *Neuroendocrinology*, 52: 368-372, 1990.

Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiology & Behaviour* 50: 705-710, 1991.

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

Raasch W, Wittmershaus C, Dendorfer A, Voges I, Pahlke F, Dodt C, Dominiak P, Jöhren O. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 147: 3539-3546, 2006.

Reagan LP, Yee DK, He PF, Fluharty SJ. Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT₂) receptors. *Adv Exp Med Biol* 396: 199–208, 1996.

Rivest S, Plotsky PM, Rivier C. CRF alters the infundibular LHRH secretory system from the medial preoptic area of female rats: possible involvement of opioid receptors. *Neuroendocrinology*. 57: 236-46, 1993.

Russell JA, Douglas AJ, Brunton PJ. Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1148:428-38, 2008.

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinol Rev* 13: 329-380, 1992.

Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept* 128: 227–238, 2005.

Saavedra JM, Benicky J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 10:185-93, 2007

Seltzer A, Tsutsumi K, Shigematsu K, Saavedra JM. Reproductive hormones modulate angiotensin AT1 receptor in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology* 133: 939-941, 1993.

Sirinathsinghji DJ. Modulation of lordosis behaviour in the female rat by corticotropin releasing factor, beta-endorphin and gonadotropin releasing hormone in the mesencephalic central gray. *Brain Res* 336: 45-55, 1985

Sirinathsinghji DJ. Regulation of lordosis behaviour in the female rat by corticotropin-releasing factor, beta-endorphin/corticotropin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the medial preoptic area. *Brain Res* 375: 49-56, 1986

Steele MK, Gallo RV, Ganong WF. A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol.* 245: R805-R810, 1983.

Steele MK, Gallo RV, Ganong WF. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. *Neuroendocrinology* 40: 210-216, 1985.

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

Tanaka J, Fujisawa S, Nomura M. GABAergic modulation of the ANG II – induced drinking response in the rat medial preoptic nucleus. *Pharmacology, Biochemistry and behaviour* 76:43-51, 2003

Tsigos C, Chrousos G. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53: 865–871, 2002.

Tsutsumi K & Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am. J. Physiol* 261: 209-216, 1991.

Uphouse L, Hiegel C, Perez E, Guptarak J. Serotonin receptor involvement in effects of restraint on female rat lordosis behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 631-636, 2007.

Uriarte N, Ferreira A, Rosa XF, Lucion AB. Effects of litter-overlapping on emotionality, stress response, and reproductive functions in male and female rats. *Dev Psychobiol* 51: 259-67, 2009

Wang HT, Han F, Shi YX. Activity of the 5-HT1A receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. *Int J Mol Med* 24: 227-31, 2009.

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

Witcher JA, Freeman ME. The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the rat. *Biol Reprod* 32: 834-839, 1985.

Wu TJ, Glucksman MJ, Roberts JL, Mani SK. Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 147: 2544-2549, 2006.

Yamanouchi K, Arai Y. Possible inhibitory role of the dorsal inputs to the preoptic area and hypothalamus in regulating female sexual behavior in the female rat. *Brain Res* 127: 296-301, 1977.

Yang H, Wan Y, Zhu Y. Angiotensin II — an important stress hormone. *Biol Signals* 5: 1–8, 1996.

Yoon H, Chung WS, Park YY, Cho IH. Effects of stress on female rat sexual function. *Int J Impot Res* 17: 33–38, 2005.

Zhu M, Neubig RR, Wade SM, Posner P, Gelband CH, Summers C. Modulation of K⁺ and Ca²⁺ currents in cultured neurons by an angiotensin II type 1a receptor peptide. *Am J Physiol* 273: C1040-1048, 1997.

Zhu M, Gelband CH, Posner P, Summer C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 18: 679-686, 1998.

Zhu M, Natarajan R, Nadler JL, Moore JM, Gelband CH, Summer C. Angiotensin II increases neuronal delayed-rectifier potassium current: role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiology* 84: 2494-2501, 2000.