

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

GUILLERMO ANDREY ARIZA TRASLAVIÑA

**Efeito do antagonista do receptor CRH-R₁ sobre a secreção de
gonadotrofinas, prolactina, corticosterona e progesterona em ratas
submetidas a estresse**

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUILLERMO ANDREY ARIZA TRASLAVIÑA

**Efeito do antagonista do receptor CRH-R₁ sobre a secreção de gonadotrofinas,
corticoesterona, prolactina e progesterona em ratas submetidas a estresse**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Dr. Celso Rodrigues Franci

Ribeirão Preto

2008

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou com o necessário para chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, que me recebeu como estudante para iniciar outra etapa na minha formação acadêmica.

Aos membros da banca, Dr. Ayrton Custódio Moreira e Dr. Raphael Scorsim Szwaka, pela dedicação e contribuição para a conclusão desse trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e pela ajuda financeira para a realização da pesquisa.

Aos amigos de trabalho Bruno, Leandro, Waldecy, Carla, Cármen, Fabiana, pelo apoio, sinceridade e conselhos recebidos.

Ao técnico do laboratório, Rogério, pela compreensão e incondicionalidade oferecida.

Aos amigos Fredy, Milena, Juliana, Cláudia, Astrid, Lina, Julian, pela sua colaboração e sinceridade.

Aos amigos do departamento de Fisiologia pelas dicas e esclarecimentos prestados.

Aos funcionários da secretaria: Elisa, Cláudia, Carlos e Fernando pelo atendimento simpático.

RESUMO

Traslaviña, G.A.A. **Efeito do antagonista do receptor CRH-R₁ sobre a secreção de gonadotrofinas, prolactina, corticosterona e progesterona em ratas submetidas a estresse.** Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O estresse agudo altera a atividade do eixo hipotálamo-hipotálamo-gonadal (HPG) em vários níveis. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é a principal substância hipotalâmica reguladora do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e exerce suas ações via ativação de receptores CRH-R₁ e CRH-R₂. O CRH-R₁ tem expressão maior no sistema nervoso central e está mais envolvido em distúrbios relacionados à hiperatividade do eixo HPA. Antalarmin é um antagonista seletivo não peptídico dos receptores CRH-R₁. No presente foi avaliado se o efeito de estresse agudo em associação à ação estrogênica sobre a secreção de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), corticosterona (B) e progesterona (P) tem mediação de CRH através de receptores CRH-R₁. Ratas fêmeas castradas submetidas à terapia substitutiva com estrógeno (10µg s.c. por 3 dias) receberam antalarmin (doses de 0,1 ou 0,5mg/kg por via endovenosa ou 1µg/0,5ul por via intracerebroventricular) ou veículo antes de serem submetidas a estresse de contenção por 40 minutos. Realizou-se coleta seriada de amostras de sangue através de cânula jugular antes (às 10h) e depois do estresse para avaliar efeitos imediatos (até 14h) e os efeitos na tarde após estresse (até 18h). O estresse induziu aumento significativo ($P < 0,001$) da secreção de LH, B e P, que foi atenuado por antalarmin ($P < 0,001$). As concentrações de PRL e FSH não foram alteradas imediatamente após o estresse, mas, houve atraso do pico de secreção da PRL LH e FSH. Somente os efeitos do estresse sobre a PRL foram revertidos por antalarmin ($P < 0,001$). Os resultados indicam que as alterações induzidas por nosso modelo de estresse no eixo HPA, no eixo HPG, e no sistema de controle de secreção de PRL, podem ser mediadas em parte por ações do CRH através de receptores CRH-R₁.

Palavras-chave: Estresse, antalarmin, gonadotrofinas, prolactina, progesterona, corticosterona.

ABSTRACT

Traslaviña, G.A.A. **Effects of CRH-R₁ receptor antagonist on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion in female rats under stress.** Mater's Monography - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Acute stress changes hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis activity at different levels. Corticotropin-releasing hormone (CRH), the principal regulator of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, exerts its actions through CRH-R₁ and CRH-R₂ receptors. CRH-R₁ receptor has greater expression principally in central nervous system and participates in disorders that involved hyperactivity of HPA axis. Antalarmin is a selective non-peptide CRH-R₁ receptor antagonist. In the present study, we evaluated if the effect of acute stress associated with estrogen action on luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin (PRL), corticosterone (B) and progesterone (P) is mediated by CRH through CRH-R₁ receptors. Estrogen primed-ovariectomized (10µg for 3 days) rats received antalarmin (at 0,1 and 0,5mg/kg i.v. or 1µg i.c.v doses) or vehicle, before restraint stress by 40 minutes. Blood samples were collected through jugular cannula before (10h) and after stress for evaluating of early (until 14h) and late effects (until 18h). Stress induced significant increase (P<0,001) of LH, B and P secretion that was reduced by antalarmin (P<0,001). Prolactin and FSH levels were not affected immediately after stress. The surge induced by estrogen was delayed by stress in FSH, LH and PRL secretion. Antalarmin administration reduced significantly (P<0,001) these alterations only on PRL surge secretion. In accordance with these findings, the alterations induced by our stress model on HPA, HPG axis and PRL secretion control mechanisms could be in part modulated through CRH actions through CRH-R₁ receptors.

Keywords: Stress, antalarmin, gonadotropins, prolactin, progesterone, corticosterone.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Ant.	Antalarmin
AVP	Arginina-vasopresina
B	Corticosterona
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRH-R	Receptor do CRH
e.v.	Endovenoso
E ₂	Estrógeno
FSH	Hormônio foliculoestimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GR	Receptores glicocorticóides
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônada
i.c.v.	Intracerebroventricular
I.M.	Intramuscular
kg	Quilograma
LC	Locus coeruleus
LH	Hormônio luteinizante
ml	Mililitro
MR	Receptor mineralocorticóide
µg	Micrograma
NA	Noradrenalina
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1. Sistema de Estresse.....	9
1.1.1. Componentes Sensoriais.....	10
1.1.2. Estruturas de Integração	11
1.1.3. Componentes Efetores	13
1.1.4. Hormônio Liberador de Corticotrofina.....	14
1.1.5. Antagonistas do CRH	16
1.2. Efeitos do Estresse em Funções Reprodutivas	18
2. Objetivos	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Animais e Desenho Experimental	22
3.3. Procedimento Experimental	24
3.4. Dosagens Hormonais.....	25
3.5. Análise Estatística	26
4. Resultados	27
4.1. Corticosterona.....	27
4.2. Hormônio Luteinizante.....	29
4.3. Prolactina	31
4.4. Progesterona	33
4.5. Hormônio Folículo Estimulante	35
5. Discussão	37
5.1. Corticosterona.....	37
5.2. Gonadotrofinas	40
5.3. Prolactina	45
5.4. Progesterona	47
5.5. Conclusões.....	49
5.6. Perspectivas	49
6. Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

Nas últimas décadas a pesquisa científica tem oferecido avanços sobre os mecanismos fisiológicos do estresse. O elemento essencial na definição primordial do estresse por Hans Selye foi a resposta não específica do corpo perante qualquer demanda sobre este (SELYE, 1976). Tal elaboração resultou de experiências em animais e observações em pacientes à luz de conceitos prévios elaborados por Claude Bernard e William Cannon sobre o meio interno e o estado de equilíbrio dinâmico chamado homeostase (CANNON, 1929 apud URSIN; OLFF,1993).

Selye emprestou o termo estresse da Física, para referir-se às ações mutuas de forças que tomam lugar sobre um segmento do corpo e definiu estressor como qualquer agente causador de estresse. Ele supôs que constelações de eventos estereotipados fisiológicos e psicológicos ocorrem em pacientes seriamente doentes, devido à prolongação de respostas adaptativas. A este conjunto de respostas denominou Síndrome Geral de Adaptação, que consistiria de três fases: uma primeira reação de alarme, seguida pela de resistência e por fim, dependendo da cronologia do estímulo, a de exaustão (SELYE, 1950).

Contribuições importantes ao assunto foram feitas por Weiner (WEINER,1991 apud PACAK; PALKOVITS, 2001), Chrousos e Gold (CHROUSOS; GOLD, 1992). Weiner apontou para existência de respostas específicas a estressores com padrões compensatórios dos organismos. Chrousos e Gold definiram o estresse como um estado de desarmonia ou de ameaça da homeostase, onde são evocadas respostas adaptativas comportamentais e fisiológicas, que podem ser específicas ou generalizadas constituindo a síndrome de estresse.

Baseado nas diferentes variáveis envolvidas na resposta aos estressores, entre elas as psicológicas, Goldstein definiu estresse como uma condição, na qual as expectativas, geneticamente programadas, estabelecidas por aprendizagem prévia, ou deduzidas de circunstâncias, não correspondem com as percepções atuais do meio ambiente interno ou

externo. Esta discrepância entre o que é observado ou sentido e o que é esperado ou programado desencadeia modelos de respostas compensatórias (GOLDSTEIN, 2003).

Recentemente, McEwen (1998) introduziu o termo alostase para definir a habilidade de um organismo para manter estável o meio interno mesmo sob ação de um estressor. Tal habilidade representaria um processo ativo de adaptação decorrente da produção de vários mediadores tais como esteróides adrenais, catecolaminas, citocinas, e genes de resposta imediata.

As respostas aos estímulos emocionais ou físicos ativam componentes centrais que facilitam funções (e.g, estado de consciência, cognição, atenção) e inibem algumas vias neurais vegetativas (e.g, alimentação, reprodução) para junto com alterações periféricas, redirecionarem os processos energéticos necessários para a sobrevivência e homeostase do organismo.

Em situações nas quais as respostas alostáticas são prolongadas, inadequadas, sobrestimuladas por repetidos e múltiplos estressores, ou na falta de adaptação, a carga alostática resulta em má adaptação e dano a vários órgãos, gerando condições propícias ao estabelecimento de quadros patológicos, que genericamente recebem a denominação de doenças de adaptação (FRANCI, 2005).

A este respeito, existem evidências sobre os efeitos do estresse nos sistemas autonômico, cardiovascular, gastrintestinal, imune, nervoso e reprodutivo. Cabe destacar o aumento na incidência de depressão, ansiedade, obesidade, osteoporose, e problemas cardíacos em pessoas que tem deficiências nas respostas adaptativas ao estresse, o que constitui uma das principais causas de incapacitação e mortalidade na maioria dos países. Especificamente, a relação entre alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e depressão tem sido descrita (MCEWEN; STELLAR, 1993; BELMAKER; AGAM, 2008).

1.1. Sistema de Estresse

Sistema de estresse é a designação dada ao conjunto de componentes do organismo mobilizados para adaptação a situações de estresse induzidas por diferentes estímulos estressores. Esses componentes são: o eixo HPA; o sistema nervoso vegetativo (estruturas centrais, inervação periférica e medula adrenal); sistemas aminérgicos centrais; sistema límbico cortical e subcortical; sistema imune (ASSENMACHER et al., 1995; PACAK; PALKOVITS, 2001).

O sistema de estresse funciona como integrador de informações geradas por estímulos estressores agudos ou crônicos que podem ser físicos, psicológicos e sociais e como elaborador de ações para defesa e adaptação do organismo por meio do restabelecimento e manutenção da homeostase (FRANCI, 2005).

1.1.1. Componentes Sensoriais

O sistema nervoso possui receptores somáticos e viscerais para detectar variações de diversas formas de energia (mecânica, química, térmica etc.) e convertê-las em energia elétrica que associada aos sinais químicos (transmissores), constitui sua linguagem. Os receptores funcionam como transdutores de sinais de naturezas diferentes, que podem ser interpretados pelo sistema nervoso, por isso são chamados de estímulos cognitivos (figura 1). Por outro lado, o sistema nervoso não dispõe de estruturas para detectar alguns outros tipos de estímulos (vírus, bactérias, tumores, substâncias antigênicas de maneira geral etc.), por isso, chamados de estímulos não-cognitivos (WEIGENT; CARR; BLALOCK, 1990).

Os estímulos estressores cognitivos ativam vias somatossensoriais e viscerossensoriais. Os somatossensoriais podem ser mecânicos, térmicos, visuais, acústicos, olfativos, gustativos e vestibulares, e são detectados por receptores específicos que dão origem à propagação dos sinais através de nervos sensoriais espinais e cranianos. Os viscerossensoriais, originários do próprio organismo, envolvem interorreceptores que dão origem à propagação de sinais por via nervosa e hormonal. Os estímulos estressores não-cognitivos dependem de uma transdução

que envolve uma função de natureza hormonal também desempenhada pelo sistema imune, ou seja, substâncias produzidas por células do sistema imune são liberadas para atuarem diretamente em células do sistema nervoso ou indiretamente, pela liberação de outras substâncias produzidas em outros órgãos ou glândulas endócrinas. Assim, o sistema imune, além de sua função de elaboração de reações de defesa, apresenta também função sensorial e hormonal para sinalizar os estímulos não-cognitivos para o sistema nervoso (FRANCI, 2005).

Os estímulos estressores de acordo com sua natureza ativam circuitos neurais diversos, caracterizando a especificidade das aferências. As aferências somatomotoras e somatoviscerais atingem estruturas cerebrais específicas. Porém, essas aferências direta ou indiretamente, convergem para estruturas cerebrais que integram informações e elaboram ações de diferentes efetores. Assim, estímulos estressores diversos (como hipoglicemia, hipertonicidade, frio, imobilização, dor, hipovolemia) que utilizam vias aferentes distintas podem ativar os mesmos sistemas efetores, como o eixo HPA e o sistema nervoso simpático e parassimpático, porém com respostas de magnitudes distintas (PACAK; PALKOVITS, 2001).

1.1.2. Estruturas de Integração

Todo o sistema nervoso central participa na manutenção da homeostase e na organização da resposta ao estresse, entretanto, algumas áreas específicas podem ter ações seletivas nestes mecanismos reguladores. As respostas aos estímulos estressores envolvem circuitos neuronais curtos (espinais) e longos (supra-espinais). Nos circuitos longos, o processamento de informações originárias das vias somatossensoriais e viscerossensoriais e a elaboração de respostas aos estímulos estressores envolvem principalmente o hipotálamo, o tálamo, a área pré-óptica, estruturas límbicas corticais (formação hipocampal, córtices entorrinal, piriforme, pré-límbico, intralímbico e cingulato) e subcorticais (amígdala, *septum*, habénula), bem como sistemas neuronais (aminérgicos e não-aminérgicos) do tronco cerebral (HERMAN; CULLINAN, 1997).

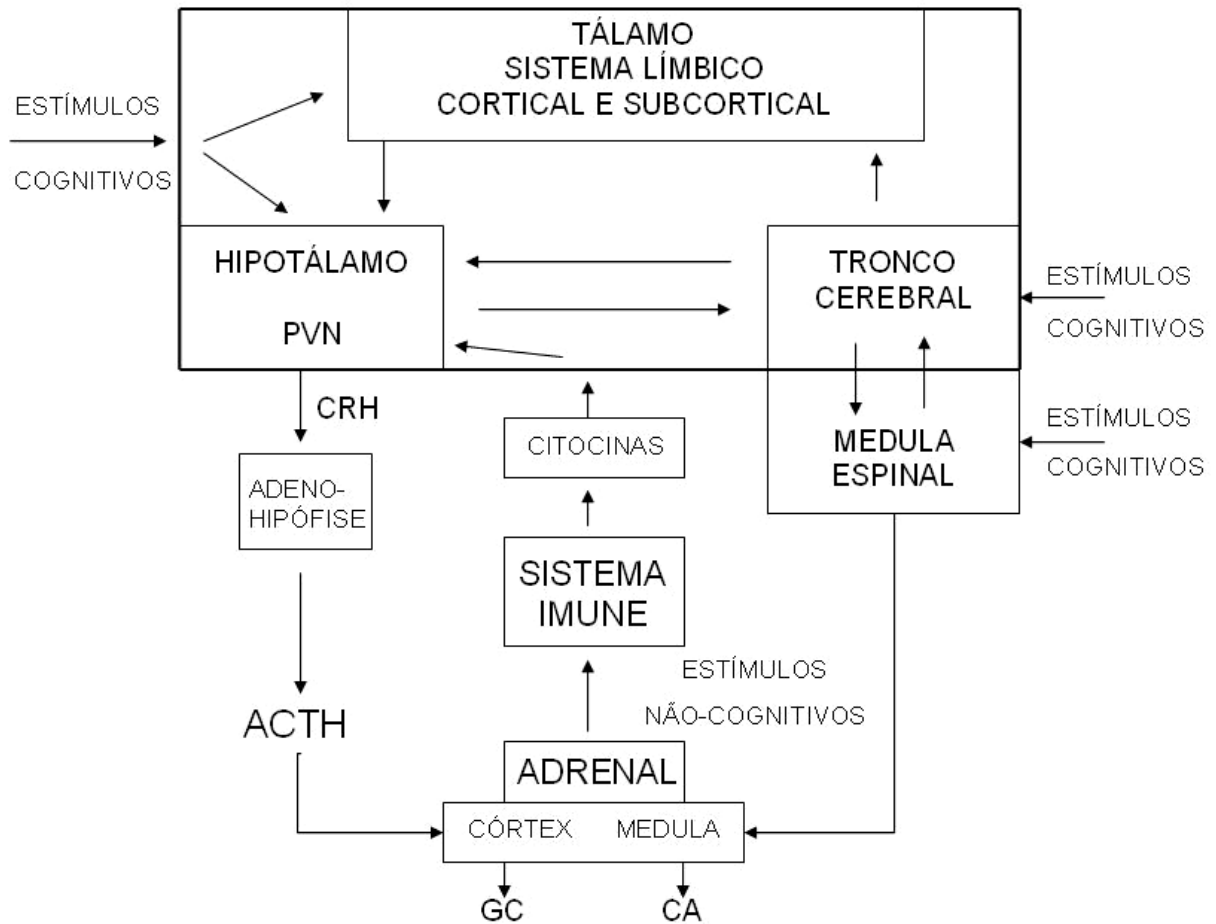


Figura 1. Sistema de estresse: componentes sensoriais e de integração. Hormônio liberador de corticotrofina (CRH); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); núcleo paraventricular (PVN); catecolaminas (CA); glicocorticóides (GC) (FRANCI, 2005).

Os efetores dos circuitos longos envolvem três vias: neural, neuroendócrina e imune. A área pré-óptica medial, o núcleo arqueado e o núcleo paraventricular (PVN) projetam para a eminência mediana (resposta hormonal) e para estruturas autonômicas do tronco cerebral e medula espinal (resposta neural). Os núcleos hipotalâmicos dorsomedial, ventromedial, perifornical e supramamilar apresentam principalmente projeções intra-hipotalâmicas. A área hipotalâmica lateral apresenta uma combinação de vias ascendentes e descendentes entre o hipotálamo medial, o sistema límbico e o sistema vegetativo. O tálamo tem envolvimento destacado nos mecanismos nociceptivos e representa ponto de relé entre fibras espinoreticulotalâmicas e áreas corticais límbicas (cingulato, córtex piriforme, córtex entorrinal). O sistema límbico é responsável pela organização de uma grande variedade de respostas comportamentais no estresse (FRANCI, 2005).

Grupamentos de neurônios noradrenérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos localizados no tronco cerebral estão envolvidos no processamento de respostas a estímulos estressores. Eles recebem aferências somatossensoriais da medula espinal, sensoritrigeminais e viscerossensoriais do núcleo do trato solitário e projetam eferências descendentes (para a medula espinal) e ascendentes (para a área pré-óptica, hipotálamo e sistema límbico entre outras estruturas) (PACAK; PALKOVITS, 2001). Por outro lado, a participação de neurônios dopaminérgicos ainda é muito controversa. Na resposta ao estresse ocorre ativação de neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC), que ativam os sistemas dopaminérgicos mesolímbico e mesocortical envolvidos com fenômenos motivacionais/recompensa e funções cognitivas antecipatórias, respectivamente (CHROUSOS; GOLD, 1992).

Outros sistemas não-aminérgicos do tronco cerebral integram as vias do sistema de estresse utilizando como neuromoduladores ácido gama-aminobutírico (GABA) (SAAVEDRA et al., 2006), hormônio liberador de tireotrofina, encefalina, dimorfina, substância P, neuropeptídeo Y, hormônio liberador de corticotrofina, angiotensina II, entre outros (PACAK; PALKOVITS, 2001).

1.1.3. Componentes Efetores

O restabelecimento e a manutenção da homeostase envolvem coordenação precisa de respostas neurovegetativas, neuroendócrinas, imunes e comportamentais. Os principais componentes efetores do sistema de estresse são o eixo HPA, sistema eferente simpático/medula adrenal e elementos do sistema parassimpático. Estímulos estressores sistêmicos sinalizados por hormônios, citocinas, eletrólitos e outras substâncias são processados por relés no PVN, envolvendo principalmente projeções catecolaminérgicas do tronco cerebral. Enquanto estímulos estressores que requerem maior elaboração são processados através de circuitos límbicos prosencefálicos (FRANCI, 2005).

A fase inicial mobiliza os estoques de energia necessários para reação ao estressor. Esta resposta envolve uma série de mensagens para ativar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), no PVN, os quais estimulam a liberação de ACTH pela hipófise anterior. Por sua vez, o ACTH estimula a liberação de corticóides pelas glândulas adrenais (DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005).

Os corticóides aumentam o catabolismo e suprimem os processos anabólicos para promover o incremento de substratos energéticos como glicose, ácidos graxos livres e aminoácidos na circulação sanguínea. A ativação deste eixo por períodos curtos, permite a mobilização de energia, enquanto por períodos longos provoca consequências devastadoras para o organismo como a inibição do sistema imune e de processos anabólicos, e a depleção das reservas energéticas.

O controle inibidor desse circuito é realizado pela ação direta dos corticóides (alça longa de retroalimentação negativa), pelo próprio CRH (alça de retroalimentação ultra-curta), e por sistemas intra-hipotalâmicos que envolvem peptídeos opióides no núcleo arqueado e o GABA no PVN e na área pré-óptica medial (MCCANN et al., 2000; DOBSON et al., 2003).

1.1.4. Hormônio Liberador de Corticotrofina

Isolado em 1981 de extratos hipotalâmicos ovinos, o CRH é a principal substância hipotalâmica reguladora do eixo HPA (VALE et al., 1981). Isto foi seguido pelo descobrimento de uma família nova de ligantes relacionados ao CRH, a qual inclui urocortina (UCN) I, UCN-II (ou peptídeo relacionado - estresscopina) e UCN-III (ou estresscopina) (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

O peptídeo CRH de 41-aminoácidos estimula a secreção hipofisária de ACTH e adrenal de glicocorticóides e de andrógenos (PLOTSKY, 1991), exerce propriedades ansiogênicas e coordena a adaptação às mudanças físicas e comportamentais que acontecem durante o estresse (CALOGERO, 1995). O conteúdo maior de CRH é encontrado na eminência

mediana. A síntese ocorre principalmente em neurônios parvocelulares do PVN, com projeções axonais para os capilares do plexo primário da eminência mediana, de onde atinge o corticotrofo pelo sistema porta-hipofisário (LEIKO; CASTRO M, 2005).

A síntese e imunolocalização de CRH também foram observadas em neurônios magnocelulares do PVN, área pré-óptica e núcleo dorsal medial do hipotálamo. Em algumas estruturas extra-hipotalâmicas, como córtex cerebral, sistema límbico, LC, cerebelo, e tronco cerebral, também localiza-se este hormônio. O CRH também é sintetizado em alguns tecidos periféricos como estômago, adrenais, testículos, placenta e células imunes, e está envolvido em funções biológicas, como o balanço energético, metabolismo, reprodução e regulação da resposta imune (OLSCHOWKA et al., 1982; OWENS; NEMEROFF, 1991; KALANTARIDOU et al., 2003).

O CRH e os peptídeos relacionados exercem suas ações em células alvo via ativação de duas famílias de receptores (CRH-R) específicos de alta afinidade, denominados CRH-R₁ e CRH-R₂, os quais estão acoplados ao nucleotídeo guanina da proteína G estimuladora e são codificados por diferentes genes (PERRIN; VALE, 1999). O CRH-R₁ possui múltiplas variantes denominadas de CRH-R₁α-h, tem expressão extensa no cérebro dos mamíferos e é responsável pela ativação e liberação da pró-opiomelanocortina (POMC), ACTH e β-endorfina da hipófise anterior (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

Conteúdo elevado de CRH-R₁ é encontrado no córtex cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo, bulbo olfatório e adeno-hipófise (VAN et al., 2000). Periféricamente, pode ser encontrado no testículo, ovário, endométrio, miométrio, placenta, adrenal, tecido adiposo, baço, pele, coração e células específicas do sistema imune. Participa ativamente nos processos de decidualização, implantação, parto e função ovariana, com efeitos inibidores sobre a esteroidogênese e estimuladores da maturação folicular (KALANTARIDOU et al., 2003; HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

O CRH-R₂ apresenta três isoformas (α, β, γ) e têm expressão discreta no cérebro com a densidade maior no núcleo septal lateral, estria terminal, núcleo hipotalâmico ventromedial, bulbo olfatório e núcleo mesencefálico da rafe (VAN et al., 2000). Também está presente em tecidos periféricos, com conteúdos elevados na pele, nos músculos esquelético, liso e cardíaco (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

Existem evidências sobre como estes receptores poderiam modular a resposta ao estresse, mostrando diferenças individuais. O sistema de estresse teria dois modos de operação. O modo rápido ou “reação de emergência”, que corresponderia à resposta clássica de luta ou fuga envolvendo os receptores CRH-R₁, enquanto o modo lento que promove a adaptação e o restabelecimento, seria modulado pelas urocortinas II e III, as quais agem pelos receptores CRH-R₂. Os corticóides operam pelos dois modos através de receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR), os quais são expressos abundantemente em neurônios das estruturas límbicas. O MR está implicado no processo de apreciação e início da resposta estressora, enquanto o GR, ativado por quantidade elevada de corticóides, finaliza as reações ao estresse, mobiliza as fontes de energia requeridas para este propósito e facilita o restabelecimento da homeostase (TILBROOK; TURNER; CLARKE, 2000).

O CRH tem sido implicado na fisiopatologia de vários distúrbios, como ansiedade, depressão atípica e melancólica, estados de fadiga e estresse crônico, distúrbios do sono, comportamentos aditivos, neurodegeneração, distúrbios inflamatórios autoimunes e alérgicos, doenças gastrintestinais e síndrome metabólica (SMITH et al., 1998; HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006).

1.1.5. Antagonistas do CRH

A procura de novas terapias para tratamento de diversas doenças subjacentes ao estresse levou a indústria farmacêutica a desenvolver antagonistas competitivos para receptores CRH-R₁, provavelmente o mais envolvido nestas desordens. Diferentes moléculas têm sido

desenvolvidas tais como antalarmin (WEBSTER et al., 1996), CP 154,526 (CHEN et al., 1997), DMP904 (GILLIGAN et al., 2000) e DMP696 (HE et al., 2000). O uso destes antagonistas no tratamento de distúrbios associados com hiperatividade de CRH representa uma estratégia terapêutica nova em neurologia e psiquiatria. Porém, a administração desses antagonistas pode ser limitada pela inibição do eixo HPA.

Antalarmin (análogo de CP 154,526) é uma pirrolopirimidina (substância não peptídica), cuja administração sistêmica antagoniza o CRH central e periféricamente (WEBSTER et al., 1996). Em ratos, o tratamento crônico reduz as concentrações plasmáticas de ACTH e de corticosterona (B) (BORNSTEIN et al., 1998), diminui a resposta de ACTH no teste de nado forçado e de choques nas patas (DEAK et al., 1999; JUTKIEWICZ et al., 2005), bloqueia as ações ansiogênicas do CRH no labirinto em cruz elevado (ZORRILLA et al., 2002b), bloqueia as alterações comportamentais posteriores à implantação de microcápsulas de B na amígdala (MYERS et al., 2005), e prejudica a aquisição e permanência do medo condicionado (DEAK et al., 1999). Assim, antalarmin reduz a atividade do eixo HPA, e atenua a resposta de ansiedade e medo nos modelos experimentais em roedores.

Da mesma maneira, a antalarmin tem sido usada em alguns modelos envolvendo primatas. Com dose de 20mg/kg obteve-se atenuação da secreção de ACTH e do comportamento de agitação observados logo após a colocação do macaco num habitat novo, o paradigma de intrusão (HABIB et al., 2000). Por outro lado, no modelo de isolamento social, a administração de antalarmin não modificou os perfis hormonais de ACTH, cortisol, noradrenalina (NA) e adrenalina, mas alterou positivamente a exploração ambiental nestes animais (AYALA et al., 2004).

Além de participar na resposta ao estresse, a antalarmin também tem sido testada em outros modelos experimentais como abuso de substâncias, resposta inflamatória, motilidade intestinal, comportamentos cognitivos e neurodegeneração (ZORRILLA et al., 2002a;

YUHAS et al., 2004; CAO et al., 2005; GREENWOOD-VAN et al., 2005; FUNK et al., 2006).

Em consequência das potenciais aplicações em área clínica, iniciaram-se alguns estudos para reconhecer os possíveis efeitos terapêuticos da antalarmin (NEWSLETTER OF THE IIT RESEARCH INSTITUTE - LIFE SCIENCES GROUP, 2005).

1.2. Efeitos do Estresse em Funções Reprodutivas

O efeito do estresse e de distúrbios psicológicos latentes ou evidentes sobre a função reprodutora é reconhecido há longo tempo. O CRH suprime a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), assim como os glicocorticóides agem na hipófise e nas gônadas inibindo a secreção de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e de esteróides gonadais.

Em animais, um dos primeiros trabalhos sobre o possível efeito do estresse em funções sexuais analisou a relação entre densidade de população e eficiência reprodutiva em roedores (CHRISTIAN, 1971). Posteriormente, muitos pesquisadores têm estudado os efeitos de vários estressores sobre a secreção de LH e de esteróides sexuais. O próprio Hans Selye observou na situação de estresse o aumento da atividade do eixo HPA acompanhada de diminuição nas funções reprodutivas, sugerindo a possível relação entre hormônios do eixo HPA e do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG). De fato, os estrógenos, o CRH, peptídeos derivados da POMC e glicocorticóides, modulam efeitos do estresse sobre as funções reprodutivas (RIVIER; RIVEST, 1991; BRANN; MAHESH, 1991).

Os hormônios relacionados ao estresse podem influenciar funções sexuais em três níveis distintos do eixo HPG: no cérebro (ao modular a secreção do GnRH), na hipófise (ao interferir com a liberação de LH pelo GnRH), e nas gônadas (ao alterar o efeito estimulador das gonadotropinas sobre a secreção de esteróides sexuais) (RIVIER; RIVEST, 1991; TILBROOK; TURNER; CLARKE, 2000).

Humanos e roedores expostos a estresse agudo e em presença de condições hormonais favoráveis (estrógeno elevado) apresentam aumento da secreção de LH, cujos mecanismos não são bem compreendidos. O estresse prolongado, por sua vez, inibe consistentemente a liberação de LH e bloqueia a ovulação. Entre os mediadores desses efeitos estão glicocorticóides, CRH, AVP, peptídeos opióides endógenos, catecolaminas e serotonina. (RIVIER; RIVEST, 1991; BRANN; MAHESH, 1991; TILBROOK; TURNER; CLARKE, 2000).

A proximidade entre neurônios CRH e GnRH (MACLUSKY; NAFTOLIN; LERANTH, 1988; DUDAS; MERCHENTHALER, 2002) sugere uma possível mediação inibidora direta do CRH nas funções reprodutivas. De fato administração intracerebroventricular (i.c.v.) de CRH em roedores e primatas diminui a pulsatilidade de GnRH e a liberação de LH (RIVIER; RIVEST, 1991). No entanto, nem sempre há uma relação direta entre aumento de CRH e inibição aguda da liberação de LH, dificultando a caracterização dos limites de ativação do eixo HPA. Os mecanismos pelos quais o CRH altera a liberação de GnRH não são bem entendidos, mas podem envolver ativação de outras vias, tais como opióides endógenos (ALMEIDA; NIKOLARAKIS; HERZ, 1988) e/ou catecolaminas (VALENTINO, 1989). A infusão de CRH na área pré-óptica medial diminuiu significativamente a liberação de GnRH e de LH em ratas ovariectomizadas, porém é desconhecido se fibras diretas do PVN para área pré-óptica são as responsáveis por esta alteração (RIVIER; RIVEST, 1991).

Manipulações agudas em ratos não estressados indicam que o sistema noradrenérgico exerce ação estimuladora da liberação de LH, mediada por receptores α_1 adrenérgicos em presença de estrógeno. Enquanto na sua ausência, a NA pode exercer ação inibidora em receptores β (ETGEN; UNGAR; PETITTI, 1992). Cerca de 70% da inervação noradrenérgica do PVN surge de corpos celulares A1 e 20% de corpos celulares A2 (RIVIER; RIVEST,

1991). Lesões bilaterais do LC reduzem significativamente a secreção pré-ovulatória de LH (FRANCI; ANTUNES-RODRIGUES, 1985), a secreção pulsátil de LH (ANSELMO-FRANCI et al., 1999) e o pico induzido por estrógeno e progesterona em ratas ovariectomizadas (HELENA; FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2002; ROCHA et al., 2006).

Sabe-se que o estresse por imobilização ativa um circuito curto de reflexos autonômicos na medula e um circuito longo no qual o núcleo do trato solitário, o núcleo parabraquial, o tálamo e PVN modulam as aferências provenientes de receptores somatossensoriais, emitem respostas e conduzem informações a estruturas superiores (córtex e sistema límbico). A ativação das áreas noradrenérgicas no tronco cerebral é considerada crucial no estresse por imobilização, que induz expressão de proteína FOS no hipotálamo (PVN), no sistema límbico (córtex cingulado e piriforme), em grupos celulares catecolaminérgicos (A1, A2, A5, A6, A7), no núcleo central da amígdala, e em núcleos pontinos e associados. A imobilização também provoca aumento das concentrações plasmáticas de NA, ACTH e B (PACAK; PALKOVITS, 2001).

A secreção de prolactina também é alterada em situações de estresse. Várias situações de estresse agudo provocam hiperprolactinemia (e.g. imobilização, exposição a éter, etc.) que pode inibir a secreção de gonadotrofinas. A injeção i.c.v. de antagonistas de CRH bloqueia a elevação de prolactina em condições de estresse agudo, mostrando a ação reguladora na secreção deste hormônio (AKEMA et al., 1995). O estradiol exerce efeito direto sobre a secreção de prolactina, estimulando sua secreção basal, assim como durante situação de estresse (CHEN; MEITES, 1970; PAN; GALA, 1985; ARMARIO et al., 1987; VIAU; MEANEY, 1991). A secreção de progesterona ocorre em resposta à ativação do eixo HPA, (XIAO et al., 1994; ANDERSEN et al., 2004), com possível efeito inibidor sobre a secreção de prolactina (DEIS; LEGUIZAMON; JAHN, 1989) e estimulador sobre LH em situações de estresse (XIAO et al., 1994).

2. Objetivos

Considerando que:

- há interação dos eixos hipotálamo-hipófise-gônada e hipotálamo-hipófise-adrenal;
- o eixo hipotálamo-hipófise-gônada é alterado em situação de estresse agudo e crônico;
- a secreção de prolactina pode ser alterada em situações de estresse e ter efeitos sobre a secreção de gonadotrofinas;
- os receptores CRH-R₁ são os mais envolvidos na sinalização da resposta estressora e estão expressos principalmente no SNC;
- antalarmin é um antagonista específico de receptores CRH-R₁;
- ainda não são devidamente esclarecidos os efeitos do antagonismo dos receptores CRH-R₁ no sistema reprodutor em situação de estresse agudo;

O objetivo geral do projeto é:

- Analisar se o controle da secreção de LH, FSH, prolactina, B e progesterona sob influência estrogênica e de estresse agudo, tem mediação de CRH em receptores CRH-R₁.

Os objetivos específicos são:

- Determinar as concentrações plasmáticas de LH, FSH, prolactina, B e progesterona, em diferentes tempos após estresse por contenção.
- Verificar se a microinjeção i.c.v. ou periférica de antalarmin, altera as concentrações plasmáticas de LH, FSH, prolactina, B e progesterona após estresse por contenção.
- Analisar se as concentrações plasmáticas de LH, FSH, prolactina, B e progesterona, sob ação de estrógenos são modificadas por estresse agudo e / ou antalarmin.
- Caracterizar o efeito antagonístico de antalarmin pela administração periférica (e.v.) ou central (i.c.v.)

3. Material e Métodos

3.1. Animais e Desenho Experimental

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas entre 180 e 200g de peso provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto–USP e que foram mantidas no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, em caixas coletivas (máximo 5 animais) durante 3 a 5 dias para aclimação em um ciclo claro-escuro de 12h / 12h (claro das 0600h às 1800h h), à temperatura de 21 ± 1 °C e acesso livre à ração balanceada e água.

O ciclo estral das ratas foi monitorado utilizando a técnica do esfregaço vaginal. Ratas em metaestro ou diestro foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de cetamina (100mg/kg, Ketamina Agener® União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu-SP, Brasil) e xilazina (20mg/kg, Dopaser® Laboratório Calier S.A. Barcelona, Espanha) e submetidas à ovariectomia bilateral sob técnica cirúrgica. Dependendo do grupo experimental, seguiu-se uma segunda cirurgia para implantação de cânula de aço inoxidável (0,7 x 17mm) no terceiro ventrículo por técnica estereotáxica utilizando as seguintes coordenadas: antero-posterior -0,5mm atrás do bregma; lateral 0mm; vertical 8,5mm abaixo da calota craniana (PAXINOS G; WATSON C, 1997). A cânula foi fixada com acrílico dental, parafusos e coberta com obturador. Antes da craneotomia foi injetado 0,1ml de lidocaina 2% com adrenalina, subcutaneamente (Alphacaine®, DFL S.A. Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

No período pós-cirúrgico as ratas permaneceram em um local aquecido até a recuperação da anestesia e receberam dose profilática de antibiótico veterinário (0,2 ml I.M., Pentabiótico® Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas, SP, Brasil) e analgésico flunixinina meglumina (2,5mg/kg I.M, Banamine®, Schering-Plough Saúde Animal Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A recuperação ocorreu no Biotério durante 5 a 7 dias, em número máximo de 3 animais por caixa.

No período de 3 a 5 dias após as cirurgias, foi iniciada terapia hormonal substitutiva, com injeções subcutâneas transmusculares de cipionato de estradiol (10 µg/0,1ml por três dias) às 1000h. No terceiro dia de terapia hormonal substitutiva, que foi à véspera da sessão experimental, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tribromoetanol (250mg/Kg, Sigma-aldrich, Milwaukee, USA) em salina isotônica (POLETINI et al., 2003) para implantação de um cateter (Silastic® Dow Corning Co. Midland, Michigan, USA) na jugular externa até o átrio direito, segundo técnica descrita previamente (HARMS; OJEDA, 1974).

No período pós-cirúrgico, as ratas permaneceram em um local aquecido até a recuperação da anestesia, receberam dose de analgésico flunixinina meglumina (2,5mg/kg I.M, Banamine®, Schering-Plough Saúde Animal Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foram colocadas em caixas individuais.

3.2. Planejamento Experimental

Cada um dos dois experimentos (I e II) planejados foi constituído por sete grupos de animais nas seguintes condições:

- 1^a.- Dois grupos com injeção de veículo (com e sem cânula i.c.v.) (grupo controle).
- 2^a.- Dois grupos com injeção de veículo + estresse (com e sem cânula i.c.v.) (grupo estresse)
- 3^a.- Antalarmin 1µg/0,5µl i.c.v. + estresse. (grupo Ant 1 i.c.v) (ZORRILLA et al., 2002a).
- 4^a.- Antalarmin 0,5mg/kg e.v. + estresse. (grupo Ant 0,5) (HABIB et al., 2000).
- 5^a.- Antalarmin 0,1mg/kg e.v. + estresse. (grupo Ant 0,1) (BROADBEAR et al., 2002).

Experimento I- coletas de sangue foram realizadas às 1000h (imediatamente antes de alguma das injeções citadas acima) e às 1100, 1115, 1130, 1200, 1300 e 1400h.

Experimento II- coletas de sangue foram realizadas às 1000h (imediatamente antes de alguma das injeções citadas acima) e às 1100, 1400, 1500, 1600, 1700 e 1800h.

As amostras de ambos os grupos foram utilizadas para avaliar os efeitos do estresse de contenção sobre a secreção de LH, FSH, prolactina, B e progesterona.

3.3. Procedimento Experimental

No dia do experimento, em torno das 0930h, foi conectada uma extensão de polietileno (PE-50) ao cateter implantado na jugular contendo salina heparinizada (100 U.I/ml), para permitir coleta de amostras sanguíneas com os animais movimentando-se livremente. Às 1000h foi feita uma coleta basal de sangue (0.6ml) e imediata reposição com salina isotônica NaCl 0,15M. Em seguida procedeu-se à injeção de antalarmin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) ou veículo por via endovenosa (0,6ml em 120s) ou i.c.v. (0,5µl durante 60s) com auxílio de bomba microinjetora (CMA/Microdialysis Model CMA/102 Suécia) conectada a uma agulha gengival (0,3 x 18mm) através de uma extensão de polietileno (PE.10). Antalarmin foi dissolvida em veículo contendo 80 % de salina, 10% de etanol e 10% de cremophor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (BROADBEAR et al., 2002).

Às 1020h, os animais foram submetidos à situação de estresse por contenção. O modelo consiste da permanência do animal dentro de um tubo plástico ventilado de 5cm de diâmetro × 22cm de comprimento, durante 40 minutos. Amostras de sangue foram coletadas em série com reposição imediata (0,6ml) de volemia com salina isotônica.

Ao final do experimento os animais foram submetidos à perfusão utilizando salina e fixador (paraformaldeído 4%) sob anestesia com Tiopental sódico (1g/kg, Tiopenthax®, Lab. Cristália, São Paulo, Brasil) para remoção do cérebro e confirmação da localização da cânula de demora em cortes sob congelação. Somente animais com localização no terceiro ventrículo foram usados nas análises.

A representação esquemática do cronograma dos experimentos está apresentada na figura 2. O protocolo experimental deste projeto foi submetido à análise pela Comissão de

Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP. Aprovação n°. 104/2006 (20 de outubro de 2006).

3.4. Dosagens Hormonais

O sangue coletado em cada experimento foi centrifugado e o plasma congelado a -20 °C até a realização da dosagem de progesterona, B, LH, FSH e prolactina por radioimunoensaio (RIE).

A progesterona foi determinada por meio de conjunto de reagentes para RIE adquiridos da MAIA, Adaltis Italy S.p.A (SEYMOUR; SCHMIDT; SCHULZ, 2003), em cujo ensaio verificou-se a doses mínima detectável de 1,2 ng/ml, o erro intra-ensaio de 2,5% e o erro inter-ensaio de 8 %.

Para dosagem de B foi realizada a extração prévia com etanol e as amostras submetidas ao RIE utilizando padrão e anticorpo específico adquiridos da Sigma Co. (St. Louis, Missouri, USA) e a B triciada adquirida da Amershan (Piscataway, New Jersey USA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5 / 0,05%). A doses mínima detectável foi 0,08 ng/ml, o erro intra-ensaio de 4,5 % e o erro inter-ensaio de 11%.

As concentrações plasmáticas de LH, FSH e PRL foram realizadas por RIE de duplo anticorpo, com anticorpos específicos e padrões adquiridos junto ao *National Program of Pituitary Hormone, National Institute of Health* (Torrance, California, USA). O anticorpo secundário para a precipitação da reação do RIE é produzido em ovelha pelo laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). O LH, o FSH e a prolactina foram iodinados e purificados no laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). As doses mínimas detectáveis foram: 0.2 ng/ml (FSH); 0.05 ng/ml (LH); 0.09 ng/ml (prolactina). Os erros intra-ensaio foram 4%, 3% e 3,5 %, para LH, FSH e prolactina respectivamente.

Desenho Experimental

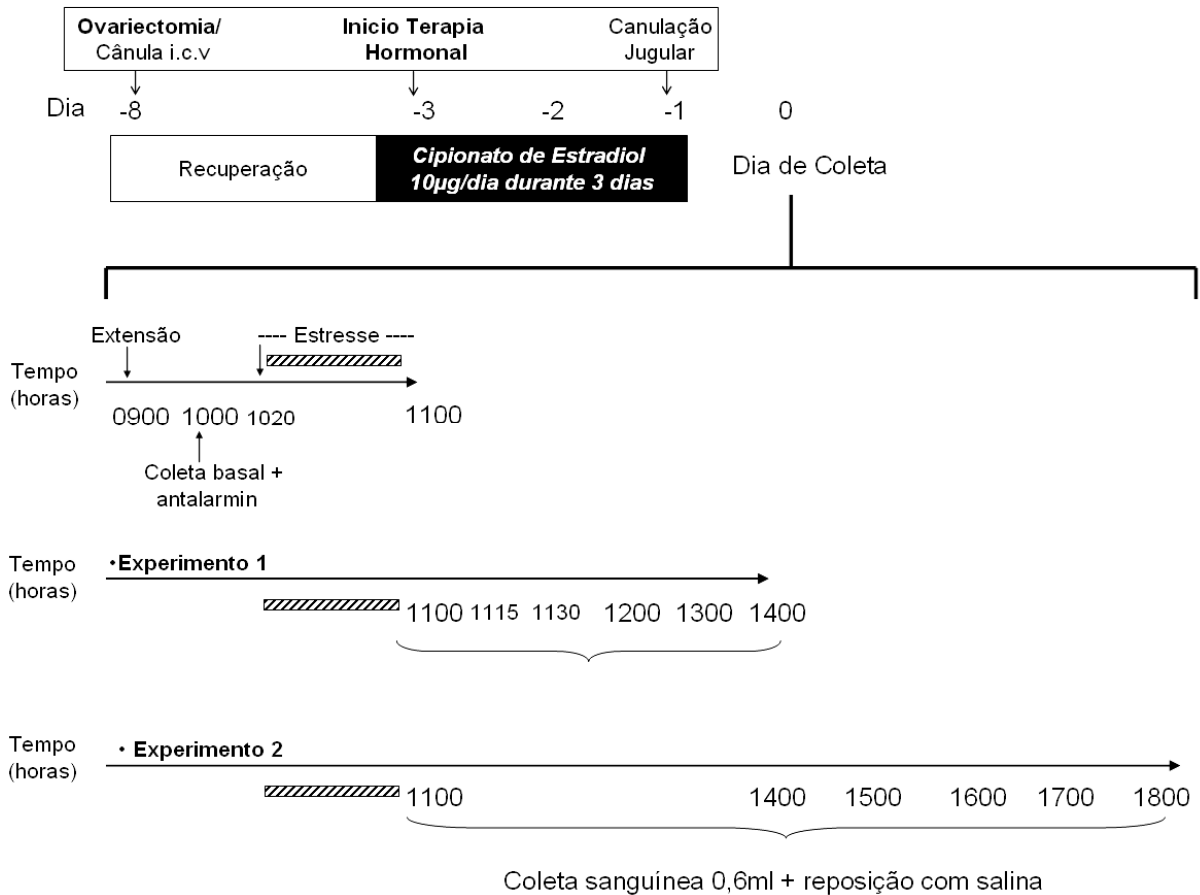


Figura 2. Representação esquemática dos procedimentos e cronograma dos experimentos. As coletas das amostras foram realizadas nos horários assinalados conforme descrição no texto.

3.5. Análise Estatística

Os resultados das dosagens hormonais são expressos com média \pm erro padrão da média, submetidos à análise de variância de dois fatores (TWO-WAY ANOVA) com medidas repetidas, seguida de pós-teste Student-Newman-Keuls (SigmaStat for Windows Version 3.10, 2004). Foi considerada diferença estatisticamente significativa $P < 0.05$.

Realizou-se uma análise entre os grupos controle com e sem estresse, tendo a presença de estresse como primeiro fator e o tempo (hora da coleta da amostra) como segundo fator. Outra análise foi feita entre os grupos submetidos a estresse tratados com antalarmin, tendo a presença da droga antalarmin como primeiro fator e o tempo (hora da coleta da amostra) como segundo fator.

4. Resultados

As análises estatísticas iniciais demonstraram que não houve diferenças entre os dois grupos controles com e sem cânula i.c.v. e entre os dois grupos estresse com e sem cânula i.c.v. Os efeitos das doses 0,1 e 0,5mg/kg e.v. não foram diferentes em nenhum dos testes realizados. Assim, optou-se por expor e representar os resultados com um grupo controle (com cânula i.c.v.), um grupo estresse (com cânula i.c.v.), uma dose de antalarmin e.v e i.c.v..

4.1. Corticosterona

Na figura 3A, observam-se as concentrações plasmáticas de B (ng/ml) em coleta seriada até às 1400h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferença significativa para os fatores estresse [$F(1,223)=73,268$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,223)=13,288$ $P<0,001$], assim como também na interação deles [$F(6,223)=18,010$ $P<0,001$]. O teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (SNK) indicou que a elevação de B no grupo estresse a partir das 1100 até 1300h foi significativa quando comparada com o controle. A comparação dos grupos estresse e injetados com antalarmin mostrou diferenças significativas nos fatores antalarmin [$F(2,251)=12,258$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,251)=27,903$ $P<0,001$], e na interação deles [$F(12,251)=3,389$ $P<0,001$]. O teste SNK demonstrou que às 1100, 1115, 1130, 1200 e 1300h, o grupo Ant. 0,1 e.v. comparado com o grupo estresse teve concentração de B significativamente menor. As concentrações de B às 1100, 1130, e 1200h no grupo Ant.1 i.c.v. diferiram estatisticamente do grupo estresse. O grupo Ant.1 i.c.v mostrou concentrações de B maiores às 1200 e 1300h, quando comparado com Ant. 0,1 e.v.

Na figura 3B, observam-se as concentrações plasmáticas de B (ng/ml) em coleta seriada até às 18h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferença significativa para os fatores estresse [$F(1,223)=83,892$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,223)=19,735$ $P<0,001$], assim como para interação entre deles [$F(6,223)=24,506$ $P<0,001$]. A elevação das concentrações de B às 1100, 1400, 1500 e 1600h no grupo estresse foi significativa quando

comparado ao controle, segundo o pós-teste SNK. A comparação entre os grupos estresse e com antalarmin mostrou diferenças significativas para os fatores antalarmin [$F(2,265)=7,087$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,265)=21,448$ $P<0,001$], assim como para interação deles [$F(12,265)=7,494$ $P<0,001$]. O pós-teste SNK revelou que o grupo Ant. 0,1 e.v. teve concentrações plasmáticas de B menores às 1100, 1400 e 1500h quando comparados com o grupo estresse. O grupo Ant. 1 i.c.v. foi diferente do estresse às 1100 e 1700h.

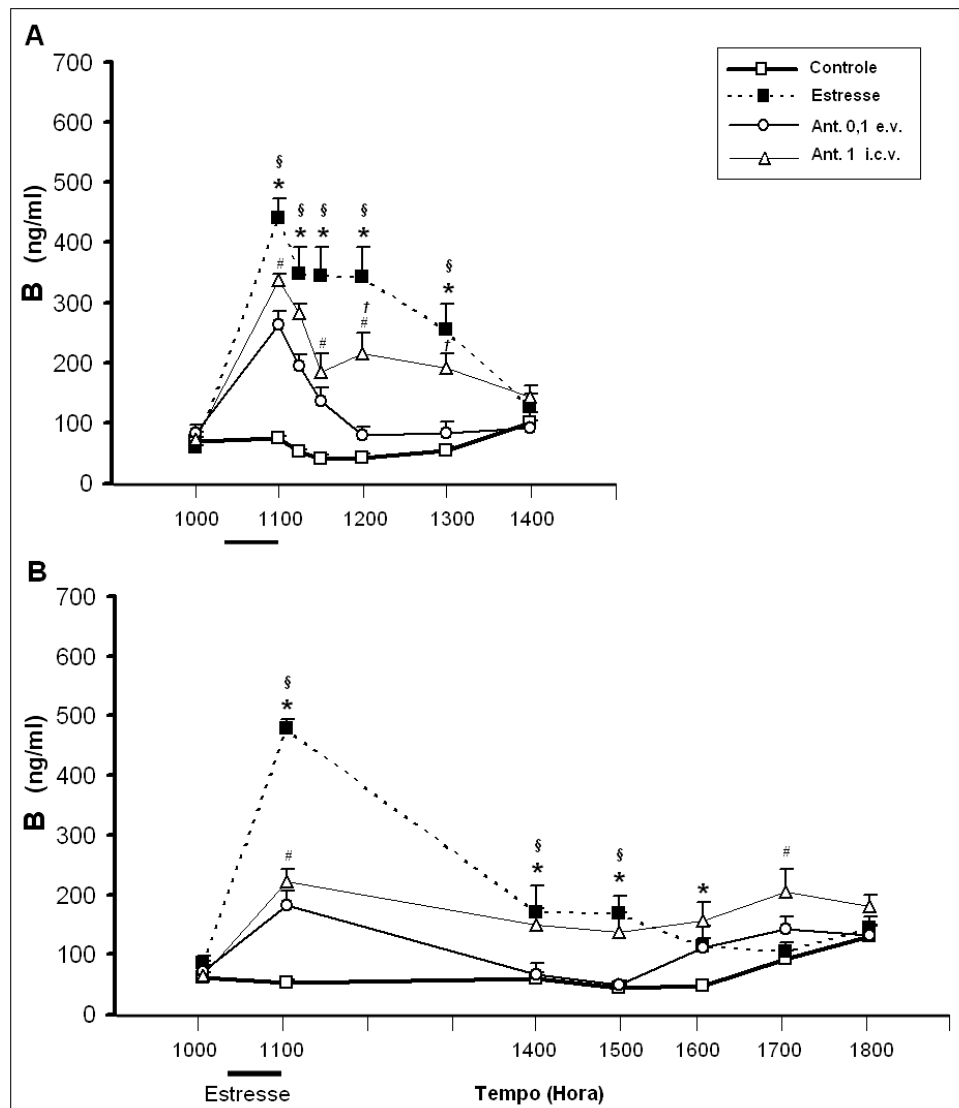


Figura 3. Efeitos do estresse de contenção e antalarmin sobre a secreção de corticosterona (B ng/ml) em ratas tratadas com estrógeno (E_2). Ratas ovariectomizadas tratadas com $10\mu\text{g}$ de E_2 por três dias, foram submetidas a estresse de contenção por 40 minutos com administração previa de antalarmin ou veículo. Fig. (A) mostra efeitos imediatos e Fig. (B) descreve efeitos na tarde após o estresse. Grupo Controle (n=16), Estresse (n=16), Antalarmin (Ant.) 0,1mg/kg e.v. (n=10), e Ant. $1\mu\text{g}$ i.c.v. (n=10). Dados expressos como média \pm erro padrão. * indica diferenças significativas ($P<0,001$) entre os grupos controle e estresse. § indica diferenças entre o grupo estresse e o grupo Ant. 0,1 e.v. ($P<0,001$). # representa diferenças entre o grupo Ant. 1 i.c.v. e grupo estresse (Fig. 3A $P<0,05$, Fig.3B 11h $P<0,001$, 17h $P<0,05$). † indica diferenças entre grupo Ant. 1 i.c.v. com o grupo Ant. 0,1 e.v. ($P<0,05$).

4.2. Hormônio Luteinizante

Na figura 4A, observam-se as concentrações plasmáticas de LH (ng/ml) em coleta seriada até às 1400h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferença significativa para os fatores estresse [$F(1,223)=240,752$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,223)=16,864$ $P<0,001$], assim como para interação deles [$F(6,223)=14,398$ $P<0,001$]. O pós-teste indicou que a elevação de LH no grupo submetido ao estresse foi significativa quando comparado com o grupo controle às 1100, 1115, 1130, 1200, 1300 e 1400h. A análise entre os grupos com antalarmin e o grupo estresse, indicou diferenças significativas para os fatores antalarmin [$F(2,258)=45,873$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,258)=11,851$ $P<0,001$], assim como para interação destes fatores [$F(12,258)=4,029$ $P<0,001$]. As comparações pelo teste SNK mostraram que os grupos com injeção central ou periférica de antalarmin tiveram diminuição significativa das concentrações plasmáticas de LH em relação ao grupo estresse às 1100, 1115, 1130, 1200, 1300 e 1400h.

A figura 4B mostra as concentrações plasmáticas de LH (ng/ml) em coleta seriada até às 1800h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferenças significativas para o fator tempo [$F(6,223)=33,014$ $P<0,001$], mas não para o fator estresse [$F(1,223)=0,089$ $P=0,767$], porém houve diferença para interação destes fatores [$F(6,223)=32,623$ $P<0,001$]. O pós-teste indicou que a elevação de LH após o estresse foi significativa às 1100, 1400 e 1800h, assim como foi significativa no grupo controle às 1500, 1600, 1700h. A comparação entre os grupos com antalarmin e o grupo estresse, revelou diferenças significativas para os fatores antalarmin [$F(2,258)=21,270$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,258)=17,652$ $P<0,001$], assim como para interação destes fatores [$F(12,258)=9,727$ $P<0,001$]. O pós-teste mostrou que os grupos com antalarmin tiveram diminuição significativa das concentrações plasmáticas de LH às 1100, 1400 e 1800h quando comparados com o grupo estresse. O grupo Ant. 1 i.c.v.

apresentou concentrações significativamente menores às 1700 e 1800h quando comparado com o grupo estresse e Ant. 0,1 e.v.

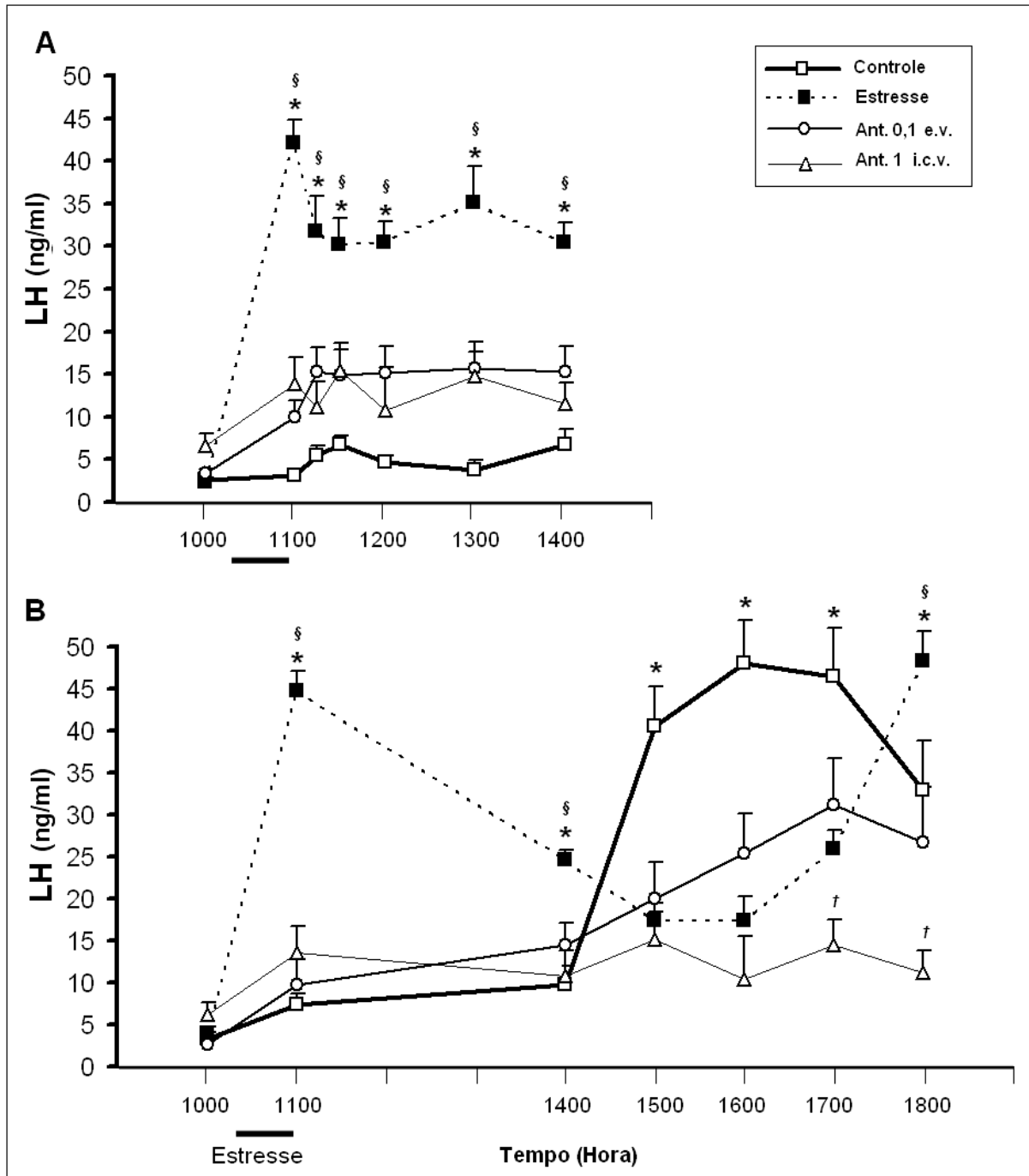


Figura 4. Efeitos do estresse de contenção e antalarmin sobre a secreção de LH (ng/ml) em ratas tratadas com estrógeno (E₂). Ratas ovariectomizadas tratadas com 10µg de E₂ por três dias, foram submetidas a estresse de contenção por 40 minutos com administração previa de antalarmin ou veículo. Fig. (A) mostra efeitos imediatos e Fig. (B) descreve efeitos na tarde após o estresse. Grupo Controle (n=16), Estresse (n=16), Antalarmin (Ant.) 0,1mg/kg e.v. (n=10) e Ant. 1µg i.c.v. (n=10). Dados expressos como média ± erro padrão. * indica diferenças significativas (Fig. 4A. P<0,001. Fig. 4B. P<0,001 às 11, 15, 16 e 17h, P<0,05 às 14 e 18h) entre os grupos controle e estresse. § indica diferenças entre o grupo estresse e os grupos Ant. 0,1 e.v. e Ant 1 i.c.v. (P<0,001). † indica diferenças entre grupo Ant. 1 i.c.v. com o grupo Ant. 0,1 e.v. (P<0,05).

4.3. Prolactina

Na figura 5A, observam-se os níveis plasmáticos de prolactina (ng/ml) em coleta seriada até às 1400h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferenças significativas nos fatores estresse [$F(1,223)=43,252$ $P<0,001$], no fator tempo [$F(6,223)=84,149$ $P<0,001$], assim como também houve interação entre eles [$F(6,223)=30,178$ $P<0,001$]. O pós-teste indicou que a diminuição de prolactina às 1300 e 1400h no grupo estresse foi significativa quando comparado com o grupo controle. A análise entre os grupos com antalarmin e grupo estresse, revelou que existem diferenças nos fatores antalarmin [$F(2,258)=16,689$ $P<0,001$], tempo [$F(6,258)=68,396$ $P<0,001$], e assim mesmo, houve interação entre eles [$F(12,258)=16,998$ $P<0,001$]. As comparações múltiplas feitas pelo teste SNK mostraram que o grupo Ant. 0,1 e.v. teve concentrações de prolactina maiores as 1300 e 1400h quando comparadas com os grupos Ant. 1 i.c.v. e grupo estresse.

Na figura 5B, observam-se os níveis plasmáticos de prolactina (ng/ml) em coleta seriada até às 1800h. A análise realizada entre os grupos controle e estresse revelou diferenças significativas no fator tempo [$F(6,223)=89,375$ $P<0,001$], mas não no fator estresse [$F(1,223)=3,787$ $P=,061$], porém houve interação entre estes fatores [$F(6,223)=18,951$ $P<0,001$]. O pós-teste evidenciou que o grupo estresse às 1400h teve uma diminuição da concentração de prolactina seguida de um aumento às 1600, 1700, e 1800h quando comparadas com o controle. A análise entre os grupos com antalarmin e com estresse, revelou que existem diferenças nos fatores antalarmin [$F(2,279)=39,038$ $P<0,001$], tempo [$F(6,279)=108,803$ $P<0,001$], e assim mesmo, houve interação entre eles [$F(12,279)=16,641$ $P<0,001$]. As comparações múltiplas revelaram que o grupo Ant. 0,1 e.v. teve concentrações aumentadas de prolactina às 1400h quando comparadas com o grupo estresse e Ant. 1 i.c.v. O grupo Ant. 1 i.c.v. teve concentrações menores às 1500, 1600, 1700 e 1800h de prolactina, comparadas com os grupos Ant. 0,1 e.v. e estresse. O grupo estresse teve aumento

significativo nos níveis do hormônio às 1600, 1700 e 1800h quando comparado com os grupos Ant. 0,1e.v., e Ant. 1 i.c.v.

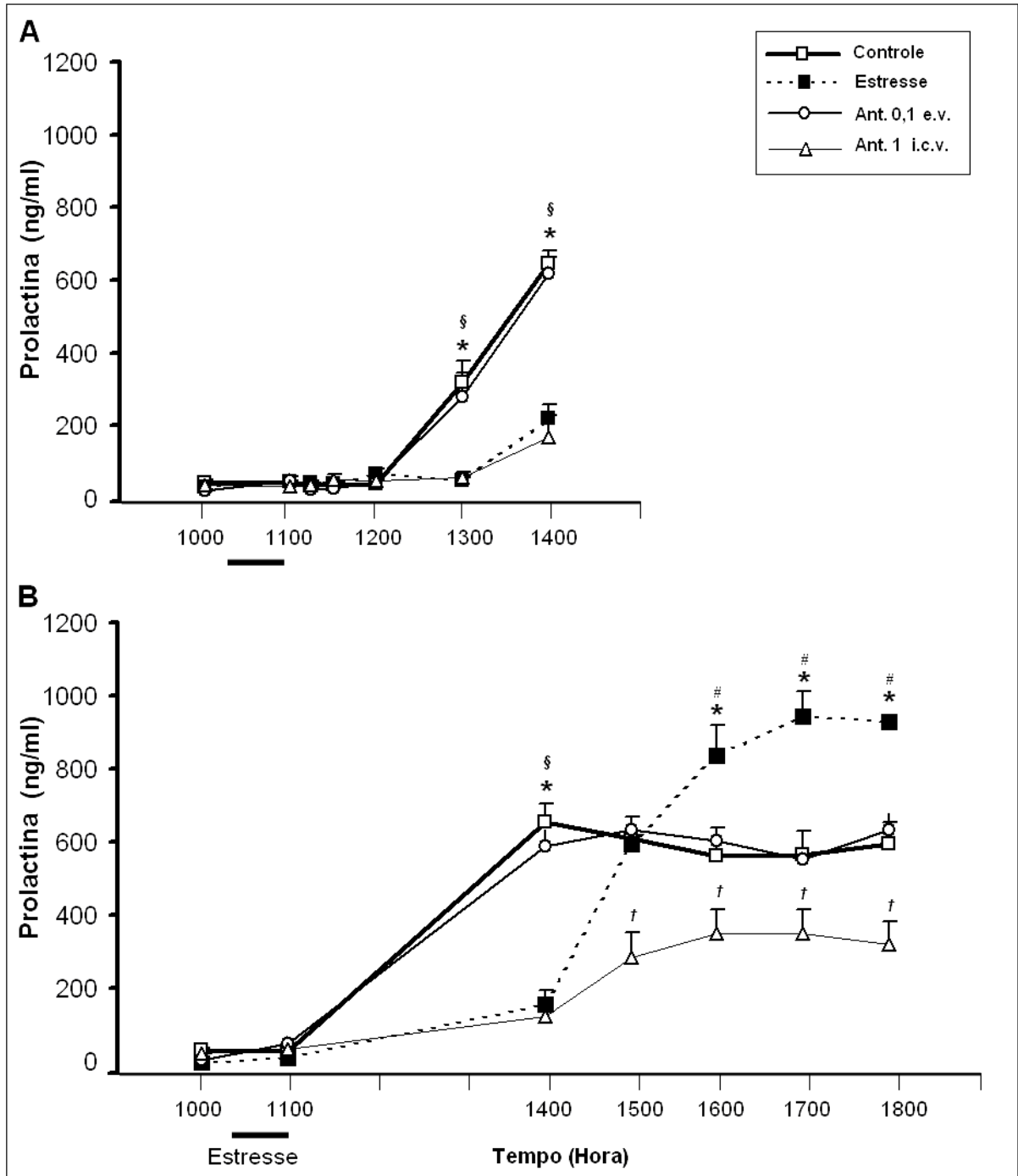


Figura 5. Efeitos do estresse de contenção e antalarmin sobre a secreção de prolactina (ng/ml) em ratas tratadas com estrógeno (E₂). Ratas ovariectomizadas tratadas com 10µg de E₂ por três dias, foram submetidas a estresse de contenção por 40 minutos com administração previa de antalarmin ou veículo. Fig. (A) mostra efeitos imediatos e Fig. (B) descreve efeitos na tarde após o estresse. Grupo Controle (n=16), Estresse (n=16), Antalarmin (Ant.) 0,1mg/kg e.v. (n=10), e Ant. 1µg i.c.v. (n=14). Dados expressos como média ± erro padrão. * indica diferenças significativas (P<0,001) entre os grupos controle e estresse. § indica diferenças (P<0,001) entre o grupo Ant. 0,1 e.v. e estresse e Ant. 1 i.c.v. † representa diferença (P<0,001) entre o grupo Ant. 1 i.c.v. e os grupos Ant. 0,1 e.v., e estresse. # indica diferença (P<0,001) entre o grupo estresse e os grupos Ant. 0,1, e.v e Ant.1 i.c.v.

4.4. Progesterona

Na figura 6A, observam-se as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml) em coleta seriada até às 1400h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferenças significativas para o fator tempo [$F(6,223)=13,946$ $P<0,001$], mas não para o fator estresse [$F(1,223)=7,351$ $P=0,011$], e não houve interação entre eles [$F(6,223)=0,722$ $P=0,632$]. O pós-teste revelou que as concentrações de progesterona no grupo estresse foram significativamente maiores às 1100, 1115, 1130 e 1200h quando comparadas com o grupo controle. A comparação entre os grupos com antalarmin e estresse mostrou que existem diferenças significativas para os fatores antalarmin [$F(2,258)=14,547$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,258)=15,098$ $P<0,001$], assim como para interação destes fatores [$F(12,258)=3,664$ $P<0,001$]. O pós-teste mostrou que as concentrações do hormônio no grupo estresse foram maiores às 1115, 1130, 1200 e 1300h quando comparadas com os grupos com antalarmin.

Na figura 6B, observam-se as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml) em coleta seriada até às 1800h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferenças significativas para o fator tempo [$F(6,223)=20,146$ $P<0,001$], mas não para o fator estresse [$F(1,223)=2,309$ $P=0,139$], e não houve interação destes fatores [$F(6,223)=1,299$ $P=0,260$]. O pós-teste revelou que as concentrações de progesterona foram significativamente maiores no grupo estresse que no grupo controle às 1100h. A comparação entre os grupos com antalarmin e estresse mostrou diferenças para o fator tempo [$F(6,279)=33,631$ $P<0,001$], mas não para o fator antalarmin [$F(2,279)=1,970$ $P=0,154$], e também não houve interação destes fatores [$F(12,279)=1,567$ $P=0,103$]. O teste de comparações múltiplas evidenciou que as concentrações do hormônio no grupo estresse foram maiores às 1100h quando comparadas com as dos grupos com antalarmin.

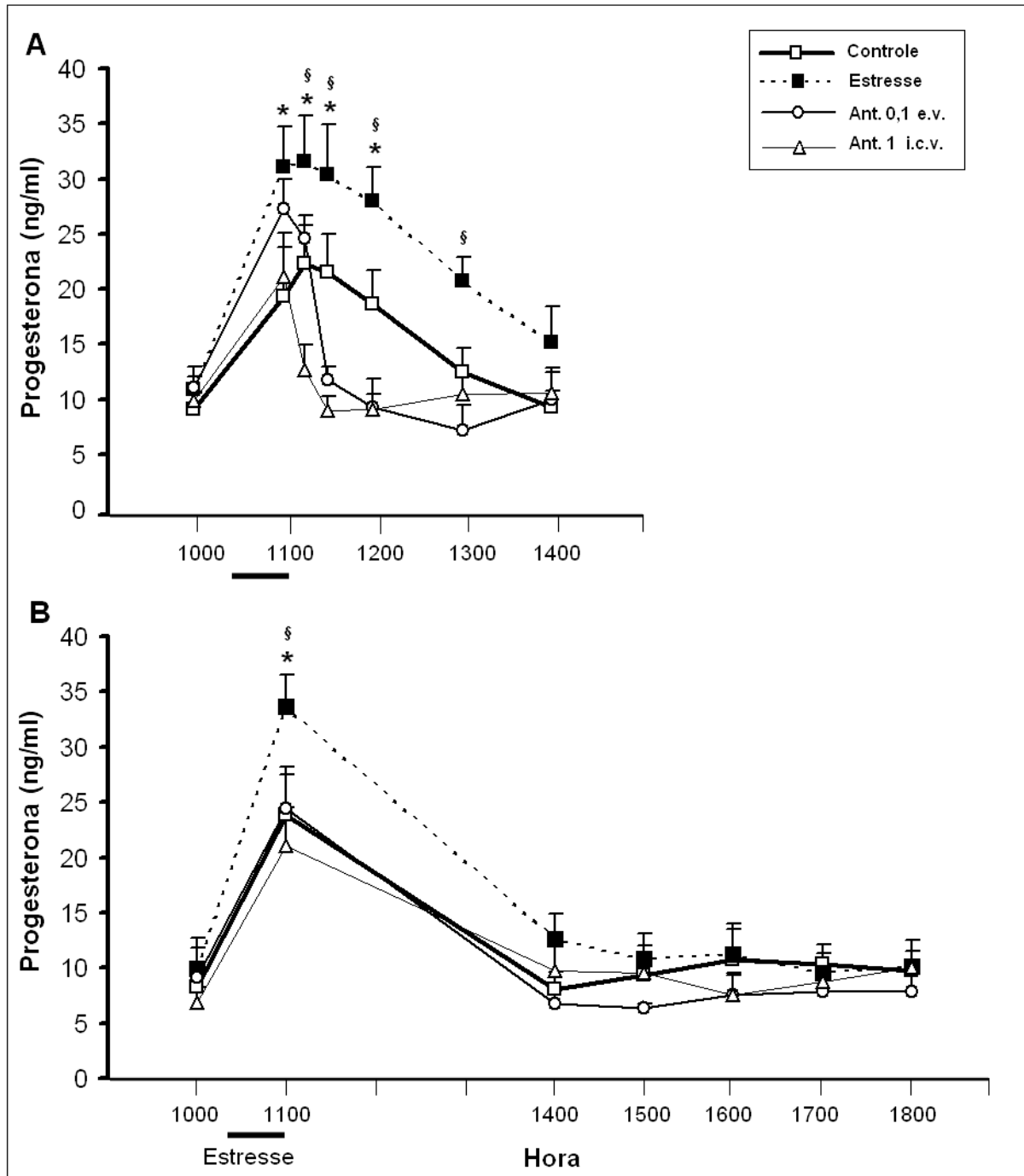


Figura 6. Efeitos do estresse de contenção e antalarmin sobre a secreção de progesterona (ng/ml) em ratas tratadas com estrógeno (E₂). Ratas ovariectomizadas tratadas com 10µg de E₂ por três dias, foram submetidas a estresse de contenção por 40 minutos com administração previa de antalarmin ou veículo. Fig. (A) mostra efeitos imediatos e Fig. (B) descreve efeitos na tarde após o estresse. Grupo Controle (n=16), Estresse (n=16), Antalarmin (Ant.) 0,1mg/kg e.v. (n=10), e Ant. 1µg i.c.v. (n=14). Dados expressos como média ± erro padrão. * indica diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos controle e estresse. § indica diferenças (Fig. 6A P<0,05 às 11:15 e 13h. P<0,001 às 11:30 e 12h. Fig. 6B P<0,05) entre o grupo estresse e os grupos com antalarmin.

4.5. Hormônio Folículo Estimulante

Na figura 7A, observam-se as concentrações plasmáticas de FSH (ng/ml) em coleta seriada até às 1400h. A comparação entre os grupos controle e estresse não revelou diferença significativa para o fator estresse [$F(1,230)=0,0009$ $P=0,976$] nem para o fator tempo [$F(6,230)=1,001$ $P=0,426$], assim como para interação deles [$F(6,230)=1,459$ $P=0,194$]. A comparação com os grupos antalarmin e grupo estresse, a análise estatística mostrou que também não houve diferenças para os fatores antalarmin [$F(2,258)=1,664$ $P=0,204$] e tempo [$F(6,258)=1,445$ $P=0,199$], nem para interação destes fatores [$F(12,258)=1,624$ $P=0,087$].

A figura 7B mostra as concentrações plasmáticas de FSH (ng/ml) em coleta seriada até às 1800h. A comparação entre os grupos controle e estresse revelou diferença significativa para os fatores estresse [$F(1,223)=13,764$ $P<0,001$] e tempo [$F(6,223)=5,339$ $P<0,001$] assim como para interação destes fatores [$F(6,223)=4,890$ $P<0,001$]. O aumento na concentração de FSH no grupo controle às 1700h foi significativo quando comparado com o grupo estresse. A análise entre os grupos com antalarmin e o grupo estresse mostrou diferença significativa para o fator tempo [$F(6,279)=5,003$ $P<0,001$], mas não para fator antalarmin [$F(2,279)=1,335$ $P=0,275$], nem para interação deles [$F(12,279)=1,046$ $P=0,408$]. O pós-teste evidenciou que as concentrações de FSH nos grupos Ant. 0,1 e.v. e Ant. 1 i.c.v. às 1700h foram maiores quando comparadas com o grupo estresse.

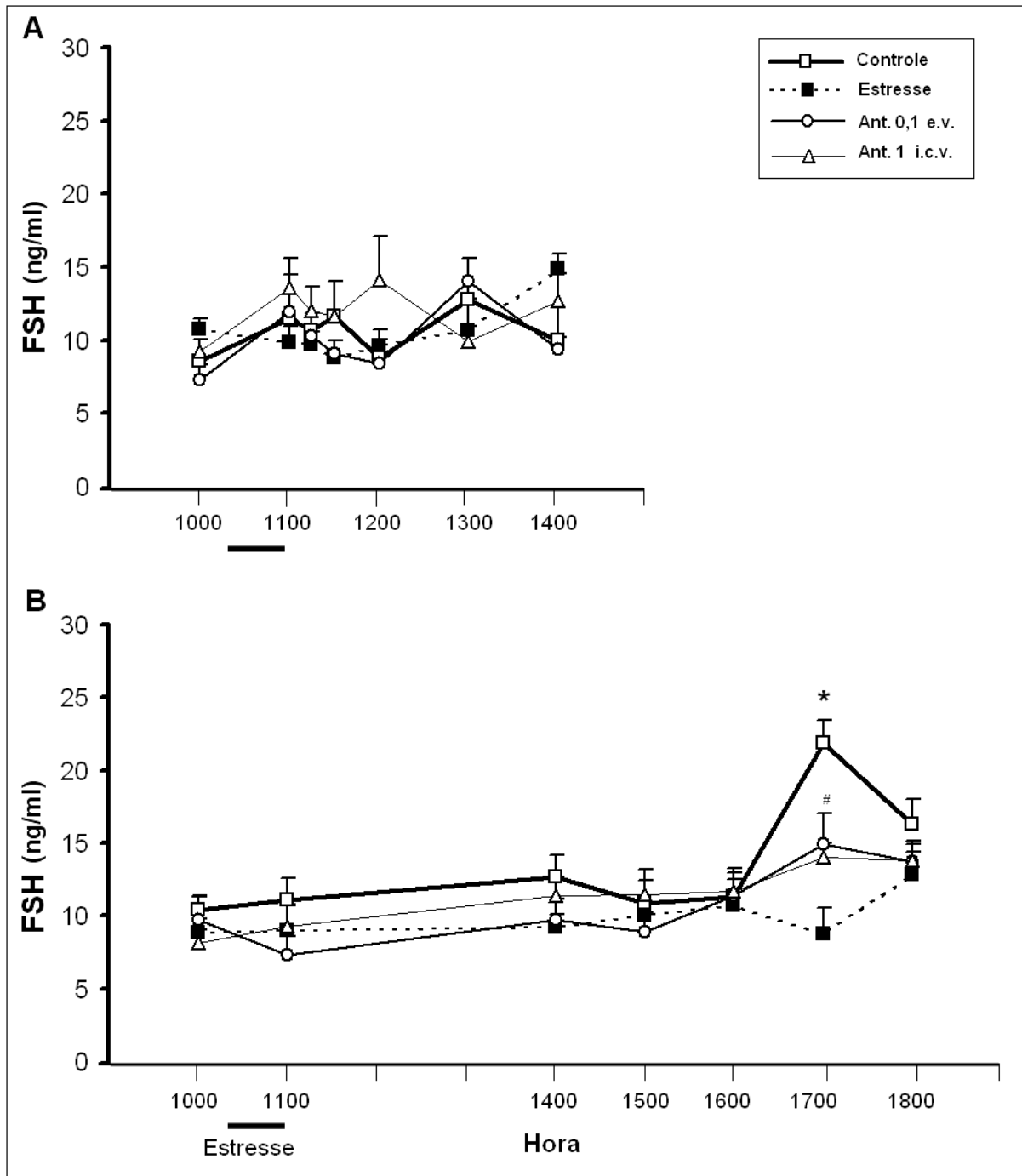


Figura 7. Efeitos do estresse de contenção e antalarmin sobre a secreção de FSH (ng/ml) em ratas tratadas com estrógeno (E₂). Ratas ovariectomizadas tratadas com 10µg de E₂ por três dias, foram submetidas a estresse de contenção por 40 minutos com administração previa de antalarmin ou veículo. Fig. (A) mostra efeitos imediatos e Fig. (B) descreve efeitos na tarde após o estresse. Grupo Controle (n=16), Estresse (n=16), Antalarmin (Ant.) 0,1mg/kg e.v. (n=10), Ant. 1µg i.c.v. (n=14). Dados expressos como média ± erro padrão.* indica diferenças significativas (P<0,001) entre os grupos controle e estresse. # indica diferenças entre os grupos Ant. 0,1 e.v. Ant. 1 i.c.v. e estresse (P<0,05).

5. Discussão

5.1. Corticosterona

O estresse por contenção durante 40 minutos ativou o eixo HPA, como pode ser verificado pela elevação da concentração plasmática de B, seguida pela diminuição gradual e sustentada durante 4 horas. Trabalhos na literatura usando ratas ovariectomizadas com reposição hormonal e submetidas a estresse de contenção mostram concentrações de B basais e pós-estresse semelhantes às obtidas em nossos grupos experimentais (KAM et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2007).

A administração aguda de antalarmin em ratas fêmeas tratadas com estradiol atenuou a resposta do eixo HPA ao estresse, observada na diminuição da secreção de B. O CRH estimula a liberação de ACTH *in vivo* e *in vitro*. Estas ações são bloqueadas pelo antagonista CRH₉₋₄₁ α -helical e também por imunoneutralização com anticorpos policlonais ou monoclonais. Além disso, a administração i.c.v. de CRH estimula o eixo HPA. A prova que o CRH é o principal coordenador na ativação do eixo HPA em resposta ao estresse provem de resultados que mostram a inibição quase total da atividade hipófise-adrenal a uma série de estressores após a administração de antisoro CRH (OWENS; NEMEROFF, 1991).

O CRH age através dos receptores CRH-R₁ e CRH-R₂. Estudos em camundongos *knockout* para CRH-R₁, CRH-R₂ ou para ambos, mostram que a participação na fase aguda da resposta ao estresse é principalmente mediada pelo receptor CRH-R₁. O CRH-R₂ estaria envolvido na delimitação da magnitude desta resposta (SMITH et al., 1998; BALE et al., 2002).

O antagonismo farmacológico do receptor CRH-R₁ inibe *in vitro* e *in vivo* a secreção de ACTH em resposta ao CRH (WEBSTER et al., 1996; SCHULZ et al., 1996). Nossos resultados demonstram que a administração de antalarmin reduziu significativamente, mas

não inibiu completamente a resposta do eixo HPA, ratificando assim o envolvimento dos receptores CRH-R₁ no estresse.

Na literatura, outros pesquisadores mostram efeitos semelhantes. Resultados em roedores avaliando a interação de estresse por contenção (2h por dia por 4 dias) e o consumo de álcool, mostraram que a administração prévia de antalarmin (20mg/kg i.p) diminuiu significativamente a secreção de B (YANG et al., 2008). Tal redução também foi verificada em animais submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado (MYERS et al., 2005). Da mesma maneira, a injeção i.c.v. de antalarmin atenuou o incremento de B induzido pela administração de Neuromedina S (neuropeptídeo que ativa o eixo HPA) (JASZBERENYI et al., 2007). Em modelos experimentais usando primatas não humanos, observou-se que diante o estresse de isolamento ou o paradigma de intrusão, a administração de antalarmin diminuiu a atividade do eixo HPA, avaliada pela concentração de cortisol (HABIB et al., 2000; FRENCH et al., 2007).

Por outro lado, o aumento da concentração de B induzido pela administração de yohimbina (MARINELLI et al., 2007) (antagonista adrenérgico α_2 , usado como estressor farmacológico) ou de lipopolisacarídeo (estresse imunológico), não foi alterado pela injeção prévia de antalarmin (AGELAKI et al., 2002; KOHMAN et al., 2007). A imobilização por 30 minutos após o uso crônico de antalarmin por 1 ou 8 semanas (WONG et al., 1999) não altera as concentrações de B, efeito também observado com a utilização de eletrochoques (BORNSTEIN et al., 1998).

Estas diferenças nos efeitos de antalarmin sobre a secreção de B podem ser devidas à natureza do estímulo estressor aplicado, à dose usada da droga, e especialmente ao tempo de administração de antalarmin. O efeito agudo, mas não crônico pode ser explicado por tolerância farmacológica de antalarmin proposta por Broadbear et al. (2002). Alterações histológicas na glândula adrenal (diminuição na largura adrenocortical e aumento de apoptose

no córtex) depois da administração prolongada de antalarmin afetariam também a secreção de B (BORNSTEIN et al., 1998). Finalmente, é possível que o antagonismo crônico dos receptores CRH-R₁ aumente indiretamente a atividade dos receptores CRH-R₂ na resposta ao estresse. A presença de concentrações menores de ACTH e B em camundongos sem CRH-R₁ e CRH-R₂, comparada com a ausência só de CRH-R₁ ou CRH-R₂, suportaria esta idéia (BALE et al., 2002).

O estresse de imobilização evoca respostas fisiológicas e comportamentais variadas por ativação dos sistemas motor, autonômico e do eixo HPA. Informação proveniente de imunohistoquímica com FOS indica os diversos grupos neuronais envolvidos nesta resposta. Informações provenientes de mecano-nociceptores ativam circuitos medulares curtos envolvidos na ativação do sistema simpático. Os circuitos longos envolvem sinais viscerossensoriais através dos nervos vago e glossofaríngeo que fazem sinapse no núcleo do trato solitário (NTS) e relés em núcleos pontinos ou projetam-se diretamente para estruturas prosencefálicas (hipotálamo, sistema límbico) (PACAK; PALKOVITS, 2001).

A informação somatossensorial proveniente de neurônios de primeira ordem através do corno dorsal da medula espinal propaga-se por vários tratos que alcançam o tronco encefálico (neurônios noradrenérgicos A1, A2, A5, A6 -LC- e A7), tálamo (núcleos da linha média), hipotálamo (especialmente células localizadas na região parvocelular do PVN em sua maioria co-localizadas com neurônios CRH), córtex (somatossensorial) e sistema límbico (núcleo amigdalóide central e medial, córtex piriforme, cingulato e entorrinal) (PACAK; PALKOVITS, 2001).

Há expressão maior de RNAm para CRH-R₁ no encéfalo do que em tecidos periféricos, com destaque para distribuição em neurônios parvocelulares do PVN, em núcleos somatossensoriais do tronco encefálico, na adeno-hipófise e em glândulas adrenais (VAN et al., 2000) locais onde o antagonista antalarmin pode atuar para reduzir a resposta estressora.

Por conseguinte, o efeito atenuador mais intenso de antalarmin e.v. sobre a secreção de B. (Figura 3A) pode ser ao bloqueio mais amplo em estruturas centrais e periféricas, que não teriam sido atingidas pela administração i.c.v.

5.2. Gonadotrofinas

O estresse deflagrou incremento súbito e sustentado durante 3 horas das concentrações plasmáticas de LH, que foi significativamente reduzido pela administração do antagonista CRH-R₁ antalarmin (figura 4A).

Os efeitos do estresse sobre a secreção de LH dependem principalmente do tempo do estresse e da presença ou não de condição hormonal que os facilitem. Assim, o estresse crônico em geral é inibidor sobre o eixo HPG. Porém, os efeitos do estresse agudo não estão totalmente esclarecidos, observando-se respostas inibidoras e facilitadoras dependendo do modelo de estresse utilizado e especialmente da presença de estrógeno (RIVIER; RIVEST, 1991; BRANN; MAHESH, 1991).

No presente modelo de estresse agudo associado à terapia hormonal substitutiva, observamos um aumento rápido, de magnitude grande e de duração significativa na secreção de LH em resposta à contenção por 40 minutos. Estes resultados estão em concordância com trabalhos na literatura. Em ratas estroginizadas a secreção de LH aumentou após o estresse de contenção (BRISKI; SYLVESTER, 1988), efeito também observado em machos submetidos à contenção, à inalação de éter ou à hemorragia (KRULICH et al., 1974). O estresse imunológico em macacas estroginizadas estimulou significativamente a secreção de LH (XIAO et al., 1994). Em mulheres menopausadas que receberam reposição estrogênica, a administração de endotoxina desencadeou um aumento significativo na secreção de LH (PUDEER et al., 2000).

Existem pelo menos dois mecanismos não excludentes, plausíveis para explicar este incremento de LH. O primeiro enfoca-se na importância da atividade do sistema

noradrenérgico na resposta ao estresse. Barraclough e Sawyer (1957) observaram que antagonistas α -adrenérgicos bloqueavam a ovulação em coelhas. Desde então, a ação da NA como reguladora da secreção de LH tem sido estudada. Os mecanismos pelos quais a NA altera a secreção de LH envolvem possíveis ações diretas e/ou indiretas em neurônios GnRH (DOBSON et al., 2003). Neurônios GnRH estão distribuídos no *continuum* septal-preóptico-hipotalâmico, nas proximidades dos quais encontram-se fibras noradrenérgicas (HERBISON, 1997), que se originam essencialmente nos grupos celulares A₁ e A₂ (WRIGHT; JENNES, 1993).

Estudos com neurônios GnRH *in vitro* revelaram a existência de duas populações de células que respondem diferentemente à infusão micromolar de NA. Uma é excitada (pelo envolvimento de receptores α_1) e a outra inibida (pelo envolvimento receptores β) pela NA, mas a excitabilidade acontece somente na presença de estrógeno (TALEISNIK; SAWYER, 1986; CONDON; RONNEKLEIV; KELLY, 1989). Assim, o estrógeno possivelmente aumenta a afinidade dos receptores α_1 de neurônios GnRH à NA para aumentar a secreção de LH durante estresse agudo (ETGEN; UNGAR; PETITTI, 1992).

O segundo mecanismo envolve a ação de progesterona na liberação de LH. A progesterona parece participar da resposta do eixo HPG ao estresse, uma vez que em mulheres, a ativação do eixo HPA pelo ACTH ou a aplicação de estresse inflamatório por endotoxina causa aumento de sua secreção (JUDD et al., 1992; PUDER et al., 2000). A participação da progesterona na secreção de LH em resposta ao estresse é reforçada pelos trabalhos de Xiao (XIAO et al., 1994; XIAO et al., 1996). Eles mostraram que o aumento da liberação de LH causado pela administração de IL-1 α (estresse imune), acompanhado por aumento significativo das concentrações de progesterona, foi bloqueado por RU-486, um antagonista de progesterona.

Qual seria a relação de antalarmin com esses mecanismos para reduzir o pico de secreção de LH induzido pelo estresse?. O LC constituído em quase sua totalidade por corpos celulares noradrenérgicos (FOOTE; BLOOM; STON-JONES, 1983) representa a principal fonte de NA do cérebro (SAWCHENKO; SWANSON, 1981), é altamente responsivo ao estresse (CONTI et al., 1997), exerce ação importante no pico de secreção de LH (ANSELMO-FRANCI et al., 1997), e tem conexões excitatórias recíprocas com o PVN (STRATAKIS; CHROUSOS, 1995). Por outro lado, a injeção de NA no hipotálamo libera CRH (CALOGERO et al., 1988), o antagonismo com CRH₉₋₄₁ α -helical previne a ativação do LC (VALENTINO; PAGE; CURTIS, 1991) e existem receptores CRH-R₁ no LC (SAUVAGE; STECKLER, 2001). Assim, é possível que antalarmin ao bloquear os receptores CRH-R₁ no LC atenua a cascata de eventos para incrementar a secreção de LH, como observou-se em nossos experimentos. Esta possibilidade é reforçada por trabalho recente (REYES; VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2008), no qual o incremento da internalização dos receptores CRH no LC causado pelo estresse de nado forçado foi atenuado pelo tratamento prévio com antalarmin. Essa internalização é um mecanismo importante para regular a sensibilidade do sistema noradrenérgico-LC a outros estressores.

Não se pode descartar também o efeito do antagonista de CRH-R₁ exercido na secreção de progesterona, que tem ação estimuladora da secreção de LH no estresse, como descrito anteriormente.

A elevação significativa da secreção de LH entre 15 e 17 horas nas ratas ovariectomizadas e estrogenizadas (Fig 4B) não ocorreu em ratas nas mesmas condições, que foram submetidas ao estresse. No entanto às 18 horas ocorreu uma inversão, o primeiro grupo apresenta uma diminuição significativa enquanto o grupo submetido ao estresse apresenta uma elevação significativa da concentração de LH. Outros autores mostraram que o pico de secreção de LH em ratas ovariectomizadas com terapia hormonal substitutiva (KAM et al.,

2000) ou em proestro (ROOZENDAAL et al., 1995) pode ser abolido por estresse de contenção durante 5 a 11h, e também estressores agudos aplicados em ovelhas atrasam e até abolem o pico de secreção de LH (DOBSON et al., 2003). Nossos dados indicam que o estresse pode não estar abolindo o pico de secreção de LH induzido por estrógeno, mas sim retardando sua ocorrência. A conclusão de que houve abolição do pico ao invés de retardo pode atribuída à janela de tempo em que se realizou o protocolo experimental, em nosso caso estendida até horas.

Tanto o CRH quanto os glicocorticóides tem sido envolvidos na inibição da secreção de LH pelo estresse. A injeção i.c.v. de CRH inibe a liberação de LH em ratas ovariectomizadas (RIVIER; VALE, 1984) e estudos *in vitro* descrevem ação inibidora de CRH sobre neurônios GnRH de maneira dose dependente (GAMBACCIANI; YEN; RASMUSSEN, 1986). Por outro lado, a administração do antagonista de CRH₉₋₄₁ α -helical em machos submetidos a eletrochoques, reverte a ação inibidora do estresse sobre LH (RIVIER; RIVIER; VALE, 1986). Existem conexões sinápticas diretas de neurônios CRH em neurônios GnRH, na área pré-óptica medial (MACLUSKY; NAFTOLIN; LERANTH, 1988; DUDAS; MERCHENTHALER, 2002), para exercer um ação inibidora do CRH sobre o GnRH (RIVEST; PLOTSKY; RIVIER, 1993). Nossos resultados mostraram que o efeito do estresse sobre a secreção de LH (aumentada entre 11 e 14h e às 18h, Fig 4B) foi bloqueado por antalarmin, entre 11 e 14 horas, independente da via de administração e às 18h quando utilizada a via i.c.v. A administração por via e.v. reduziu significativamente, mas não aboliu completamente o efeito do estresse, indicando que a resposta poderia ser em parte devida a outros mecanismos, talvez envolvendo receptores CRH-R₂ (que não foram bloqueados).

Esta possível dualidade de ações dos receptores CRH sobre a secreção de LH indicada neste trabalho também foi reportada por LI et al. (2006), que analisaram a pulsatilidade da secreção de LH em ratas ovariectomizadas com reposição hormonal, submetidas a estresse

agudo (hipoglicemia, imune ou contenção) com administração prévia de antagonistas específicos para CRH-R₁ e para CRH-R₂. Estes autores verificaram que qualquer estresse diminuiu a pulsatilidade de LH porém, somente o antagonista CHR-R₂ reverteu este efeito nos três tipos de estresse, enquanto o antagonista CRH-R₁ agiu somente no estresse de contenção, causando redução de efeitos. Portanto, os resultados demonstram que o aumento imediato de secreção de LH em resposta ao estresse (verificado a partir das 11h) seria mediado pelos receptores CRH-R₁, enquanto o retardo no pico de LH (para as 18h) provavelmente seria mediado em parte pelos receptores CRH-R₁, em parte pelos receptores CRH-R₂.

Não se pode descartar que o efeito inibidor do estresse sobre a secreção de LH seja mediado também por outros fatores além do CRH. Em camundongos deficientes em CRH, ocorreu inibição do pico de LH em resposta ao estresse, indicando a participação de outros mediadores, que talvez sejam as citocinas, AVP, opióides endógenos (JEONG et al., 1999) ou GABA (MITCHELL et al., 2005). Efeito inibidor direto dos glicocorticóides - diminuindo a resposta da adenohipófise pelo GnRH (BREEN; KARSCH, 2004)- tem sido demonstrado em ratos (MCGIVERN; REDEI, 1994), e em mulheres injetadas com hidrocortisona (SAKETOS; SHARMA; SANTORO, 1993). A prolactina no SNC também possui ações indiretas (incrementando CRH, catecolaminas ou opióides) (KOOY et al., 1990; CALOGERO et al., 1994) e diretas inibindo a secreção de LH (GRATTAN et al., 2007).

Como pode ser visto na figura 7A, as concentrações plasmáticas de FSH não mudaram em nenhum dos grupos estudados entre 11 e 14 horas. Trabalhos utilizando ratos (fêmeas e machos) submetidos a diferentes tipos de paradigmas de estresse, mostraram incremento (KRULICH et al., 1974; TACHE et al., 1978), diminuição (RUISSEAU et al., 1978) ou na maioria dos casos, não alteração das concentrações plasmáticas de FSH em resposta ao estresse (TURPEN; JOHNSON; DUNN, 1976; DU et al., 1979).

Nossos resultados mostram que a secreção de LH foi alterada significativamente pelo estressor, enquanto a secreção de FSH permaneceu inalterada, o que evidencia uma dissociação no controle da secreção de gonadotrofinas, provavelmente por alteração na retroalimentação pelos estrógenos (RAMIREZ; SAWYER, 1974) e/ou por envolvimento de fato diferenciado de controle para FSH (MCCANN et al., 1983). Existem resultados demonstrando que tanto o LH e o FSH respondem aos mesmos estímulos, porém a magnitude de respostas varia, devido a sensibilidade menor da secreção FSH ao GnRH (KRULICH et al., 1974). Ação prolongada do GnRH seria requerida para a secreção de FSH, enquanto um breve pulso é suficiente para estimular a secreção de LH (LIBERTUN; ORIAS; MCCANN, 1974).

Por outro lado, o pico de secreção de FSH induzido pelo estrógeno, observado à tarde, por volta das 17 horas (figura 7B) foi inibido pelo estresse. Esta resposta foi revertida parcialmente por antalarmin. Esta inibição pelo estresse também aconteceu com a secreção de LH, indicando que neste caso os mecanismos de inibição poderiam ser compartilhados. Injeções de CRH em doses de 5 e 10µg i.c.v. a ratas em proestro inibem significativamente a secreção de FSH e LH, mostrando o envolvimento do CRH na ação inibidora (ROOZENDAAL et al., 1996).

Como observado na figura 7B, as doses de 0,1mg/kg e.v. e 1µg i.c.v. de antalarmin atenuaram parcialmente o efeito inibidor do estresse sobre o pico de FSH. Estes resultados estão em concordância com os efeitos já analisados previamente do antagonista CHR-R₁ sobre a inibição do pico de LH. Assim, os receptores CRH-R₂ poderiam estar mais envolvidos na resposta inibidora do CRH sobre a secreção de gonadotrofinas (LI et al., 2006).

5.3. Prolactina

As concentrações de prolactina imediatamente após o estresse de imobilização não foram alteradas (figura 5). A secreção de prolactina é muito susceptível à situação de estresse. Estímulos isolados de curta duração desencadeiam uma resposta secretora instantânea e as

concentrações plasmáticas podem aumentar entre 4 a 5 vezes em 2 minutos e em média podem chegar até 250% dos valores basais. Esta resposta é de curta duração e as concentrações retornam aos valores basais dentro de 30 minutos ou menos (KRULICH et al., 1974; TURPEN; JOHNSON; DUNN, 1976; POLETINI et al., 2006). Tal resposta não pode ser verificada neste modelo experimental, pois as coletas de sangue ocorreram após o término dos 40 minutos do estresse por contenção, quando pela descrição da literatura as concentrações plasmáticas já teriam retornado a valores basais.

A concentração plasmática de prolactina aumentou em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, na tarde do dia do experimento, a partir de 13 horas e manteve-se elevada até 18 horas. Há na literatura descrição do aumento da secreção de prolactina na tarde de proestro, dependente do estrógeno liberado durante o desenvolvimento folicular, assim como em ratas ovariectomizadas submetidas à reposição com estrógeno, modelo que utilizamos (CHEN; MEITES, 1970). Varias regiões do sistema nervoso central estão envolvidas na regulação do pico de prolactina induzido por estrógeno, entre as quais destacam-se, o LC (POLETINI et al., 2004), núcleo supraquiasmático (PALM et al., 2001), núcleos hipotalâmicos ventromedial e dorsomedial, amígdala corticomedial (PETERS; GALA, 1980), e especialmente a área pré-óptica medial, onde a injeção de estrógeno mantém a secreção elevada de prolactina (PAN; GALA, 1985)

O estresse retardou o efeito estimulador do estrógeno sobre a secreção de prolactina e este efeito foi revertido pela administração e.v. de antalarmin. Este atraso pode ser devido a um aumento da atividade dopaminérgica e/ou incremento na secreção de B. A adrenalectomia aumenta a liberação de prolactina em resposta ao estresse, enquanto a reposição com corticóides atenua essa liberação (YELVINGTON; WEISS; RATNER, 1984). A injeção de pimozide, antagonista dopaminérgico, incrementa a secreção de prolactina e impede completamente a diminuição induzida pelo estresse de contenção (GALA; HAISENLEDER,

1986). Kam et al. (2000), mostraram que o tratamento com estrógeno reduz o RNAm para receptores dopaminérgicos D₂ na adeno-hipófise de ratas ovariectomizadas e essa resposta é revertida pelo estresse. Este conjunto de resultados sugere que o incremento na secreção de dopamina poderia mediar o atraso da secreção de prolactina induzida pelo estresse (MOREHEAD; LOOKINGLAND; GALA, 1990).

Existem dados mostrando envolvimento dos receptores CRH-R₁ no sistema dopaminérgico. O aumento de expressão dos receptores dopaminérgicos D₂ e D₃, no núcleo acumbens de ratos, causado pelo estresse por isolamento social, foi bloqueado pelo tratamento prévio com antalarmin por 10 dias (DJOUMA et al., 2006). Assim, o tratamento com este antagonista preveniu o incremento destes receptores causado pelo isolamento social. Da mesma maneira, usando administração crônica de antalarmin em modelos de abuso de substâncias, observaram *up-regulation* na expressão dos receptores D₂ e aumento do RNAm para tiroxina hidroxilase (enzima chave na síntese de dopamina) na substância negra (pars compacta) e na área tegmental ventral, assim como diminuição das terminais sinápticas nos gânglios da base e complexo amigdalóide (LAWRENCE et al., 2005). Os nossos resultados sustentam por primeira vez a possibilidade de que em situações de estresse o receptor CRH-R₁ tenha um efeito no retardo do pico de prolactina induzido por estrógeno.

Como observa-se na figura 5, as concentrações plasmáticas de prolactina no grupo que recebeu antalarmin i.c.v. em dose referida na literatura (ZORRILLA et al., 2002a) foram menores do que o grupo que recebeu antalarmin e.v. Isto indica que os receptores CRH-R₁ centrais exercem um efeito inibidor maior sobre a prolactina que os expressos fora da barreira hematoencefálica.

5.4. Progesterona

Em ratas ovariectomizadas não submetidas ao estresse observamos um pico de secreção de progesterona às 11 horas (Figura 6). Houve aumento significativo dessa secreção quando

as ratas foram submetidas ao estresse e essa resposta foi revertida pela administração previa de antalarmin.

A progesterona tem ação indispensável no processo reprodutivo. Suas ações inibidoras (usada como contraceptivo) e facilitadoras (usada no tratamento para infertilidade) geram conflitos e mal-entendidos na literatura científica (ZALANYI, 2001). No entanto, parece haver concordância sobre os efeitos do estresse na secreção desse hormônio. Trabalhos em animais e humanos mostram claramente incremento das concentrações plasmáticas com diferentes tipos de estresses, como observado também em nossos resultados com estresse por contenção. Por exemplo, a secreção de progesterona aumenta em mulheres, após estresse inflamatório por endotoxina (XIAO et al., 1994), ou em ratos machos expostos à contenção (JAROENPORN et al., 2007), ao estresse metabólico (ELMAN; BREIER, 1997), à privação de sono ou eletrochoques (ANDERSEN et al., 2004) ou em ratas fêmeas em proestro expostas a inalação de éter (DEIS; LEGUIZAMON; JAHN, 1989).

Há concordância também que a adrenal seja a origem principal da progesterona secretada em resposta ao estresse, via ativação eixo HPA e estimulação do córtice adrenal pelo ACTH (HOLZBAUER; NEWPORT, 1967; FEDER; RUF, 1969; RESKO, 1969; ANDERSEN et al., 2004).

Em suma, o pico de secreção de progesterona que observamos por volta de 11 horas é de origem adrenal, não foi alterado por antalarmin, indicando que o envolvimento do CRH neste caso não estaria envolvendo receptores CRH-R₁. O estresse amplifica o pico de secreção de progesterona e esta amplificação sim, seria mediada por ação de CRH em receptores CRH-R₁.

5.5. Conclusões

O estresse por imobilização ativou o eixo HPA e esta resposta foi reduzida por antalarmin. Houve aumento imediato com antecipação do pico de secreção de LH e esta alteração foi revertida na maior parte por antalarmin. O incremento e retardo do pico de secreção de prolactina provocados pelo estresse foram revertidos pelo antagonista CRH-R₁. Assim, este trabalho mostrou que alterações induzidas por estresse de contenção no eixo HPA, no eixo HPG e no sistema de controle da secreção de prolactina, podem ser pelo menos em parte mediadas por ações de CRH em receptores CRH-R₁.

5.6. Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho sobre a interação dos eixos HPA e HPG em condições de estresse, particularmente os efeitos da atenuação do aumento da secreção de B, prolactina e LH à contenção animal observados pela administração de antalarmin, incentiva o estudo dos possíveis locais onde o antagonismo estaria ocorrendo, as vias usadas, a neuromodulação envolvida, e descobrir a participação de outros receptores além dos CHR-R₁.

6. Referências Bibliográficas

1. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 2002; 70 (11): 6068-6074.
2. Akema T, Chiba A, Oshida M, Kimura F, Toyoda J. Permissive role of corticotropin-releasing factor in the acute stress-induced prolactin release in female rats. *Neurosci Lett* 1995; 198 (2): 146-148.
3. Almeida OF, Nikolarakis KE, Herz A. Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 1988; 122 (3): 1034-1041.
4. Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37 (6): 791-797.
5. Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res* 1997; 767 (2): 289-296.
6. Anselmo-Franci JA, Rocha-Barros VM, Franci CR, McCann SM. Locus ceruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Brain Res* 1999; 833 (1): 86-92.
7. Armario A, Restrepo C, Hidalgo J, Lopez-Calderon A. Differences in prolactin and LH responses to acute stress between peripuberal and adult male rats. *J Endocrinol* 1987; 112 (1): 9-13.
8. Assenmacher I, Barbanel G, Gaillet S, Givalois L, Ixart G, Malaval F, et al. Central regulation of ACTH release in stress. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771 41-54.
9. Ayala AR, Pushkas J, Higley JD, Ronsaville D, Gold PW, Chrousos GP, et al. Behavioral, adrenal, and sympathetic responses to long-term administration of an oral corticotropin-releasing hormone receptor antagonist in a primate stress paradigm. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (11): 5729-5737.
10. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress

response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci* 2002; 22 (1): 193-199.

11. Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med* 2008; 358 (1): 55-68.
12. Bornstein SR, Webster EL, Torpy DJ, Richman SJ, Mitsiades N, Igel M, et al. Chronic effects of a nonpeptide corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist on pituitary-adrenal function, body weight, and metabolic regulation. *Endocrinology* 1998; 139 (4): 1546-1555.
13. Brann DW, Mahesh VB. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB J* 1991; 5 (12): 2691-2698.
14. Breen KM, Karsch FJ. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? *Endocrinology* 2004; 145 (2): 692-698.
15. Briski KP, Sylvester PW. Effect of specific acute stressors on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-treated female rats. *Neuroendocrinology* 1988; 47 (3): 194-202.
16. Broadbear JH, Winger G, Rice KC, Woods JH. Antalarmin, a putative CRH-RI antagonist, has transient reinforcing effects in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 164 (3): 268-276.
17. Calogero AE. Neurotransmitter regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neuron. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771 31-40.
18. Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW. Catecholamine effects upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *J Clin Invest* 1988; 82 (3): 839-846.
19. Calogero AE, Weber RF, Raiti F, Burrello N, Moncada ML, Mongioi A, et al. Involvement of corticotropin-releasing hormone and endogenous opioid peptides in prolactin-suppressed gonadotropin-releasing hormone release in vitro. *Neuroendocrinology* 1994; 60 (3): 291-296.
20. Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, et al. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2005; 174 (12): 7665-7675.

21. Chen CL, Meites J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1970; 86 (3): 503-505.
22. Chen YL, Mansbach RS, Winter SM, Brooks E, Collins J, Corman ML, et al. Synthesis and oral efficacy of a 4-(butylethylamino)pyrrolo[2,3-d]pyrimidine: a centrally active corticotropin-releasing factor1 receptor antagonist. *J Med Chem* 1997; 40 (11): 1749-1754.
23. Christian JJ. Population density and reproductive efficiency. *Biol Reprod* 1971; 4 (3): 248-294.
24. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992; 267 (9): 1244-1252.
25. Condon TP, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Estrogen modulation of the alpha-1-adrenergic response of hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 1989; 50 (1): 51-58.
26. Conti LH, Youngblood KL, Printz MP, Foote SL. Locus coeruleus electrophysiological activity and responsivity to corticotropin-releasing factor in inbred hypertensive and normotensive rats. *Brain Res* 1997; 774 (1-2): 27-34.
27. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6 (6): 463-475.
28. Deak T, Nguyen KT, Ehrlich AL, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF, et al. The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology* 1999; 140 (1): 79-86.
29. Deis RP, Leguizamon E, Jahn GA. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *J Endocrinol* 1989; 120 (1): 37-43.
30. Djouma E, Card K, Lodge DJ, Lawrence AJ. The CRF1 receptor antagonist, antalarmin, reverses isolation-induced up-regulation of dopamine D2 receptors in the amygdala and nucleus accumbens of fawn-hooded rats. *Eur J Neurosci* 2006; 23 (12): 3319-3327.
31. Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 2003; 125 (2): 151-163.
32. Du RP, Tache Y, Brazeau P, Collu R. Effects of chronic immobilization stress on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels, and on pituitary

- responsiveness to LHRH and TRH in female rats. *Neuroendocrinology* 1979; 29 (2): 90-99.
33. Dudas B, Merchenthaler I. Close juxtapositions between luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons and corticotropin-releasing factor-immunoreactive axons in the human diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (12): 5778-5784.
 34. Elman I, Breier A. Effects of acute metabolic stress on plasma progesterone and testosterone in male subjects: relationship to pituitary-adrenocortical axis activation. *Life Sci* 1997; 61 (17): 1705-1712.
 35. Etgen AM, Ungar S, Petitti N. Estradiol and Progesterone Modulation of Norepinephrine Neurotransmission: Implications for the Regulation of Female Reproductive Behavior. *Journal of Neuroendocrinology* 1992; 4 (3): 255-271.
 36. Feder HH, Ruf KB. Stimulation of progesterone release and estrous behavior by ACTH in ovariectomized rodents. *Endocrinology* 1969; 84 (1): 171-174.
 37. Figueiredo HF, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Herman JP. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292 (4): E1173-E1182.
 38. Foote SL, Bloom FE, Ston-Jones G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 1983; 63 (3): 844-914.
 39. Franci CR. Estresse: Processos Adaptativos e Não-adaptativos. In: Antunes-Rodrigues (Eds.). *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Brasil: Goonabara Koogan; 2005. Cap. 15, p. 211-223.
 40. Franci JA, Antunes-Rodrigues J. Effect of locus ceruleus lesion on luteinizing hormone secretion under different experimental conditions. *Neuroendocrinology* 1985; 41 (1): 44-51.
 41. French JA, Fite JE, Jensen H, Oparowski K, Rukstalis MR, Fix H, et al. Treatment with CRH-1 antagonist antalarmin reduces behavioral and endocrine responses to social stressors in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Am J Primatol* 2007;
 42. Funk CK, Zorrilla EP, Lee MJ, Rice KC, Koob GF. Corticotropin-Releasing Factor 1 Antagonists Selectively Reduce Ethanol Self-Administration in Ethanol-Dependent Rats. *Biol Psychiatry* 2006;

43. Gala RR, Haisenleder DJ. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats. Influence of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. *Neuroendocrinology* 1986; 43 (2): 115-123.
44. Gambacciani M, Yen SS, Rasmussen DD. GnRH release from the mediobasal hypothalamus: in vitro inhibition by corticotropin-releasing factor. *Neuroendocrinology* 1986; 43 (4): 533-536.
45. Gilligan PJ, Baldauf C, Cocuzza A, Chidester D, Zaczek R, Fitzgerald LW, et al. The discovery of 4-(3-pentylamino)-2,7-dimethyl-8-(2-methyl-4-methoxyphenyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine: a corticotropin-releasing factor (hCRF1) antagonist. *Bioorg Med Chem* 2000; 8 (1): 181-189.
46. Goldstein DS. Catecholamines and stress. *Endocr Regul* 2003; 37 (2): 69-80.
47. Grattan DR, Jasoni CL, Liu X, Anderson GM, Herbison AE. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology* 2007; 148 (9): 4344-4351.
48. Greenwood-Van MB, Johnson AC, Cochrane S, Schulkin J, Myers DA. Corticotropin-releasing factor 1 receptor-mediated mechanisms inhibit colonic hypersensitivity in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17 (3): 415-422.
49. Habib KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S, et al. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (11): 6079-6084.
50. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 1974; 36 (3): 391-392.
51. He L, Gilligan PJ, Zaczek R, Fitzgerald LW, McElroy J, Shen HS, et al. 4-(1,3-Dimethoxyprop-2-ylamino)-2,7-dimethyl-8-(2,4-dichlorophenyl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine: a potent, orally bioavailable CRF(1) receptor antagonist. *J Med Chem* 2000; 43 (3): 449-456.
52. Helena CV, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Res* 2002; 955 (1-2): 245-252.
53. Herbison AE. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod* 1997; 2 (1): 1-6.

54. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 1997; 20 (2): 78-84.
55. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 2006; 27 (3): 260-286.
56. Holzbauer M, Newport HM. The effect of stress on the concentration of 3beta-hydroxypregn-5-en-20-one (pregnenolone) and pregn-4-ene-3,20-dione (progesterone) in the adrenal gland of the rat. *J Physiol* 1967; 193 (1): 131-140.
57. Jaroenporn S, Nagaoka K, Kasahara C, Ohta R, Watanabe G, Taya K. Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. *Endocr J* 2007; 54 (5): 703-711.
58. Jaszberenyi M, Bagosi Z, Thurzo B, Foldesi I, Telegdy G. Endocrine and behavioral effects of neuromedin S. *Horm Behav* 2007; 52 (5): 631-639.
59. Jeong KH, Jacobson L, Widmaier EP, Majzoub JA. Normal suppression of the reproductive axis following stress in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology* 1999; 140 (4): 1702-1708.
60. Judd S, Terry A, Petrucco M, White G. The source of pulsatile secretion of progesterone during the human follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74 (2): 299-305.
61. Jutkiewicz EM, Wood SK, Houshyar H, Hsin LW, Rice KC, Woods JH. The effects of CRF antagonists, antalarmin, CP154,526, LWH234, and R121919, in the forced swim test and on swim-induced increases in adrenocorticotropin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 180 (2): 215-223.
62. Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Mastorakos G, Chrousos GP. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997 129-135.
63. Kam, K., Park, Y., Cheon, M., Son, G. H., Kim, K., & Ryu, K. (2000). Effects of immobilization stress on estrogen-induced surges of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrine*. 12[3], 279-287.
64. Kohman RA, Tarr AJ, Sparkman NL, Day CE, Paquet A, Akkaraju GR, et al. Alleviation of the effects of endotoxin exposure on behavior and hippocampal IL-1beta by a selective non-peptide antagonist of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 2007; 21 (6): 824-835.

65. Kooy A, de Greef WJ, Vreeburg JT, Hackeng WH, Ooms MP, Lamberts SW, et al. Evidence for the involvement of corticotropin-releasing factor in the inhibition of gonadotropin release induced by hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology* 1990; 51 (3): 261-266.
66. Krulich L, Hefco E, Illner P, Read CB. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* 1974; 16 (5-6): 293-311.
67. Lawrence AJ, Parish CL, Chen F, Lodge DJ, Krstew EV, Card K, et al. Chronic corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonism with antalarmin regulates the dopaminergic system of Fawn-Hooded rats. *J Neurochem* 2005; 94 (6): 1523-1534.
68. Leiko LK, Castro M. Controle Neuroendócrino do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. In: Antunes-Rodrigues (Eds.). *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Brasil: Goonabara Koogan; 2005. Cap. 13, p. 171-191.
69. 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 luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2006; 18 (8): 602-610.
70. Libertun C, Orias R, McCann SM. Biphasic effect of estrogen on the sensitivity of the pituitary to luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Endocrinology* 1974; 94 (4): 1094-1100.
71. MacLusky NJ, Naftolin F, Leranth C. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res* 1988; 439 (1-2): 391-395.
72. Marinelli PW, Funk D, Juzysch W, Harding S, Rice KC, Shaham Y, et al. The CRF1 receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 195 (3): 345-355.
73. McCann SM, Antunes-Rodrigues J, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Karanth S, Rettori V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33 (10): 1121-1131.
74. McCann SM, Mizunuma H, Samson WK, Lumpkin MD. Differential hypothalamic control of FSH secretion: a review. *Psychoneuroendocrinology* 1983; 8 (3): 299-308.

75. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 1993; 153 (18): 2093-2101.
76. McGivern RF, Redei E. Adrenalectomy reverses stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in long-term ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1994; 55 (6): 1147-1150.
77. 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 (1): 323-331.
78. Morehead MH, Lookingland KJ, Gala RR. Stress-induced suppression of the prolactin afternoon surge in ovariectomized, estrogen-treated rats and the nocturnal surge in pseudopregnant rats are accompanied by an increase in median eminence dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *Neuroendocrinology* 1990; 51 (2): 208-212.
79. Myers DA, Gibson M, Schulkin J, Greenwood Van-Meerveld B. Corticosterone implants to the amygdala and type 1 CRH receptor regulation: effects on behavior and colonic sensitivity. *Behav Brain Res* 2005; 161 (1): 39-44.
80. Newsletter of the IIT Research Institute - Life Sciences Group. (2005). Tox Battery Prepares Antalarmin for Clin Trials. www.iitri.org/Newsletters/NL-Spring-05-1.shtml.
81. Olschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1982; 35 (4): 305-308.
82. Owens MJ, Nemeroff CB. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 1991; 43 (4): 425-473.
83. Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001; 22 (4): 502-548.
84. Palm IF, van der Beek EM, Swarts HJ, van d, V, Wiegant VM, Buijs RM, et al. Control of the estradiol-induced prolactin surge by the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 2001; 142 (6): 2296-2302.
85. Pan JT, Gala RR. Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge. II. Implantation studies. *Endocrinology* 1985; 117 (1): 388-395.

86. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain and Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press., 1997.
87. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885 312-328.
88. Peters JA, Gala RR. Temporal and anatomical considerations involved in the effects of amygdaloid lesions on prolactin secretion in ovariectomized estrogenized rats. *Brain Res* 1980; 187 (2): 257-269.
89. Plotsky PM. Pathways to the Secretion of Adrenocorticotropin: A View from the Portal*. *Journal of Neuroendocrinology* 1991; 3 (1): 1-9.
90. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Ovarian steroids but not the locus coeruleus regulate stress-induced prolactin secretion in female rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18 (12): 938-948.
91. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Role of the locus coeruleus in the prolactin secretion of female rats. *Brain Res Bull* 2004; 63 (4): 331-338.
92. Poletini MO, Szawka RE, Freitas Marcon RM, Veiga MD, Franci CR, Anselmo-Franci JA. A method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003; 12 (1): 41-48.
93. Puder JJ, Freda PU, Goland RS, Ferin M, Wardlaw SL. Stimulatory effects of stress on gonadotropin secretion in estrogen-treated women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (6): 2184-2188.
94. Ramirez VD, SAWYER CH. Differential dynamic responses of plasma LH and FSH to ovariectomy and to a single injection of estrogen in the rat. *Endocrinology* 1974; 94 (4): 987-993.
95. Resko JA. Endocrine control of adrenal progesterone secretion in the ovariectomized rat. *Science* 1969; 164 (875): 70-71.
96. Reyes BA, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology* 2008; 149 (1): 122-130.
97. 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* 1993; 57 (2): 236-246.

98. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* 1991; 45 (4): 523-532.
99. Rivier C, Rivier J, Vale W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 1986; 231 (4738): 607-609.
100. Rivier C, Vale W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* 1984; 114 (3): 914-921.
101. Rocha AA, Guerra-Sa R, Silveira NA, Anselmo-Franci JA, Franci CR. Neuropeptide Y in the medial basal hypothalamus and medial preoptic area during the induction of LH surge may be controlled by locus coeruleus. *Neuropeptides* 2006; 40 (1): 57-63.
102. Roozendaal MM, Swarts HJ, Wiegant VM, Mattheij JA. Effect of restraint stress on the preovulatory luteinizing hormone profile and ovulation in the rat. *Eur J Endocrinol* 1995; 133 (3): 347-353.
103. Roozendaal MM, Swarts JJ, Wolbers WB, Threels A, Wiegant VM, Mattheij JA. Effect of CRH on the preovulatory LH and FSH surge in the cyclic rat: a role for arginine vasopressin? *J Neuroendocrinol* 1996; 8 (10): 765-770.
104. Ruisseau PD, Tache Y, Brazeau P, Collu R. Pattern of adenohipophyseal hormone changes induced by various stressors in female and male rats. *Neuroendocrinology* 1978; 27 (5-6): 257-271.
105. Saavedra JM, Armando I, Bregonzio C, Juorio A, Macova M, Pavel J, et al. A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1 receptor and benzodiazepine binding. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31 (6): 1123-1134.
106. Saketos M, Sharma N, Santoro NF. Suppression of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normal women by glucocorticoids. *Biol Reprod* 1993; 49 (6): 1270-1276.
107. Sauvage M, Steckler T. Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei--potential implication for arousal and attention. *Neuroscience* 2001; 104 (3): 643-652.
108. Sawchenko PE, Swanson LW. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science* 1981; 214 (4521): 685-687.

109. Schulz DW, Mansbach RS, Sprouse J, Braselton JP, Collins J, Corman M, et al. CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (19): 10477-10482.
110. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1950; 1 (4667): 1383-1392.
111. Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 1976; 115 (1): 53-56.
112. Seymour PA, Schmidt AW, Schulz DW. The pharmacology of CP-154,526, a non-peptide antagonist of the CRH1 receptor: a review. *CNS Drug Rev* 2003; 9 (1): 57-96.
113. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 1998; 20 (6): 1093-1102.
114. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771 1-18.
115. Tache Y, Du RP, Ducharme JR, Collu R. Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* 1978; 26 (4): 208-219.
116. Taleisnik S, SAWYER CH. Activation of the CNS noradrenergic system may inhibit as well as facilitate pituitary luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology* 1986; 44 (2): 265-268.
117. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev Reprod* 2000; 5 (2): 105-113.
118. Turpen C, Johnson DC, Dunn JD. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology* 1976; 20 (4): 339-351.
119. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213 (4514): 1394-1397.
120. Valentino RJ. Corticotropin-releasing factor: putative neurotransmitter in the noradrenergic nucleus locus ceruleus. *Psychopharmacol Bull* 1989; 25 (3): 306-311.

121. Valentino RJ, Page ME, Curtis AL. Activation of noradrenergic locus coeruleus neurons by hemodynamic stress is due to local release of corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 1991; 555 (1): 25-34.
122. Van PK, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 2000; 428 (2): 191-212.
123. Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 1991; 129 (5): 2503-2511.
124. Webster EL, Lewis DB, Torpy DJ, Zachman EK, Rice KC, Chrousos GP. In vivo and in vitro characterization of antalarmin, a nonpeptide corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor antagonist: suppression of pituitary ACTH release and peripheral inflammation. *Endocrinology* 1996; 137 (12): 5747-5750.
125. Weigent DA, Carr DJ, Blalock JE. Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. Common hormones and hormone receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 579 17-27.
126. Wong ML, Webster EL, Spokes H, Phu P, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein S, et al. Chronic administration of the non-peptide CRH type 1 receptor antagonist antalarmin does not blunt hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to acute immobilization stress. *Life Sci* 1999; 65 (4): L53-L58.
127. Wright DE, Jennes L. Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. *Brain Res* 1993; 621 (2): 272-278.
128. Xiao E, Xia L, Shanen D, Khabele D, Ferin M. Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology* 1994; 135 (5): 2093-2098.
129. Xiao E, Xia-Zhang L, Thornell D, Ferin M. Interleukin-1 stimulates luteinizing hormone release during the midfollicular phase in the rhesus monkey: a novel way in which stress may influence the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81 (6): 2136-2141.
130. Yang X, Wang S, Rice KC, Munro CA, Wand GS. Restraint Stress and Ethanol Consumption in Two Mouse Strains. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;

131. Yelvington DB, Weiss GK, Ratner A. Effect of corticosterone on the prolactin response to psychological and physical stress in rats. *Life Sci* 1984; 35 (16): 1705-1711.
132. Yuhás Y, Weizman A, Chrousos GP, Ovadia H, Ashkenazi S. Involvement of the neuropeptide corticotropin-releasing hormone in an animal model of Shigella-related seizures. *J Neuroimmunol* 2004; 153 (1-2): 36-39.
133. Zalanyi S. Progesterone and ovulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98 (2): 152-159.
134. Zorrilla EP, Schulteis G, Ormsby A, Klaassen A, Ling N, McCarthy JR, et al. Urocortin shares the memory modulating effects of corticotropin-releasing factor (CRF): mediation by CRF1 receptors. *Brain Res* 2002a; 952 (2): 200-210.
135. Zorrilla EP, Valdez GR, Nozulak J, Koob GF, Markou A. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain Res* 2002b; 952 (2): 188-199.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)