

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

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL E PERIFÉRICO NO  
DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DOS  
OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDA POR  
ESTRESSE EM RATAS

Marcelo Picinin Bernuci

Ribeirão Preto

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO PICININ BERNUCI

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL E PERIFÉRICO NO  
DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DOS  
OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDA POR  
ESTRESSE EM RATAS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete A. Anselmo Franci

Ribeirão Preto

2010

## RESUMO

O estresse crônico por frio induz alterações morfofuncionais ovarianas em ratas semelhantes às aquelas relatadas na síndrome dos ovários policísticos (SOP) humana. Aumento na secreção de hormônios esteróides induzido pela hiperativação dos nervos simpáticos ovarianos em resposta ao estresse tem sido sugerido como fator etiológico da SOP experimental. Como a lesão do locus coeruleus (LC) bloqueia o surgimento da SOP induzida por estresse, pretendemos neste estudo avaliar o papel do LC no controle da atividade simpática ovariana durante a instalação do quadro de SOP. Para isso foi avaliado: a) o efeito da lesão do LC na atividade simpática e endócrina ovariana após 8 semanas de estresse por frio, b) alterações na atividade do LC, na atividade simpática e endócrina ovariana após o estresse por frio agudo ou crônico intermitente por 4 ou 8 semanas. A lesão do LC reduziu a atividade simpática e secreção de estradiol no ovário de ratas submetidas a 8 semanas de estresse. O estresse por frio agudo e crônico de 4 semanas aumentou atividade do LC e do sistema nervoso simpático ovariano, enquanto 8 semanas de estresse diminuiu ambas atividades. Aumentos significativos nas concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona e progesterona só foram encontrados após 8 semanas de estresse, quando os ovários apresentaram sinais morfológicos típicos da SOP. A inibição da atividade simpática no ovário das ratas estressadas com lesão do LC e o semelhante perfil de atividade do LC e do sistema nervoso simpático ovariano em resposta aos diferentes paradigmas de estresse sugerem um envolvimento do sistema nervoso central e periférico nas alterações morfofuncionais ovarianas relacionadas com o desenvolvimento da SOP. Assim, a atividade simpática ovariana sob o controle do LC parece desempenhar um importante papel na gênese da SOP induzida pelo estresse por alterar o desenvolvimento folicular e secreção de esteróides ovarianos.

**Palavras-chave:** Locus coeruleus; estresse; ovários policísticos; noradrenalina.

## ABSTRACT

Repeated cold stress leads to ovarian morphologic and endocrine abnormalities in rats similar to those related to the human polycystic ovary (PCO) syndrome. Increased steroid secretion during cold stress-induced ovarian sympathetic activation has been suggested as the main cause of PCO. As the locus coeruleus (LC) lesion prevents cold stress-induced PCO, the aim of this study was to analyze the role of LC in the control of ovarian sympathetic activity during the development of PCO. For this we evaluated: a) the LC lesion effect upon ovarian sympathetic and endocrine activities in rats exposed to 8 weeks of repeated cold stress, b) temporal changes in the activity of LC and ovarian sympathetic and endocrine functions in rats exposed to a single or repeated cold stress during 4 or 8 weeks. The LC lesion reduced the sympathetic activity and estradiol release in the ovary of 8 weeks cold-stressed rats. Single and 4 weeks of stress increased LC and ovarian sympathetic activities, whereas 8 weeks of stress decreased both. Four weeks of stress tended to increase plasma estradiol, testosterone and progesterone, and higher levels of these hormones were found after 8 weeks of stress, when ovaries displayed typical PCO morphology. The decreased sympathetic activity in the ovary of LC-lesioned rats after 8 weeks of repeated cold stress and the temporal pattern of activation of LC neurons and sympathetic terminals in the ovary suggests a role for central and peripheral nervous system in the development of long-lasting endocrine abnormalities related to the PCO. Thus, ovarian sympathetic activity under LC control seems to play a role in the genesis of stress-induced PCO by disrupting follicular development and steroid secretion.

**Key-words:** Locus coeruleus; stress; polycystic ovary; noradrenaline.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografias de secções coronais da região do tronco encefálico.....18
- Figura 2: Atividade simpática ovariana de ratas submetidas ao estresse por frio crônico e à lesão do locus coeruleus (LC).....19
- Figura 3: Liberação *in vitro* de estradiol induzida por hCG em ratas submetidas ao estresse por frio crônico e à lesão do locus coeruleus.....20
- Figura 4: Atividade simpática ovariana de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....21
- Figura 5: Expressão de tirosina hidroxilase (TH) no ovário de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....22
- Figura 6: Concentração do fator de crescimento neural (NGF) no ovário de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....23
- Figura 7: Liberação *in vitro* de esteróides ovarianos induzida pelo isoproterenol em ratas submetidas a estresse por frio crônico.....24
- Figura 8: Expressão de FRA em neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....25

Figura 9: Expressão de c-Fos em neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....26

Figura 10: Alterações na morfologia ovariana de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....27

Figura 11: Concentrações plasmáticas de hormônios esteróides e gonadotrofinas de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico.....29

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABC** – complexo avidina-biotina

**BSA** – albumina sérica bovina

**DAB** – 3,3” diaminobenzidina-HCl

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**FSH** - hormônio folículo estimulante

**FSHR** - receptor do hormônio folículo estimulante

**GnRH** - hormônio liberador de gonadotrofinas

**LC** - locus coeruleus

**LH** - hormônio luteinizante

**NA** - noradrenalina

**NGF** - fator de crescimento neural

**PBS** - tampão fosfato

**PFA** – paraformaldeído

**PVN** - núcleo paraventricular do hipotálamo

**RIE** - radioimunoensaio

**SNC** - sistema nervoso central

**SOP** - síndrome dos ovários policísticos

**TH** - tirosina hidroxilase

**TRH** - hormônio liberador de tireotrofina

**VE** - valerato de estradiol

# SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	06
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	07
3.1. Planejamento experimental.....	07
3.2. Animais.....	09
3.3. Ciclo estral.....	10
3.4. Anestesia e cuidados pós-operatórios .....	10
3.5. Lesão eletrolítica do LC .....	10
3.6. Cirurgia fictícia (sham) .....	11
3.7. Estresse .....	11
3.8. Coleta de amostras sanguíneas .....	11
3.9. Incubação <i>in vitro</i> .....	11
3.10. Perfusão e obtenção dos cortes do LC para imunohistoquímica .....	12
3.11. Análise histológica da lesão .....	12
3.12. Análise morfológica dos ovários .....	13
3.13. Determinação da expressão de FRA, c-Fos e TH .....	13
3.14. Análise quantitativa da expressão de FRA, c-Fos e TH .....	14
3.15. Dosagens hormonais .....	14
3.16. Determinação das concentrações de NA e MHPG .....	15
3.17. Determinação das concentrações de NGF .....	16
3.18. Determinação da expressão de TH no ovário .....	16

3.19. Análise estatística .....	17
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
4.1. Lesão eletrolítica do LC .....	18
4.2. Efeito da lesão do LC e do estresse por frio na atividade simpática ovariana .....	19
4.3 Efeito da lesão do LC e do estresse por frio na liberação in vitro de estradiol induzida por hCG .....	20
4.4 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na atividade simpática ovariana .....	21
4.5 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na expressão de TH no ovário .....	22
4.6 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na concentração de NGF no ovário .....	23
4.7 Efeito do estresse por frio crônico intermitente por 8 semanas na resposta esteroidal ovariana à estimulação $\beta$ -adrenérgica .....	24
4.8 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico intermitente por 8 semanas na atividade dos neurônios do LC .....	25
4.9 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na atividade dos neurônios do LC .....	26
4.10 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na morfologia ovariana .....	27
4.11 Efeito do estresse por frio agudo ou crônico nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas e hormônios esteróides .....	28
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>

<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>50</b>

## ***Introdução***

### ***A síndrome dos ovários policísticos***

Reconhecida como principal causa de infertilidade feminina, afetando aproximadamente 7% das mulheres em idade reprodutiva (Azziz, Woods *et al.*, 2004; March, Moore *et al.*, 2010), a síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma desordem complexa com manifestações clínicas diversas e caracterizada por distúrbios menstruais, hiperandrogenismo e ovários policísticos (Chang, 2007). A presença de resistência à insulina e obesidade em cerca de 60% das pacientes diagnosticadas com SOP (Legro, Castracane *et al.*, 2004) amplifica a severidade desta desordem e predispõe as portadoras a desenvolverem diabetes tipo 2 (Ehrmann, Barnes *et al.*, 1999), síndrome metabólica (Ehrmann, Liljenquist *et al.*, 2006) e doença cardiovascular (Carmina, 2009). Além disso, a persistência das alterações metabólicas somado ao quadro de infertilidade crônica compromete a qualidade de vida das pacientes e propicia o surgimento de distúrbios psicológicos bem como sintomas de depressão (Himelein and Thatcher, 2006; Jedel, Waern *et al.*, 2010).

Embora a associação entre ovários policísticos, hirsutismo e anovulação date a mais de 70 anos, quando Stein e Leventhal descreveram pela primeira vez a SOP, os critérios para o diagnóstico desta desordem ainda permanecem em discussão (Stein and Leventhal M, 1935). Em 1992, o Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos sugeriu que apenas a presença de anovulação (oligomenorréia ou amenorréia) e sinais de hiperandrogenismo (hirsutismo, acne, alopecia) eram suficientes para o diagnóstico da SOP (Zawadski and Dunaif, 1992). Posteriormente, um consenso entre a Sociedade Européia de Reprodução Humana e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, conhecido como “Consenso de Roterdam”, estabeleceu que o diagnóstico da SOP depende da presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: a) ovários com características policísticas, b) hiperandrogenismo e c) anovulação, com a exclusão de outras causas (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004). Segundo a Sociedade de Excesso de Andrógenos e SOP, os distúrbios metabólicos da SOP são mais pronunciados em pacientes hiperandrogênicas do que aquelas sem sinais evidentes de hiperandrogenismo sugerindo que os critérios para o diagnóstico da SOP devem se restringir à presença de hiperandrogenismo (hirsutismo clínico ou sinais bioquímicos de hiperandrogenemia, ou ambos) e disfunção ovariana (oligo/ anovulação ou ovários policísticos, ou ambos) após a exclusão de outras causas

de excesso de andrógenos ou desordens correlacionadas (Azziz, Carmina *et al.*, 2009). Este conceito coloca em debate a labilidade criteriosa do Consenso de Roterdam e sugere que pacientes não-hiperandrogênicas que apresentam ovários com características policísticas e distúrbios menstruais não devem ser diagnósticas como portadoras da SOP.

Levando em conta a heterogeneidade das manifestações clínicas e metabólicas da SOP, não se pode reduzir a expressão dessa síndrome a um único fator etiológico. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas na tentativa de se detectar em que nível do eixo hipotálamo-hipófise-ovário ocorre a alteração primária que leva ao desequilíbrio hormonal presente nessa patologia. No entanto, os resultados destas pesquisas têm se mostrado ainda inconsistentes. Tradicionalmente, a SOP pode ser considerada como resultado de um “ciclo vicioso”, o qual pode ser iniciado por: a) uma alteração neuroendócrina primária que leva a um aumento na frequência e na amplitude dos pulsos do hormônio luteinizante (LH), principal responsável pela estimulação da síntese e secreção de esteróides pelas células da teca, cujo aumento plasmático está positivamente correlacionado com os níveis aumentados de andrógenos plasmáticos (Waldstreicher, Santoro *et al.*, 1988); b) uma anormalidade intrínseca na esteroidogênese ovariana que leva a um aumento exagerado na secreção androgênica (Nelson, Legro *et al.*, 1999) e/ou c) um defeito na ação da insulina que leva a hiperinsulinemia e resistência a insulina, ambos associados com aumentos na atividade androgênica (Dunaif, 1997).

De forma geral, o papel da hiperinsulinemia na fisiopatologia da SOP se deve principalmente pela ação sinérgica da insulina com o hormônio luteinizante (LH) na secreção de andrógenos ovarianos (Nestler, 1997) e na supressão da produção hepática de globulinas carreadoras de esteróides sexuais (Plymate, Matej *et al.*, 1988) promovendo aumentos crônicos nas concentrações plasmáticas de andrógenos. Os andrógenos por sua vez podem aumentar sua própria secreção estimulando diretamente as células da teca no ovário (Vendola, Zhou *et al.*, 1998; Weil, Vendola *et al.*, 1998) ou indiretamente via LH, uma vez que a exposição crônica a altos níveis plasmáticos de andrógenos altera o controle de retroalimentação negativa exercido pelos esteróides ovarianos na secreção de gonadotrofinas (Pastor, Griffin-Korf *et al.*, 1998; Eagleson, Gingrich *et al.*, 2000). Todas essas alterações são provavelmente moduladas por fatores genéticos e ambientais e levam a um resultado final comum de produção excessiva de andrógenos pelos ovários (Franks, 1995).

### ***Estresse e síndrome dos ovários policísticos***

Reconhecidamente, estresses crônicos alteram a secreção normal de gonadotrofinas e desestabilizam a funcionalidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário culminando com o aparecimento de sérios quadros de anovulação crônica (Kaplan and Manuck, 2004; Kalantaridou, Makrigiannakis *et al.*, 2004; Genazzani, 2005). O envolvimento do estresse na etiologia da SOP só foi sugerido após a descoberta da participação direta do sistema nervoso simpático, um dos principais componentes envolvidos na modulação das repostas fisiológicas ao estresse, no desenvolvimento folicular e secreção de esteróides gonadais (Greiner, Paredes *et al.*, 2005).

Aumentos no conteúdo de noradrenalina no ovário de ratos submetidos a 4 semanas de estresse por frio, um potente ativador do sistema nervoso simpático (Pacak and Palkovits, 2001), tem sido associado ao desenvolvimento de folículos antrais com hipertrofia da camada de células da teca, geralmente encontrados no ovário de mulheres com SOP (Dorfman, Arancibia *et al.*, 2003). No entanto, o surgimento de múltiplos cistos ovarianos bem como hiperandrogenemia, características comuns à SOP humana, só ocorrem após 8 semanas de estresse crônico e intermitente por frio (Bernuci, Szawka *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo foi mostrado também que a lesão do locus coeruleus, um núcleo noradrenérgico pontino envolvido no controle das respostas autonômicas durante situações de estresse (Valentino, Foote *et al.*, 1993), previne o desenvolvimento da SOP experimental, o que sugere uma participação chave do sistema nervoso central na regulação da atividade dos nervos simpáticos ovarianos.

Aumentos da atividade simpática periférica estão intimamente associados com alterações no desenvolvimento folicular e secreção de esteróides em ratos tratados com valerato de estradiol, conhecido por aumentar os níveis intraovarianos do fator de crescimento neural (NGF) (Lara, Dissen *et al.*, 2000) e facilitar o surgimento de cistos foliculares (Lara, Ferruz *et al.*, 1993). A restauração da resposta esteroidal normal e a retomada da capacidade ovulatória após a remoção cirúrgica da inervação simpática ovariana nestes animais (Barria, Leyton *et al.*, 1993), bem como a indução de cistos ovarianos pela administração *in vivo* do agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol (Lara, Dorfman *et al.*, 2002), suporta a hipótese de um envolvimento direto do sistema nervoso simpático na manutenção e desenvolvimento da SOP experimental.

Em humanos, aumentos da atividade dos nervos simpáticos periféricos estão positivamente correlacionados com aumentos plasmáticos de testosterona em pacientes diagnosticadas com SOP (Sverrisdottir, Mogren *et al.*, 2008). Além disso, os ovários de mulheres portadoras da SOP apresentam uma maior densidade de fibras nervosas catecolaminérgicas quando comparados com mulheres normais de mesma idade (Semenova, 1969;Heider, Pedal *et al.*, 2001) bem como níveis aumentados de NGF (Dissen, Garcia-Rudaz *et al.*, 2009). Todos estes achados somados ao fato de que o exercício físico e acupuntura diminuem a atividade simpática periférica e melhoram o quadro de SOP (Stener-Victorin, Jedel *et al.*, 2008;Stener-Victorin, Jedel *et al.*, 2009;Manneras, Cajander *et al.*, 2009) sugerem que aumentos da atividade simpática periférica possam também contribuir para o desenvolvimento da SOP humana.

### ***A inervação simpática ovariana***

A inervação simpática do ovário desempenha importante papel na regulação de específicas funções ovarianas, como esteroidogênese e foliculogênese (Aguado, Petrovic *et al.*, 1982;Aguado, 2002;Mayerhofer, Dissen *et al.*, 1997;Ricu, Paredes *et al.*, 2008). A noradrenalina é o principal neurotransmissor envolvido neste controle, uma vez que a maioria das fibras simpáticas presentes no tecido ovariano são noradrenérgicas (Jacobowitz and Wallach, 1967;Ben-Jonathan, Arbogast *et al.*, 1984) e reconhecidamente capaz de aumentar a secreção de andrógenos em biópsias de ovário humano incubadas *in vitro* (Lara, Porcile *et al.*, 2001).

Na mulher, as fibras pós-ganglionares simpáticas que inervam o ovário se originam dos corpos celulares neuronais do gânglio ovariano, o qual está localizado próximo a origem da artéria ovariana, bem como dos corpos celulares do gânglio celíaco e plexo renal (Baljet and Drukker, 1982). Em roedores, esta inervação se dá por duas vias: a) o nervo do plexo ovariano, que trafega ao longo da artéria ovariana cujas fibras são quase que exclusivamente perivasculares e b) o nervo ovariano superior, que está associado ao ligamento suspensório do ovário com fibras que inervam preferencialmente os componentes secretórios do ovário, tecido intersticial e folículos (Klein and Burden, 1988).

Técnicas neuromorfológicas de marcação transneuronal têm demonstrado que os corpos celulares pré-ganglionares simpáticos destes terminais ovarianos se encontram agrupados na coluna intermediolateral da medula espinal e recebem aferências de diversas áreas do sistema nervoso central (Gerendai, Toth *et al.*, 1998). Estas aferências

incluem os grupamentos celulares noradrenérgicos pontinos, sendo um deles o locus coeruleus (LC) e outras regiões cerebrais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (GERENDAI, KOCSIS *ET AL.*, 2002; GERENDAI, TOTH *ET AL.*, 2009).

### ***Controle da atividade simpática ovariana durante o estresse***

A participação do LC no controle das funções autonômicas se deve às projeções deste núcleo diretamente (neurônios de terceira ordem) para neurônios simpáticos pré-ganglionares na coluna intermédia lateral da medula espinal ou indiretamente para outros núcleos cerebrais envolvidos neste controle, como o PVN (Samuels and Szabadi, 2008b; Samuels and Szabadi, 2008a). Classicamente, o LC e o PVN, possuem um papel central na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sistema nervoso simpático durante a modulação das respostas evocadas pelo estresse (Valentino, Foote *et al.*, 1993; Chrousos, 1992) inclusive pelo estresse por frio (Jedema, Finlay *et al.*, 2001; Jiang, Guo *et al.*, 2004; Ma and Morilak, 2005). Além disso, o estresse por frio é capaz de induzir aumentos na expressão do RNA mensageiro do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) nos neurônios magnocelulares do PVN concomitantemente a alterações na atividade simpática ovariana (Fiedler, Jara *et al.*, 2006), sugerindo fortemente um envolvimento do sistema nervoso central no controle da atividade dos nervos simpáticos que se projetam para o ovário durante situações de estresse.

Considerando as evidências de que: a) o LC mantém conexões diretas ou indiretas com o ovário via sistema nervoso autônomo; b) existem conexões anatômicas e funcionais recíprocas entre o PVN e o LC; c) há uma via descendente PVN-medular provavelmente responsável pela ativação simpática ovariana em resposta ao estresse por frio e d) a lesão do LC previne o desenvolvimento da SOP induzida pelo estresse por frio, a hipótese deste trabalho é de que a ativação dos neurônios do LC pelo estresse por frio resulta em ativação da via simpática descendente medular que se projeta para o ovário desencadeando alterações no desenvolvimento folicular e secreção de esteróides gonadais necessárias para a instalação do quadro de SOP.

Como até o momento não há nenhuma evidência de uma relação funcional entre a atividade dos neurônios do LC e do sistema nervoso simpático ovariano e secreção hormonal durante o desenvolvimento da SOP, objetivamos neste estudo investigar o papel do sistema nervoso central e periférico no desenvolvimento da SOP induzida pelo

estresse avaliando parâmetros funcionais da atividade do LC e sistema nervoso simpático ovariano. A importância deste estudo reside na sua contribuição para o melhor entendimento da complexa relação entre estresse, alterações no desenvolvimento folicular e secreção de esteróides na patofisiologia da SOP.

## ***Objetivos***

### *2.1. Objetivo geral:*

Avaliar o papel do LC no controle da atividade simpática ovariana durante o desenvolvimento da SOP induzida pelo estresse por frio em ratas.

### *2.2. Objetivos específicos:*

- 2.2.1. Verificar o efeito da lesão do LC na atividade simpática ovariana e na resposta esteroidal do ovário à estimulação gonadotrófica em ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio;
- 2.2.2. Correlacionar as variações na atividade dos neurônios do LC, na atividade simpática ovariana, nas concentrações plasmáticas de esteróides ovarianos e gonadotrofinas com as alterações morfológicas nos ovários de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico intermitente durante 4 ou 8 semanas;
- 2.2.3. Verificar o efeito do estresse crônico e intermitente por frio durante 8 semanas na resposta esteroidal ovariana à estimulação  $\beta$ -adrenérgica.

## ***Materiais e Métodos***

### **3.1. Planejamento experimental**

Experimento 1: *Efeito do estresse por frio crônico e intermitente por 8 semanas e da lesão do LC sobre a atividade simpática ovariana e a liberação in vitro de estradiol induzida por gonadotrofina.*

O objetivo deste experimento foi o de avaliar o papel do LC na atividade do sistema nervoso simpático ovariano e responsividade ovariana à estimulação gonadotrófica após o estresse por frio crônico e intermitente durante 8 semanas. Ratas com ciclos estrais regulares foram submetidas à lesão eletrolítica bilateral do LC (grupo lesão do LC) ou à operação fictícia (grupo sham) ou então não sofreram nenhuma manipulação do SNC (grupo intacto). Transcorridos 7 dias, os animais foram divididos em 3 grupos: intacto (n = 6), sham (n = 5), e lesão do LC (n = 6) e submetidos a sessões repetidas de estresse por frio (3h/dia) durante 8 semanas. Ratas controle, mantidas em temperatura ambiente, também foram divididas em grupos: intacto (n = 6), sham (n = 6), e lesão do LC (n = 5). Amostras do esfregaço vaginal foram tomadas diariamente para verificar o ciclo estral. Imediatamente após o final da sessão de estresse no dia do estro, os animais foram anestesiados e perfundidos transcardiacamente. Antes da perfusão, o ovário esquerdo foi dividido em 2 partes. Em uma parte foram realizadas as dosagens de noradrenalina (NA) e seu metabólito, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), por cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica (HPLC-ED), e na outra parte foi avaliada a liberação *in vitro* de estradiol após incubação com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Após a perfusão, o tronco encefálico dos animais do grupo lesão do LC foi retirado para análise histológica da localização da lesão.

Experimento 2: *Efeito do estresse por frio agudo e crônico intermitente por 4 e 8 semanas sobre a atividade simpática ovariana e os níveis plasmáticos de gonadotrofinas e hormônios esteróides.*

O objetivo deste experimento foi o de verificar se as variações na atividade do sistema nervoso simpático ovariano e nos níveis ovarianos da proteína tirosina hidroxilase (TH) e do fator de crescimento neural (NGF) após o estresse por frio agudo ou crônico intermitente durante 4 ou 8 semanas estavam correlacionadas com as variações nos níveis plasmáticos de hormônios esteróides ovarianos e gonadotrofinas durante o desenvolvimento da SOP. Ratas com ciclos estrais regulares foram submetidas ao estresse agudo (EA, n = 5) ou crônico intermitente durante quatro (EC-

4S, n = 5) ou oito (EC-8S, n = 5) semanas. Animais do grupo controle (C, n = 6) foram mantidos em temperatura ambiente. Amostras do esfregaço vaginal foram tomadas diariamente para verificar o ciclo estral. Para se evitar um possível efeito do anestésico na atividade simpática ovariana bem como nas concentrações plasmáticas dos hormônios esteróides, os animais foram decapitados imediatamente após o final da sessão de estresse no dia do estro, e os ovários e uma amostra de sangue coletados. No ovário esquerdo, as concentrações de noradrenalina e MHPG foram determinadas por HPLC-ED. O ovário direito foi dividido em 2 partes; em uma parte foi determinada as concentrações de NGF por ensaio imuno-enzimático (ELISA), e na outra parte foi avaliado a expressão de TH por western blotting. As concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona, estradiol e progesterona foram determinados por radioimunoensaio (RIA).

Experimento 3: *Efeito do estresse por frio agudo e crônico intermitente por 8 semanas sobre a atividade dos neurônios do LC*

O objetivo deste experimento foi o de avaliar a atividade dos neurônios do LC pela análise da expressão de FRA (*Fos-related antigens*), reconhecido indicador de aumento ou queda de atividade neuronal, após o estresse por frio agudo ou crônico intermitente durante 8 semanas. Ratas com ciclos estrais regulares foram submetidas a uma única sessão de estresse, (estresse agudo: EA, n = 4) ou a sessões de estresse crônico intermitente durante oito semanas (EC-8S, n = 4). Animais do grupo controle (n = 4) foram mantidos em temperatura ambiente. Amostras do esfregaço vaginal foram tomadas diariamente para verificar o ciclo estral. Imediatamente após o final da sessão de estresse no dia do estro, os animais do grupo controle e experimental foram anestesiados, perfundidos transcardiacamente e os cérebros removidos e congelados para processamento imunohistoquímico. Secções coronais de 20 µm da extensão rostro-caudal do LC foram obtidas em criostato e processadas imunohistoquimicamente para dupla marcação de FRA e TH. O número de neurônios imunorreativos (IR) para TH expressando FRA foi determinado bilateralmente no LC.

Experimento 4: *Efeito do estresse por frio agudo e crônico intermitente por 4 e 8 semanas sobre a atividade dos neurônios do LC, morfologia ovariana e resposta esteroidal ovariana à estimulação β-adrenérgica*

O objetivo deste experimento foi o de verificar se aumentos na atividade dos neurônios do LC, mostrados pela expressão da proteína *c-Fos*, eram acompanhados por variações na morfologia ovariana relacionadas com o desenvolvimento da SOP após o estresse por frio agudo ou crônico intermitente durante 4 ou 8 semanas bem como avaliar a responsividade ovariana à estimulação  $\beta$ -adrenérgica após o estresse por frio crônico e intermitente durante 8 semanas. Ratas com ciclos estrais regulares foram submetidas ao estresse agudo (EA, n = 5) ou crônico intermitente durante quatro (EC-4S, n = 5) ou oito (EC-8S, n = 5) semanas. Animais do grupo controle (n = 6) foram mantidos em temperatura ambiente. Amostras do esfregaço vaginal foram tomadas diariamente para verificar o ciclo estral. Imediatamente após o final da sessão de estresse no dia do estro, os animais do grupo controle e experimental foram anestesiados, perfundidos transcardiacamente e os cérebros removidos e congelados para processamento imunohistoquímico. Antes da perfusão, o ovário direito foi removido e processado para análise histológica. O ovário esquerdo dos animais do grupo EC-8S foi incubado *in vitro* para avaliar a resposta esteroideal ovariana à estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Secções coronais de 20  $\mu$ m da extensão rostro-caudal do LC foram obtidas em criostato e processadas imunohistoquimicamente para dupla marcação de *c-Fos* e TH. O número de neurônios imunorreativos (IR) para TH expressando *c-Fos* foi determinado bilateralmente no LC.

### **3.2. Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar adultas provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, mantidas individualmente em caixas plásticas (30 x 19 x 13 cm), em um ambiente com temperatura ( $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), luz (12h claro/12h escuro; luzes acesas às 6:00h) e exaustão (27 trocas do volume do ar da sala/ hora) controladas, com água e ração *ad libitum*. No dia da eutanásia os animais pesavam 350-370 g (15-16 semanas de idade). Os protocolos utilizados no experimento 1 foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Protocolo N° 060/2004 e os referentes aos experimentos 2, 3 e 4 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto, Protocolo N° 09.1.1389.53.0.

### **3.3. Ciclo estral**

O esfregaço vaginal foi colhido diariamente e analisado a fresco no microscópio óptico. Somente ratas que possuíam pelo menos três ciclos estrais regulares e consecutivos de quatro dias foram utilizadas nos experimentos. O ciclo estral foi acompanhado diariamente durante todo o período estudado em todos os experimentos.

### **3.4. Anestesia e cuidados pós-operatórios**

Tanto para as cirurgias estereotáxicas quanto para a perfusão, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina 10% (Cloridato de ketamina, Agner, São Paulo; 55 mg/Kg peso corporal, i.p.) e xilasina 2% (Coopazine®, Coopers, São Paulo; 10 mg/Kg peso corporal, i.p.). Após a cirurgia estereotáxica, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (pentabiótico<sup>®</sup>, Fort Dodge Ltda; 0,2 mL/animal, i.m.) e de um analgésico e antiinflamatório não-esteroidal (Banamine<sup>®</sup>, Schering-Plough, S/A; 2,5 mg/Kg peso corporal, s.c.).

### **3.5. Lesão eletrolítica do LC**

Os animais tiveram a parte superior da cabeça depilada e então foram adaptados no estereotáxico. Após a assepsia foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido celular subcutâneo, isolado o perióstio e trepanada a abóbada craniana com o auxílio de uma broca esférica no local adequado para a introdução do eletrodo. Um eletrodo monopolar de aço inoxidável com 0,2 mm de diâmetro, isolado em toda sua extensão com a exceção da ponta, foi introduzido utilizando-se as seguintes coordenadas: ângulo do eletrodo: 15 graus com a vertical (sentido postero-anterior); antero-posterior: 3,3 mm posterior à sutura lambdóide; lateral: 1,2 mm de cada lado da sutura longitudinal; vertical: 6,8 mm abaixo da calota craniana. A lesão foi realizada bilateralmente pela utilização de um gerador de corrente contínua aplicando-se uma corrente anódica de 1mA durante 10 segundos. Após a lesão, o eletrodo foi retirado e a pele suturada.

### **3.6. Cirurgia fictícia (Sham)**

Na cirurgia fictícia foram realizados todos os procedimentos acima descritos para lesão do LC, exceto que o eletrodo foi introduzido 2 mm acima da coordenada vertical (4,8 mm abaixo da calota craniana), sem aplicação de corrente.

### **3.7. Estresse**

As ratas submetidas ao estresse foram transportadas em suas caixas individuais às 9:00 horas até uma câmara fria, à 4° C e aí permaneceram durante 3 horas/dia, 05 dias/semana. Ratas do grupo EA foram submetidas à apenas uma sessão de estresse, e aquelas dos grupos EC-4S e EC-8S submetidas a sessões repetidas de estresse por 4 ou 8 semanas, respectivamente. As ratas controle foram movidas a uma localização próxima da câmara fria, e retornaram a seu local de origem após 3 horas (Dorfman, Arancibia *et al.*, 2003; Bernuci, Szawka *et al.*, 2008).

### **3.8. Coleta de amostras sanguíneas**

Imediatamente após a última sessão de estresse os animais do experimento 2 foram rapidamente decapitados e uma amostra de sangue foi coletada do tronco do animal em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado a 1200 g durante 15 minutos a 4 °C e o plasma separado e estocado a -20 °C até o momento das dosagens por radioimunoensaio.

### **3.9. Incubação *in vitro***

A resposta esteroidal ovariana à estimulação gonadotrópica foi determinada pela liberação *in vitro* de estradiol na presença de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou do veículo (experimento 1). A resposta esteroidal ovariana à estimulação  $\beta$ -adrenérgica foi determinada pela liberação *in vitro* dos esteróides ovarianos na presença de isoproterenol, um conhecido agonista dos receptores adrenérgicos do tipo  $\beta_2$ , ou do veículo (experimento 4), como previamente descrito (Sosa, Casais *et al.*, 2000). De modo geral, os ovários esquerdos foram divididos em 2 partes, cada parte foi pesada e pré-incubada separadamente com o tampão bicarbonato Krebs-Ringer (pH 7.4), contendo 0.1 mg/mL de glicose e 0.1 mg/mL de albumina por 30 minutos a 37 °C em uma atmosfera de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de pré-incubação, uma parte do

ovário foi incubada com 2 mL do tampão (grupo Veículo) e a outra parte com o mesmo volume do tampão contendo 2.5 IU de hCG (Ferring GmbH, Kiel, Germany; grupo hCG) ou 10  $\mu$ M de isoproterenol (Sigma, St Louis, USA; grupo ISO). O meio de incubação foi coletado após 3 horas e as concentrações de estradiol, testosterona e progesterona foram determinadas por RIA. Os dados foram normalizados pelo peso do tecido e a resposta esteroidal ovariana ao hCG foi expressa em relação a liberação de estradiol do grupo veículo.

### **3.10. Perfusão e obtenção dos cortes do LC para imunohistoquímica**

As ratas foram perfundidas, através da artéria aorta ascendente, com 50 mL de tampão fosfato salina 0,01M (PBS 0,01M: tampão fosfato 0,01M, pH 7,4; NaCl 145 mM e KCl 2,15 mM) contendo heparina (5UI/mL) à temperatura ambiente, seguido de 300 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato(PB) 0,1M (PFA 4%) a 4°C. Após a perfusão, os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 horas a 4°C e crioprotetidos em sacarose 30% diluída em PB 0,1M a 4°C. Após a crioproteção, os cérebros foram congelados em iso-pentano (Riedel-deHaën, Seelze, Germany), a uma temperatura entre -45 e -50°C, por 1 minuto. Logo após o congelamento, os cérebros foram armazenados a -70°C. Quatro séries de secções frontais de 20  $\mu$ m da extensão rostro-caudal do LC foram obtidas em criostato e armazenadas em solução crioprotetora (Watson, Jr., Wiegand *et al.*, 1986) a -20°C para posterior processamento imunohistoquímico.

### **3.11. Análise histológica da lesão do LC**

Após perfusão, o tronco cerebral dos animais do grupo lesão foi separado e mantido em solução de formol a 10% durante dois dias. Após fixação, foram incluídos em parafina e cortes de 12  $\mu$ m de espessura foram feitos em micrótomo na região do LC. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro e corados pelo método de Nissl. A análise histológica da lesão foi feita em microscópio óptico e esquematizada em mapas neuroanatômicos do Atlas de Palkovits e Jacobowitz (Palkovits and Jacobowitz, 1974). Somente os animais com lesão do LC superior a 80% foram considerados neste estudo.

### **3.12. Análise morfológica dos ovários**

A caracterização morfológica da SOP foi realizada pela análise histológica dos ovários, e o número de folículos antrais com hipertecose, pré-cistos ou tipo III e cistos foram contados em cada secção do ovário, de acordo com os critérios apresentados por Lara e colaboradores (2000a). Os ovários foram imersos em paraformaldeído 4% em 0.1 M de tampão fosfato (4% PFA) por 24 horas e embebidos em parafina. Foram realizados cortes seriados de 8- $\mu$ m de toda extensão do ovário e corados com hematoxilina e eosina. Utilizando um microscópio óptico associado a um sistema de imagens, foram quantificados em todas as secções o número total de: a) folículos antrais com hipertecose, definidos como aqueles folículos com diâmetros entre 350–450  $\mu$ m que apresentam hipertrofia da camada de células da teca; b) folículos tipo III, também chamados de pré-cistos, definidos como aqueles folículos com diâmetros superiores a 500  $\mu$ m que também apresentam espessamento da camada de células da teca; e c) cistos que foram definidos como aqueles folículos antrais de grande porte, com ampla cavidade antral, ausência de oócito incluso, delgada camada de células da granulosa e espessa camada de células da teca.

### **3.13. Determinação da expressão de FRA, c-Fos e TH**

As duplas marcações imunohistoquímicas para FRA, c-Fos e TH foram realizadas pelo método de “free-floating”. Todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente (22°C), exceto as incubações com os anticorpos primários, que foram realizadas a 4°C. Entre cada passo da imunohistoquímica, as secções foram lavadas em PBS e, exceto quando mencionado, todas as soluções foram preparadas em PBS. Após a remoção da solução crioprotetora, as secções foram lavadas em glicina 0,1M e incubadas em Triton X-100 (TX-100) 0,3% por 30 minutos, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1% por 1 hora e albumina bovina (BSA) 3% por 1 h. Sem prévia lavagem em PBS, os cortes da primeira série das quatro que foram obtidas em criostato foram incubados com anticorpo primário anti-FRA (K25; Santa Cruz Biotechnology, CA) produzido em coelho e diluído 1:2000 (Experimento 3) ou anti-cFos (Ab5; Calbiochem, Darmstadt, Germany.) produzido em coelho e diluído 1:15000 (Experimento 4) em PBS contendo TX-100, 0.3% e BSA 1% (solução utilizada na diluição de todos os anticorpos primários e secundários) por 40 horas à 4°C. A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado, anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000, Vector Laboratories), diluído 1:600 por 2 horas, e com o

complexo avidina DH-peroxidase biotilada (KIT ABC Elite, Vectastain, Vector Laboratories), a 1:100 (reagentes A e B) por 1 hora. A reação final para c-Fos foi realizada com solução contendo 3,3' diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma), cloreto de níquel (25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1μL/mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão acetato 0,175M (pH=7.5) por 10 minutos. Após a incubação em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% por 15 minutos, as secções foram incubadas com anticorpo primário anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma, St Louis, MO, USA), diluído 1:500000 por 48 horas. A seguir, incubados com anticorpo secundário biotilado, anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (BA-2001, Vector), diluído 1:600 por 1 hora, e com complexo avidina DH-peroxidase biotilada (KIT ABC Elite, Vectastain, Vector Laboratories), a 1:100 (reagentes A e B) por 1 hora. A reação final para TH foi realizada com solução contendo 3,3' diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,1 mg/mL; Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1μL/mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão Tris-HCl 0,05M (pH=7.6), por 10 minutos. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secas a temperatura ambiente, lavadas com etanol e xilol e as lamínulas coladas utilizando-se Entellan (Merck).

### **3.14. Análise quantitativa da expressão de FRA e c-Fos/TH**

As secções contendo cortes do LC foram examinadas em um microscópio óptico (Axioskop 2 plus, Zeiss, Germany) associado a um sistema para análise de imagens (Axiovision 3.1, Zeiss, Germany). O número de neurônios imunorreativos à TH expressando FRA ou c-Fos foi quantificado bilateralmente no LC por toda a extensão rostro-caudal desse núcleo, sendo a contagem realizada de -9.48 a -10.32 mm pós-Bregma.

### **3.15. Dosagens hormonais**

As concentrações de estradiol, progesterona, testosterona, LH e FSH foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo, realizado no laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As dosagens de estradiol, progesterona e testosterona no plasma e no meio de incubação foram feitas utilizando-se kits MAIA (Biochem Immunossystems, Bologna, Italy). As dosagens de LH e FSH foram realizadas utilizando-se kits específicos fornecidos pelo National Institute of Arthritis, Diabetes

and kidney Diseases (NIADDK, USA). Os anticorpos específicos foram anti-rato LH-S10, FSH-S11, diluídos em soro de coelho normal e as preparações padrões foram LH-RP3 e FSH-RP2, diluídos em tampão fosfato com albumina bovina 0,1% pH 7,5. O segundo anticorpo foi produzido em ovelhas pelo Laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, utilizando antigamaglobulina de coelho. Os hormônios foram iodinados com  $^{125}\text{I}$  Iodo da Amersham Biosciences (USA). Todas as amostras foram dosadas em um mesmo ensaio para evitar erros inter-ensaio. O menor limite de detecção foi 0.04 ng/mL para o LH, 0.09 ng/mL para o FSH, 5.00 pg/mL para o estradiol, 0,02 ng/mL para progesterona e 5.00 pg/mL para a testosterona. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 3.4% para LH, 2.8% para FSH, 4.3% para estradiol, 7.5% para progesterona e 4% para testosterona.

### **3.16. Determinação das concentrações de noradrenalina e MHPG**

As concentrações de NA e MHPG no ovário foram determinadas por cromatografia de alto desempenho seguida de detecção eletroquímica (HPLC-ED). Os ovários foram homogeneizados com um microultrasonicador em uma solução de 0.2 M de ácido perclórico, 0.1 mM de EDTA e 450 nM de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA, padrão interno; Aldrich, Aldrich, Milwaukee, WI, USA), e centrifugado por 20 minutos a 12,000 g. O supernadante foi acidamente hidrolizado por aquecimento a 94 °C por 5 minutos para desconjugar o MHPG do sulfato de MHPG (Lookingland, Ireland *et al.*, 1991), filtrado em uma membrana de 0.22- $\mu\text{m}$  (Millex PVDF, Millipore, Belford, MA, USA) e injetado no sistema de HPLC-ED por um auto injetor (SIL-10Advp, Shimadzu, Kyoto, Japan). O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A separação foi feita em uma coluna C18 de fase reversa de 250 x 4-mm (Purospher Star, 5  $\mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt, Germany) precedida por uma coluna C18 de fase reversa de 4 x 4-mm (Lichrospher, 5  $\mu\text{m}$ , Merck). A fase móvel consistiu em 100 mM de fosfato de sódio dehidrogenado, 10 mM de cloreto de sódio, 0.1 mM de EDTA, 0.37 mM de ácido 1-octanesulfônico de sódio (Sigma, St Louis, USA) e 4% de metanol (Omnisolv, EMD Chemical Inc., Gibbstown, NJ, USA), pH ajustado para 3.5 com ácido fosfórico. A velocidade da bomba de infusão (LC-10Advp, Shimadzu) foi de 0.6 mL/min e o potencial de detecção foi ajustado para 0.65 V versus *in situ* Ag/AgCl do eletrodo de referência (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, The Netherlands). Os dados cromatográficos foram plotados usando o software Class-VP

(Shimadzu). A identificação de NA e de MHPG foi baseada nos tempos dos picos de retenção. A quantificação foi realizada pelo método do padrão interno (DHBA como padrão interno) baseado na área sob o pico. Todas as amostras foram ensaiadas na mesma análise. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1.2% para NA e 4.6% para MHPG. Os níveis de NA foram considerados para estimar o estoque do neurotransmissor na vesícula sináptica, enquanto que os níveis de MHPG refletem o montante de NA liberada na amostra (Lookingland, Ireland *et al.*, 1991). A razão MHPG/NA foi usada como uma medida da atividade neurotransmissora.

### **3.17. Determinação das concentrações de NGF**

As concentrações de NGF no ovário foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Metade do ovário direito foi homogeneizado com microultrasom em 500  $\mu$ L de uma solução contendo 2,7 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 1,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,9 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 0,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (tampão DBPS, pH 7.35). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 13,000 g. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O supernadante foi diluído para 1:100 em tampão DBPS e as concentrações de NGF determinadas por ELISA (NGF  $E_{\text{max}}$  immunoassay system, Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Todas as amostras foram ensaiadas na mesma análise. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5.8%. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína na amostra.

### **3.18. Determinação da expressão de TH**

A expressão de TH (~60 kDa) no ovário foi avaliada por western blotting. A glândula adrenal foi usada como controle positivo da expressão de TH. A outra metade do ovário direito foi homogeneizada separadamente em 100  $\mu$ L do tampão de lise RIPA (20 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF e 20  $\mu$ g/mL de aprotinina). O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 12,000 g e o supernadante retido. As concentrações de proteína foram estimadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Quantidades semelhantes de proteína (Tian, Lookingland *et al.*, 1991) foram desnaturadas e fracionadas por tamanho em um gel de eletroforese SDS-poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Padrões de diferentes pesos

moleculares (Amersham Biosciences, UK) foram ensaiados em cada gel para a padronização dos valores de pesos moleculares no ensaio. As proteínas foram transferidas em uma membrana de nitrocelulose (Millipore, BioRad, Hercules, CA). Os blots foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente com leite em pó desnatado 5% diluído em tampão fosfato [PBS-T, solução salina + 0,1% Tween-20 (Sigma)] antes da incubação com o anticorpo primário anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma, St Louis, MO, USA), diluído 1:10000 em PBS-T + leite em pó desnatado 1% por 24 horas à 4° C. Depois de lavada a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase (Dako Cytomation, USA), diluído 1:7500. Os sinais foram gerados por quimioluminescência usando um substrato quimioluminescente para western (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) e visualizado pela exposição em um filme de revelação (Amersham Hyperfilm ECL) por 10 minutos. Para a realização da análise quantitativa, os blots foram incubados com o anticorpo anti-dineína produzido em camundongo (anti-dynein, Santa Cruz Biotechnology, CA), diluído 1:5000 e usado como um padrão interno. A quantificação da intensidade da coloração das bandas foi realizada no programa ImageJ (National Institutes of Health, MD). Os dados referentes à expressão da proteína TH foram normalizados pela expressão da dineína (~72 kDa) na mesma amostra.

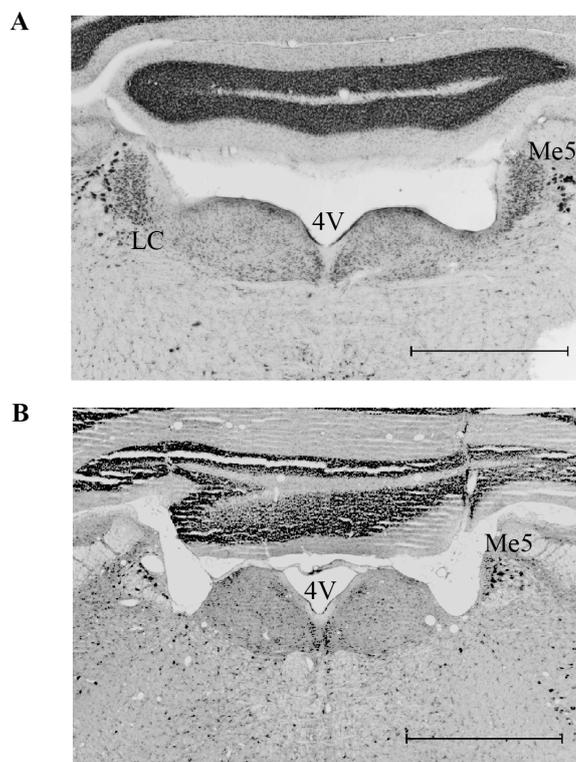
### **3.19. Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância ANOVA de uma via (*One-way*) ou de duas vias (*Two-way*) seguida de pós-teste para múltiplas comparações de Newman-Keuls ou de Bonferroni, respectivamente. A análise estatística dos resultados obtidos nos experimentos 1 e 3, bem como dos referentes à incubação *in vitro* obtidos no experimento 4 foi realizada por ANOVA two-way. A análise dos demais resultados obtidos nos experimentos 2 e 4 foi realizada por ANOVA one-way. O nível crítico foi fixado em 5% ( $P < 0.05$ ) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significantes.

## **Resultados**

### **4.1. Lesão eletrolítica do locus coeruleus (LC)**

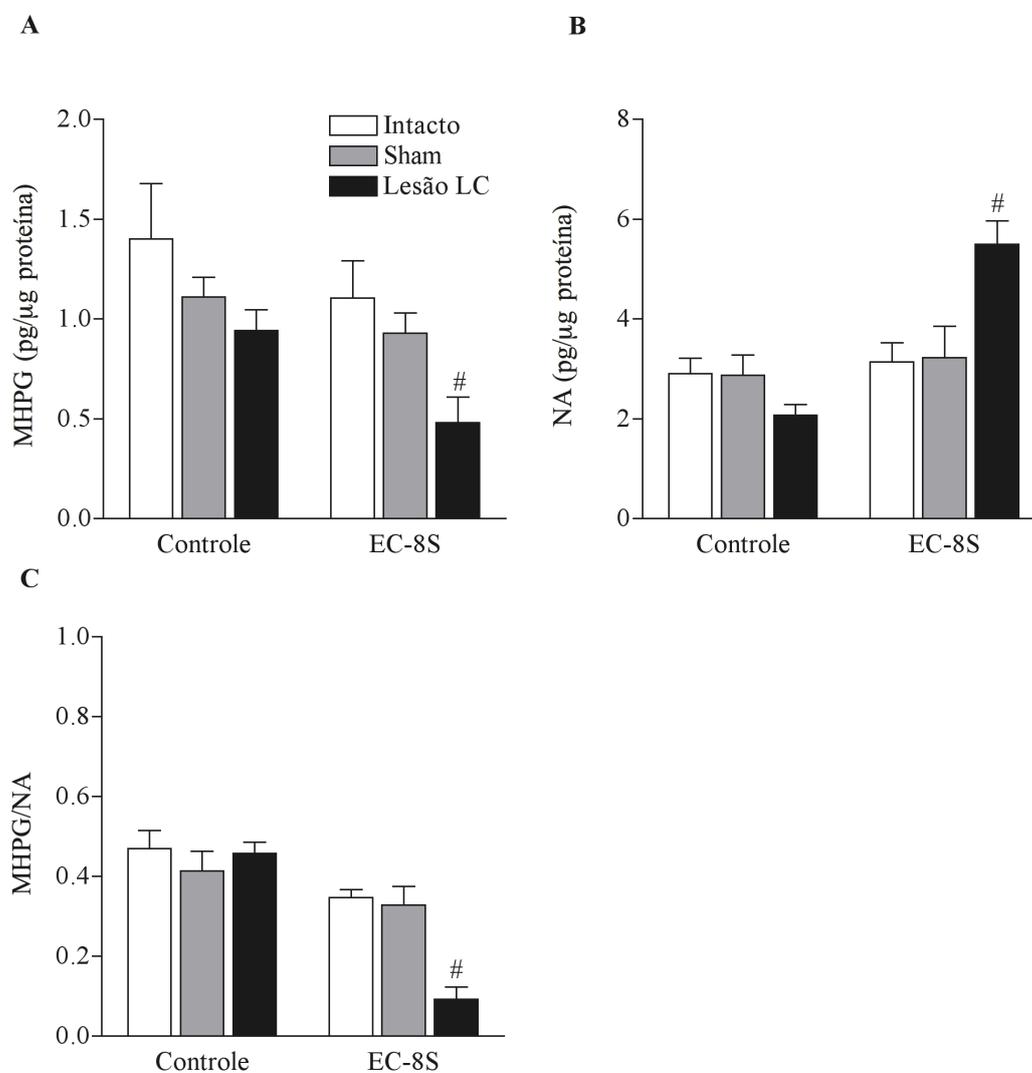
Fotomicrografias representativas do LC intacto e lesado são mostradas na figura 1, A e B, respectivamente. Somente dados de ratos com lesão total do LC foram incluídos no grupo lesão LC.



**Figura 1.** Fotomicrografias de secções coronais da região do tronco encefálico coradas com Nissl destacando o LC intacto (A) e lesado (B). As secções correspondem ao nível rostrocaudal do tronco encefálico, aproximadamente 9.8 mm posterior ao bregma. 4V, quarto ventrículo; Me5, núcleo trigeminal mesencefálico. Escala, 1mm.

#### 4.2. Efeito da lesão do LC e do estresse por frio na atividade simpática ovariana

Após 8 semanas de estresse, os níveis de NA e MHPGH não foram alterados nos ovários das ratas do grupo Intacto e Sham. No entanto, nos animais do grupo lesão do LC, houve um aumento significativo no conteúdo de NA ( $F_{2,17} = 7.6$ ;  $P < 0.05$ ) e uma queda no conteúdo de MHPG ( $F_{2,17} = 1.78$ ;  $P < 0.05$ ) e na razão MHPG/NA ( $F_{2,17} = 16.78$ ;  $P < 0.05$ ). Nos animais não submetidos ao estresse, a lesão do LC não alterou a atividade simpática ovariana (Fig. 2).

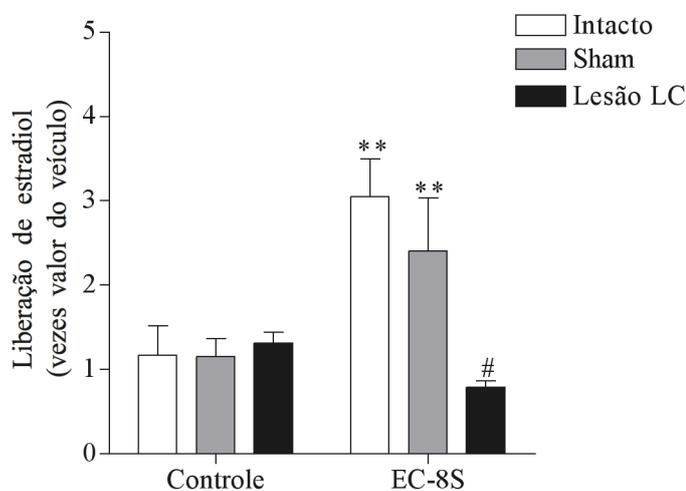


**Figura 2.** Atividade simpática ovariana de ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio e à lesão do locus coeruleus (LC). Ratas adultas com lesão eletrolítica do LC (grupo lesão LC, n = 3-4), cirurgia fictícia (grupo sham, n = 4) ou sem manipulação do SNC (grupo intacto, n = 4)

foram submetidas a sessões repetidas de estresse por frio (3h/dia) durante 8 semanas (EC-8S) ou mantidas em temperatura ambiente (controle). O ovário foi colhido após a última sessão de estresse no dia do estro, e metade dele foi utilizado para as dosagens de noradrenalina (NA) e seu metabólito, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) por HPLC/ED. Os dados representam a média  $\pm$  EPM das concentrações de MHPG (A) e NA (B) no ovário e da razão MHPG/NA (C). #,  $P < 0.05$  vs. Intacto e Sham.

#### 4.3. Efeito da lesão do LC e do estresse por frio na liberação *in vitro* de estradiol induzida por hCG

A liberação *in vitro* de estradiol pelo tecido ovariano incubado com o tampão bicarbonato krebs-ringer não foi diferente entre os grupos estudados (valor médio:  $2.22 \pm 0.15$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  tecido/mL). Comparado aos valores do veículo, a incubação com hCG não alterou a liberação de estradiol nos ovários dos animais controle mas aumentou significativamente a liberação deste hormônio nos animais submetidos a 8 semanas de estresse por frio ( $F_{1,28} = 9.15$ ;  $P < 0.01$ ). Este aumento da liberação de estradiol induzida por hCG foi prevenida pela lesão do LC ( $F_{2,28} = 6.21$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

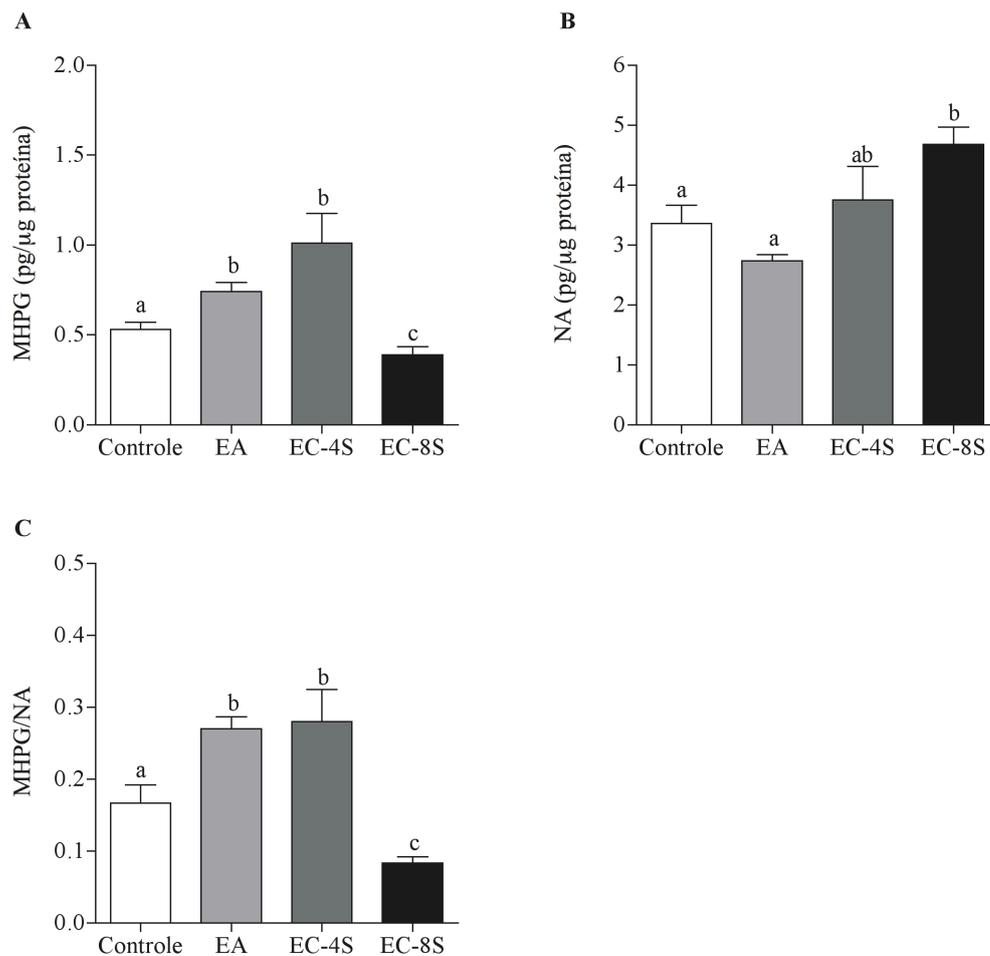


**Figura 3.** Liberação *in vitro* de estradiol induzida por hCG em ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio e à lesão do locus coeruleus (LC). Ratas com lesão eletrolítica do LC (grupo lesão LC, n = 5), cirurgia fictícia (grupo sham, n = 5-6) ou sem manipulação do SNC (grupo intacto, n = 6) foram submetidas a sessões repetidas de estresse por frio (3h/dia) durante 8 semanas (EC-8S) ou mantidas à temperatura ambiente (controle). O ovário esquerdo foi colhido após a última sessão de estresse no dia do estro, e metade dele foi utilizada para a incubação *in vitro*. Esta metade foi dividida em 2 partes das quais 1 foi incubada em tampão bicarbonato Krebs-Ringer (veículo) e outra em tampão + 2.5 IU de hCG. Após 3 horas o meio de incubação foi coletado para dosagem de estradiol. Os dados (média  $\pm$  EPM) são expressos em relação à

liberação de estradiol do grupo veículo do mesmo ovário (considerado igual a 1). \*\*,  $P < 0.01$  vs. grupo controle; #,  $P < 0.05$  vs. Intacto e Sham no grupo EC-8S.

#### 4.4. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na atividade simpática ovariana

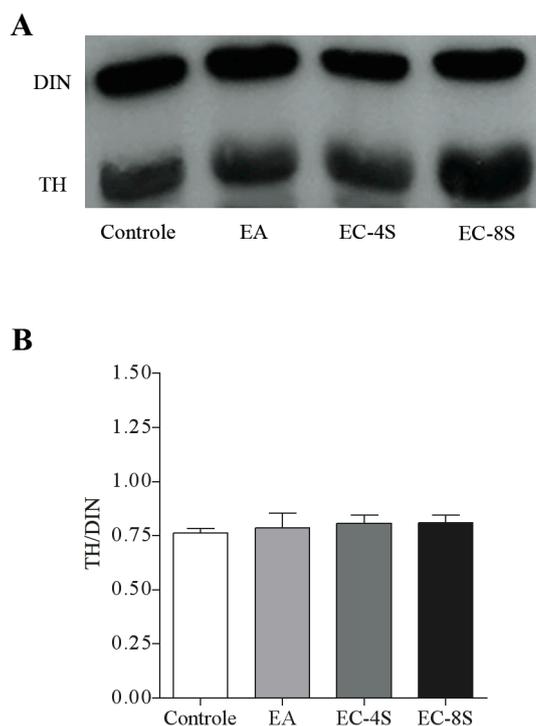
A concentração de MHPG ( $F_{3,20} = 14.1$ ;  $P < 0.001$ ) e a razão MHPG/NA ( $F_{3,20} = 24.4$ ;  $P < 0.001$ ) aumentaram de forma significativa no ovário de ratas do grupo EA e EC-4S, e diminuíram nos ovários dos animais do grupo EC-8S, quando comparado com às do grupo controle (Fig. 4A, C). As concentrações ovarianas de NA não foram alteradas nos animais do grupo EA, mas tenderam a um aumento nos animais do grupo EC-4S, e foram aumentadas significativamente nas ratas do grupo EC-8S ( $F_{3,20} = 5.6$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig. 4B).



**Figura 4.** Atividade simpática ovariana de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas com ciclo estral regular submetidas ao estresse por frio agudo (EA, n = 5), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S, n = 5) ou 8 (EC-8S, n = 7) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle, n = 7) foram decapitadas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estro. O ovário esquerdo foi removido e utilizado para as dosagens de noradrenalina (NA) e seu metabólito, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). Os dados representam a média  $\pm$  EPM das concentrações de MHPG (A) e NA (B) no ovário e da razão MHPG/NA (C). Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por letras diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.5. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na expressão de TH no ovário

A figura 5A mostra a expressão das proteínas TH e DIN detectadas por western blotting no ovário de ratas do grupo C, EA, EC-4S e EC-8S. A análise densitométrica dos blots mostrou que a razão TH/DIN foi inalterada pelos diferentes modelos de estresse por frio ( $P = 0.79$ ) (Fig. 5B).

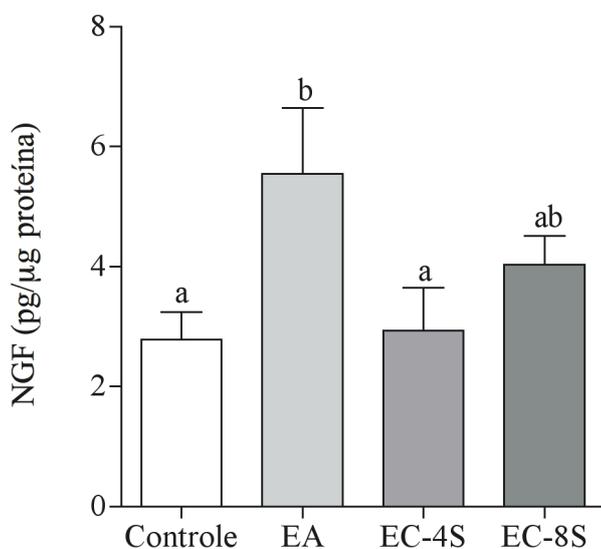


**Figura 5.** Expressão de tirosina hidroxilase (TH) no ovário de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas submetidas ao estresse por frio agudo (EA, n = 5), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S, n = 5) ou 8 (EC-8S, n = 7) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle, n = 7) foram decapitadas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estro. O ovário direito foi removido e dividido em 2 partes e em uma delas foi analisado a expressão das proteínas TH e dineína (DIN) por western blotting. (A)

Fotomicrografias das bandas de TH e DIN no ovário de ratas controle, EA, EC-4S e EC-8S. (B) Média  $\pm$  EPM da razão TH/DIN no ovário.

#### 4.6. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na concentração de NGF no ovário

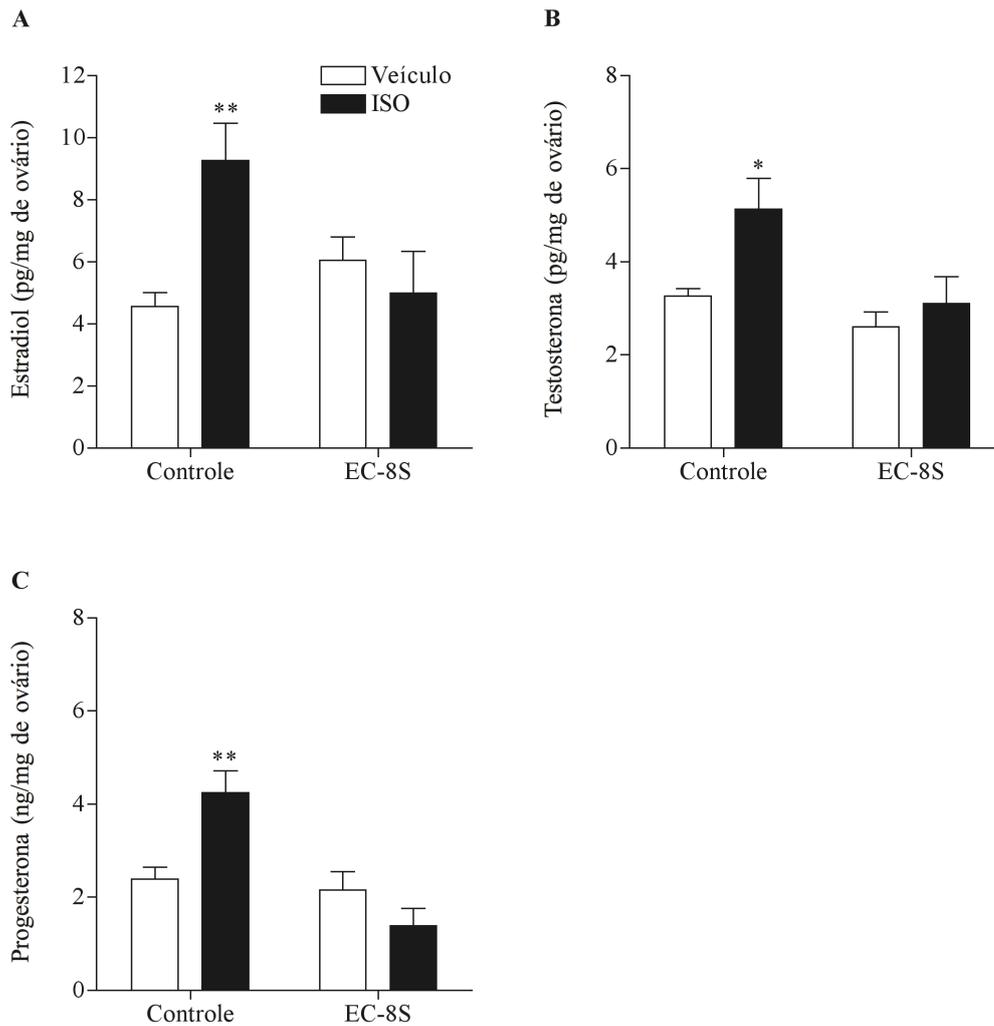
A concentração de NGF foi significativamente aumentada no ovário dos animais do grupo EA e retornou para os níveis controle nos grupos EC-4S e EC-8S ( $F_{3,20} = 3.3$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 6).



**Figura 6.** Concentração do fator de crescimento neural (NGF) no ovário de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas submetidas ao estresse por frio agudo (EA,  $n = 5$ ), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S,  $n = 5$ ) ou 8 (EC-8S,  $n = 7$ ) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle,  $n = 7$ ) foram decapitadas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estro. O ovário direito foi removido e dividido em 2 partes e em uma das partes foi dosado o conteúdo de NGF por ELISA. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM da concentração de NGF no ovário. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por letras diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### ***4.7. Efeito do estresse por frio crônico na resposta esteroïdal ovariana à estimulação $\beta$ -adrenérgica***

A liberação *in vitro* de esteróides de ovários incubados com veículo não foi diferente entre o grupo controle e EC-8S. A incubação com isoproterenol aumentou a liberação de estradiol ( $F_{1,18} = 9.4$ ;  $P < 0.01$ ), testosterona ( $F_{1,18} = 6.1$ ;  $P < 0.05$ ) e progesterona ( $F_{1,18} = 11.8$ ;  $P < 0.01$ ) no grupo controle comparado com o veículo. No entanto, o isoproterenol não alterou a liberação destes hormônios no grupo EC-8S.

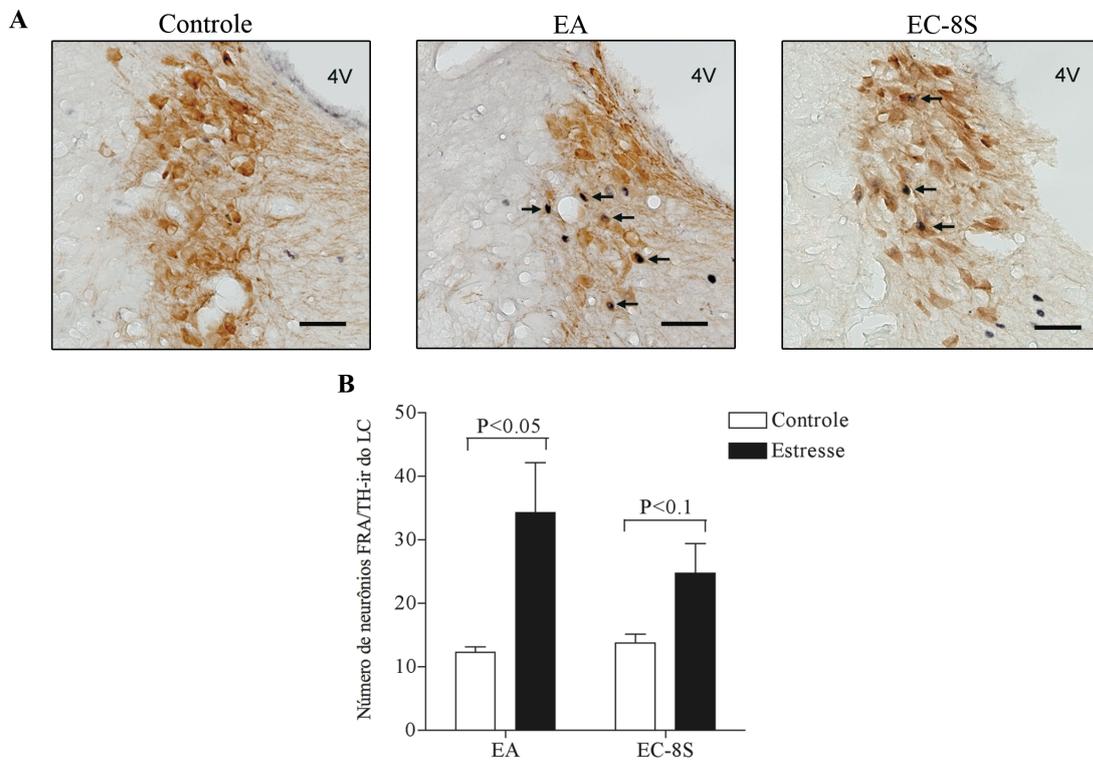


**Figura 7.** Liberação *in vitro* de hormônios esteróides ovarianos induzida por isoproterenol em ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio. Ratas submetidas ao estresse por frio crônico intermitente (3 h/dia) durante 8 semanas (EC-8S, n = 5) ou mantidas em temperatura ambiente (controle, n = 6) foram perfundidas após a última sessão de estresse no dia do estro. Antes da perfusão, o ovário esquerdo foi removido e dividido em 2 partes. Uma parte foi incubada em 2 mL de tampão bicarbonato Krebs-Ringer (veículo) e a outra parte incubada no mesmo volume do tampão + 10  $\mu$ M de isoproterenol (ISO). Após 3 horas o meio de incubação foi coletado para dosagem de estradiol, testosterona e progesterona por RIA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de estradiol (A), testosterona (B) e progesterona (C) liberados no meio de incubação e normalizados pelo peso do tecido. \*\*,  $P < 0.01$  \*,  $P < 0.05$  comparado ao veículo.

#### 4.8. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na atividade dos neurônios do LC

A figure 8A mostra a expressão de FRA em neurônios do LC de animais submetidos ao estresse por frio agudo ou intermitente por 8 semanas. O número de neurônios TH-ir expressando FRA, determinado bilateralmente no LC, é mostrado na figura 8B. Como determinado por ANOVA two-way, o número de neurônios FRA/TH-ir foi significativamente aumentado pelo estresse por frio ( $F_{1,12} = 12.53$ ;  $P < 0.01$ ), sem diferença entre estresse agudo e crônico ( $F_{1,12} = 0.79$ ;  $P = 0.39$ ). Quando comparados

com seus respectivos controles, o estresse agudo aumentou significativamente a expressão de FRA no LC ( $t_{12} = 3.35$ ;  $P < 0.05$ ); após 8 semanas de estresse este aumento foi menor e não significativo ( $P < 0.1$ ;  $t_{12} = 2.04$ ).

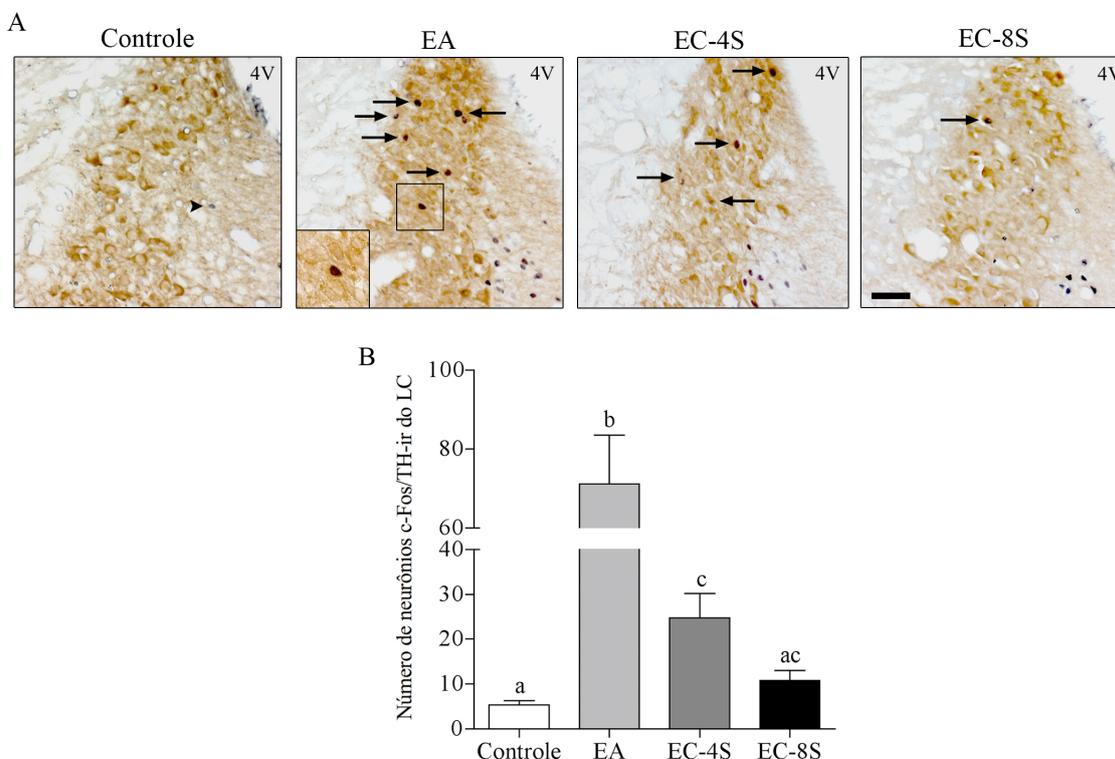


**Figura 8.** Expressão de FRA em neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC) de ratas submetidas ao estresse por frio agudo (EA) ou crônico por 8 semanas (EC-8S). Ratas com ciclo estral regular submetidas ao estresse por frio agudo ( $n = 4$ ) ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 8 semanas ( $n = 4$ ), ou mantidas à temperatura ambiente (controle,  $n = 4$ ) foram perfundidas imediatamente após o término da última sessão de estresse no dia do estro. (A) Fotomicrografias de secções coronais do LC duplamente marcadas para FRA/tirosina-hidroxilase (TH) de ratas controle, EA e EC-8S. Setas indicam neurônios duplamente marcados (a marcação para TH é citoplasmática e a de FRA é nuclear). 4V, quarto ventrículo. Escala = 50  $\mu$ m. (B) Média  $\pm$  EPM do número de neurônios FRA/TH-ir no LC.

#### 4.9. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na atividade dos neurônios do LC

A figura 9A mostra a expressão de c-Fos no LC de ratas dos grupos C, EA, EC-4S e EC-8S. O número de neurônios TH-ir expressando c-Fos, determinado bilateralmente no LC, é mostrado na figura 9B. Enquanto que os animais submetidos ao estresse agudo apresentaram um aumento expressivo no número de neurônios c-Fos/TH-ir, um aumento menor foi encontrado nas ratas do grupo EC-4S ( $F_{3,16} = 20.1$ ;  $P$

< 0.001), e diferença não significativa foi detectada no grupo EC-8S, quando comparado com o grupo controle.

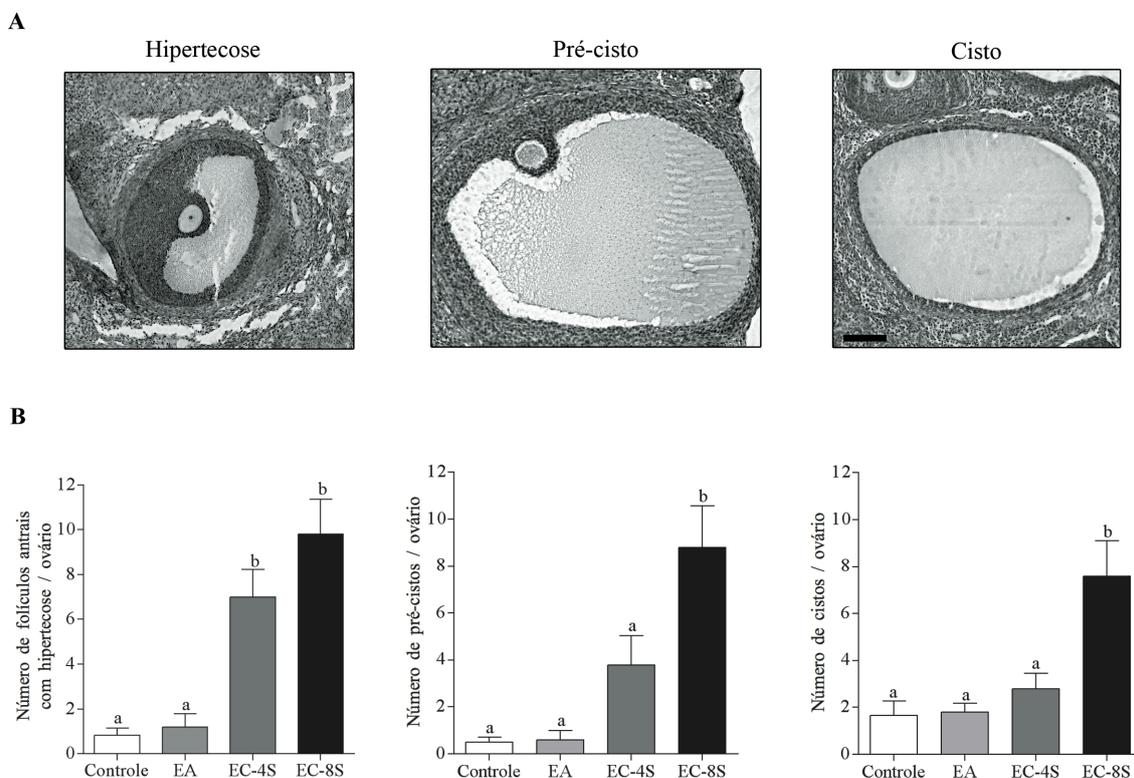


**Figura 9.** Expressão de c-Fos em neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC) de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas submetidas ao estresse por frio agudo (EA, n = 5), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S, n = 5) ou 8 (EC-8S, n = 4) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle, n = 6) foram perfundidas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estudo. (A) Fotomicrografias de seções coronais do LC duplamente marcadas para c-Fos/tirosina-hidroxilase (TH) de ratas controle, EA, EC-4S e EC-8S. Setas indicam neurônios duplamente marcados (a marcação para TH é citoplasmática e a de c-Fos é nuclear). Cabeça da seta indica marcação simples para c-Fos. Em detalhe, neurônio duplamente marcado mostrado em maior aumento. 4V, quarto ventrículo. Escala = 50  $\mu$ m. (B) Média  $\pm$  EPM do número de neurônios c-Fos/TH-ir no LC. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por letras diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.10. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico na morfologia ovariana

A figura 10A mostra fotomicrografias de folículos antrais com hipertecose, pré-cistos e cistos foliculares no ovário de ratas do grupo C, EA, EC-4S e EC-8S. A análise morfológica dos ovários mostrou que o número de folículos antrais com hipertecose foi aumentado nos animais do grupo EC-4S e EC-8S comparado com os do grupo controle ( $F_{3,17} = 19.7$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 10B). No entanto, aumentos significativos no número de

pré-cistos ( $F_{3,17} = 13.6$ ;  $P < 0.001$ ) e cistos ( $F_{3,17} = 10.1$ ;  $P < 0.001$ ) foram encontrados somente nos ovários dos animais do grupo EC-8S (Fig. 10B).

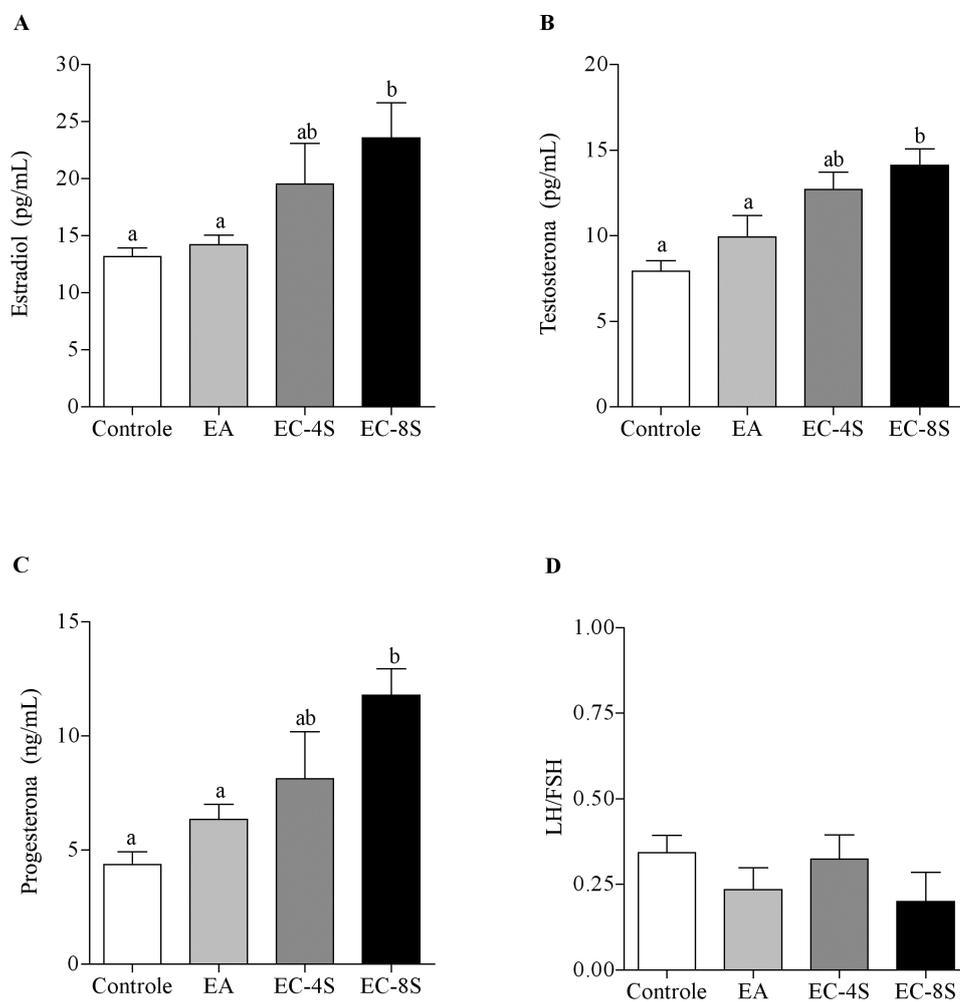


**Figura 10.** Alterações na morfologia ovariana de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas com ciclo estral regular submetidas ao estresse por frio agudo (EA,  $n = 5$ ), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S,  $n = 5$ ) ou 8 (EC-8S,  $n = 5$ ) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle,  $n = 6$ ) foram perfundidas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estro. Antes da perfusão, o ovário direito foi retirado, fixado e impregnado em parafina para análise morfológica. (A) Fotomicrografias de um folículo antral com hipertrofia da camada tecal (Hipertecose), pré-cisto e cisto. Escala = 100  $\mu\text{m}$ . (B) Média  $\pm$  EPM do número de folículos antrais com hipertecose, pré-cistos e cistos no ovário de ratas controle, EA, EC-4S e EC-8S. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por letras diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.11. Efeito do estresse por frio agudo ou crônico nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas e hormônios esteróides ovarianos

O estresse por frio agudo não alterou as concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona e progesterona. Embora uma tendência de aumento tenha sido detectada nos animais do grupo EC-4S, os níveis plasmáticos de estradiol ( $F_{3,20} = 4.8$ ;  $P < 0.05$ ),

testosterona ( $F_{3,20} = 8.2$ ;  $P < 0.001$ ) e progesterona ( $F_{3,20} = 8.3$ ;  $P < 0.001$ ) foram significativamente aumentados somente nos animais do grupo EC-8S, quando comparado com os valores do grupo controle (Fig. 11, A, B e C). Tanto os níveis plasmáticos de LH quanto de FSH não foram alterados pelos diferentes paradigmas de estresse (em média as concentrações foram:  $2.32 \pm 0.28$  ng/mL para o LH e  $8.55 \pm 0.40$  ng/mL para o FSH, dados não mostrados). Da mesma forma a relação LH/FSH também não foi alterada (Fig. 11D).



**Figura 11.** Concentrações plasmáticas de hormônios esteróides e gonadotrofinas de ratas submetidas ao estresse por frio agudo ou crônico. Ratas submetidas ao estresse por frio agudo (EA,  $n = 5$ ), ou crônico intermitente (3 h/dia) durante 4 (EC-4S,  $n = 5$ ) ou 8 (EC-8S,  $n = 7$ ) semanas, ou mantidas em temperatura ambiente (controle,  $n = 7$ ) foram decapitadas imediatamente após a última sessão de estresse no dia do estro. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de estradiol (A), testosterona (B), progesterona (C)

e da razão LH/FSH (D). Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por letras diferentes ( $P < 0.05$ ).

### ***Discussão***

O presente estudo demonstra que as mudanças dinâmicas na atividade do locus coeruleus (LC) e sistema nervoso simpático ovariano em resposta ao estresse por frio podem estar envolvidos com o desenvolvimento folicular anormal e aumento da secreção de esteróides ovarianos responsáveis pela instalação do quadro de SOP em ratas. A queda acentuada da atividade simpática ovariana em animais estressados com lesão do LC é consistente com um papel central deste núcleo no controle autonômico da função ovariana durante a indução da SOP pelo estresse.

Embora a atividade do sistema nervoso simpático ovariano e dos neurônios do LC tenha sido marcadamente aumentada durante pelo menos as primeiras 4 semanas de estresse, ao longo das últimas semanas parece ter havido uma adaptação destes sistemas, uma vez que tanto a atividade do LC quanto a liberação de noradrenalina no ovário estavam bastante diminuídas após 8 semanas de estresse. No entanto, vimos também que o estabelecimento da morfologia ovariana típica da SOP, que inclui a presença de pré-cistos e cistos, só ocorre após 8 semanas de estresse por frio, apesar da baixa atividade simpática ovariana neste momento. Este fato sugere que as alterações no desenvolvimento folicular poderiam ter sido iniciadas durante as primeiras semanas de estresse quando a atividade simpática ovariana está aumentada o que leva, em longo prazo, o estabelecimento do quadro de SOP. De fato, os aumentos no número de folículos antrais com hipertecose, pré-cistos e cistos foram precedidos por uma redução significativa no número de folículos pré-antrais saudáveis já nas primeiras 3 semanas de estresse (Dorfman, Arancibia *et al.*, 2003). A ausência de aumentos no número de folículos atresícos e o acúmulo de folículos antrais saudáveis e anormais no ovário de animais submetidos a 3 e 4 semanas de estresse por frio, respectivamente, sugere um comprometimento do processo de recrutamento folicular iniciado já nas primeiras semanas de estresse (Dorfman, Arancibia *et al.*, 2003).

Como o aumento no recrutamento de folículos é outra característica marcante da SOP (Webber, Stubbs *et al.*, 2003; Franks, Mason *et al.*, 2000) é provável que o agravamento das alterações morfológicas induzidas pelo estresse por frio seja iniciado por alterações nos mecanismos de controle do recrutamento folicular. Como a

noradrenalina está envolvida tanto com a aquisição de receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH) pelos folículos pré-antrais (Mayerhofer, Dissen *et al.*, 1997) quanto com a amplificação do efeito do LH sobre as células da teca (Dyer and Erickson, 1985) nos folículos antrais, é provável que o aumento deste neurotransmissor no microambiente ovariano durante as primeiras semanas de estresse tenha aumentado a responsividade ovariana à estimulação gonadotrófica e assim contribuído para o aumento do recrutamento folicular.

O aumento na secreção *in vitro* de estradiol após estimulação gonadotrófica no ovário de animais submetidos a 8 semanas de estresse por frio mostrado neste estudo, sugere que os efeitos iniciais da noradrenalina na responsividade ovariana persistem a longo prazo mesmo na ausência de aumentos significativos na liberação intraovariana deste neurotransmissor. Além disso, o fato de que o tratamento *in vivo* de ratas com o agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, aumenta a secreção de andrógenos ovarianos e induz a formação de cistos foliculares apenas 8 semanas após sua administração (Lara, Dorfman *et al.*, 2002), reforça a idéia de um efeito tardio do aumento da atividade simpática ovariana na instalação do quadro de SOP.

Além da noradrenalina, outro componente do sistema nervoso simpático, o fator de crescimento neural (NGF), também parece participar do controle do desenvolvimento folicular ovariano em roedores (Dissen, Garcia-Rudaz *et al.*, 2009a; Salas, Julio-Pieper *et al.*, 2006). O NGF é uma neurotrofina produzida por células não-neuronais ovarianas e associada não somente com a manutenção dos terminais simpáticos, mas também com a proliferação e diferenciação das células da teca (Dissen, Parrott *et al.*, 2000). A ação do NGF na função das células da teca pode ocorrer diretamente via seu receptor de baixa afinidade (p75 NGFR), o mais abundante receptor de neurotrofinas presente nas células tecais (Dissen, Hirshfield *et al.*, 1995), ou indiretamente através de sua bem estabelecida ação trófica na inervação simpática ovariana (Lara, Hill *et al.*, 1990). Excessos intraovarianos na produção de NGF têm sido diretamente associados com hipertrofia da camada tecal de folículos antrais de roedores, bem como produção exagerada de andrógenos pelo ovário, mas não são capazes de induzir o surgimento de cistos foliculares (Dissen, Lara *et al.*, 2000).

A ausência de aumentos significativos nas concentrações ovarianas de NGF após a quarta e oitava semana de estresse, períodos nos quais surgem os pré-cistos e cistos foliculares na rata, também sugerem a ausência de uma contribuição direta desta

neurotrofina no desenvolvimento dos cistos ovarianos. Por outro lado, o aumento nas concentrações de NGF no ovário de ratas submetidas ao estresse por frio agudo não exclui um efeito desta neurotrofina no desenvolvimento de folículos antrais com hipertecose durante pelos menos as 3 primeiras semanas de estresse. A diferença de resposta do efeito do estresse por frio de 4 semanas na concentração de NGF entre nosso estudo e o publicado por Dorfman e colaboradores (Dorfman, Arancibia *et al.*, 2003) reside no fato de que estes últimos utilizaram ovários de ratas em diferentes fases do ciclo estral, enquanto que no presente foi apenas utilizado animais na fase de estro. Este fato é relevante uma vez que a atividade do sistema nervoso simpático ovariano varia ao longo do ciclo estral da rata apresentando maior atividade na tarde do proestro e retorno para níveis mais baixos de atividade ao longo das fases seguintes do ciclo (Wolf, Meier-Fleitmann *et al.*, 1986). Como o NGF está intimamente relacionado com a atividade dos nervos simpáticos do ovário (Lara, Hill *et al.*, 1990) é provável que os níveis intraovarianos de NGF também variem durante o ciclo estral.

Como mencionado anteriormente, outro papel importante do NGF produzido no ovário é garantir a manutenção a longo prazo da atividade dos nervos simpáticos através da estimulação da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) (Lara, Hill *et al.*, 1990; Lara, McDonald *et al.*, 1990). De acordo com os níveis inalterados de NGF no ovário de ratos expostos a 4 ou 8 semana de estresse por frio, a expressão de TH no ovário não foi também alterada pelo estresse. Tem sido demonstrado que embora o estresse por frio induza um aumento rápido de RNAm para TH na glândula adrenal, aumentos na expressão da proteína TH só ocorrem após 24 horas de exposição crônica ao frio (Baruchin, Weisberg *et al.*, 1990). Assim, tanto mecanismos transcripcionais quanto pós-transcripcionais parecem desempenhar um papel importante na expressão da proteína TH durante o estresse, o que parece explicar o longo período necessário para tradução do RNAm da TH (Xu, Chen *et al.*, 2007). A ausência de efeito do NGF na expressão da TH após o estresse agudo, quando os níveis de NGF estão aumentados, pode sugerir que um período maior que 3 horas seja necessário para a ativação da síntese de TH pelo NGF.

O aumento no número de folículos antrais com hipertecose e pré-cistos tem sido associado com a produção excessiva de esteróides ovarianos uma vez que estas estruturas apresentam um maior número de camadas de células da granulosa, bem como hipertrofia da camada tecal quando comparado com folículos antrais sadios de mesmo

diâmetro (Dissen, Lara *et al.*, 2000). Além disso, é provável que o aporte enzimático envolvido na síntese de esteróides também esteja aumentado nestes folículos, visto que culturas de células da granulosa e teca de ovários de mulheres com SOP secretam maiores quantidades de progesterona, estradiol e testosterona quando comparado com ovários de mulheres normais (47-49).

Tendências de aumentos nos níveis plasmáticos de estradiol, testosterona e progesterona encontrados após 4 semanas de estresse por frio e o aumento significativo destes hormônios após 8 semanas de estresse sugerem uma correlação funcional entre morfologia ovariana e secreção aumentada de esteróides durante a indução da SOP pelo estresse. Estes dados confirmam nossos resultados anteriores no que se refere ao aumento da secreção de estradiol e testosterona após 8 semanas de estresse. Entretanto, no trabalho anterior, no qual as ratas foram anestesiadas no sacrifício, não foi detectado um aumento significativo na secreção de progesterona, o que foi observado no presente estudo. É possível que esta discrepância de resultados deva-se à anestesia uma vez que ela aumenta a secreção de progesterona (Bruce, Willcox *et al.*, 1984).

Apesar do aumento das concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona, as concentrações de LH e FSH não foram modificadas. É provável que o aumento de andrógenos plasmáticos tenha comprometido o mecanismo de retroalimentação negativa exercido pelos esteróides ovarianos nos neurônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) hipotálâmicos como descrito em roedores (Foecking, McDevitt *et al.*, 2008) e humanos (Pastor, Griffin-Korf *et al.*, 1998; Eagleson, Gingrich *et al.*, 2000). Embora a relação LH/ FSH não tenha sido alterada durante o estresse por frio agudo ou crônico na tarde do dia do estro, período no qual os níveis plasmáticos de LH e FSH estão baixos na rata (Smith, Freeman *et al.*, 1975), alterações na secreção destes hormônios durante outras fases do ciclo estral não podem ser totalmente descartadas. Por outro lado, a redução na frequência de proestros associada com o prolongamento da fase de estro bem como queda significativa no número de oócitos na tuba uterina de ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio parecem estar mais relacionadas com alterações morfofuncionais ovarianas do que distúrbios na secreção de gonadotrofinas (Bernuci, Szawka *et al.*, 2008).

Tanto as alterações morfológicas e endócrinas ovarianas observadas na SOP induzida pelo estresse por frio (Bernuci, Szawka *et al.*, 2008), quanto o aumento da responsividade ovariana à estimulação gonadotrófica observada no presente trabalho

foram prevenidas pela lesão do LC. Assim, é provável que o LC module a atividade dos nervos simpáticos que se projetam para o ovário durante o desenvolvimento da SOP induzida pelo estresse. A correlação temporal entre a atividade dos neurônios do LC e a do sistema nervoso simpático ovariano em resposta ao estresse por frio agudo e crônico sugere uma interação funcional entre os neurônios do LC e os nervos simpáticos que se projetam para o ovário. Enquanto o estresse agudo e crônico intermitente por 4 semanas levou a um aumento nas atividades do LC e sistema nervoso simpático ovariano, um menor grau de atividade foi encontrada em ambos sistemas após 8 semanas de estresse.

Um padrão similar de correlação funcional parece também ocorrer durante o ciclo estral, uma vez que a análise da expressão de FRA no LC e medidas da liberação intraovariana de noradrenalina, pela técnica de *push-pull*, mostram que tanto a atividade do LC quanto a liberação de noradrenalina no ovário aumentam na tarde do proestro e retornam para os níveis basais no diestro (Szawka, Rodovalho *et al.*, 2009; Wolf, Meier-Fleitmann *et al.*, 1986). É provável que esta interação ocorra diretamente pelas projeções do LC para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinhal, ou indiretamente pelas projeções deste núcleo para outras áreas cerebrais envolvidas no controle autonômico (Gerendai, Toth *et al.*, 2009; Samuels and Szabadi, 2008a). De qualquer forma, estes dados são consistentes com a hipótese de que a atividade do LC e do sistema nervoso simpático ovariano estão funcionalmente correlacionadas. Além disso, como nós não detectamos nenhuma alteração na expressão ovariana da enzima TH nos diferentes paradigmas de estresse por frio, nós supomos que os níveis aumentados de noradrenalina encontrados no ovário após 8 semanas de estresse se deve a estocagem deste neurotransmissor nas vesículas sinápticas, devido à diminuição da liberação, em vez de aumento na síntese. O fato de que a atividade simpática ovariana foi diminuída nos animais estressados com lesão do LC suporta esta última sugestão.

A redução da atividade simpática ovariana após a oitava semana de estresse pode ser explicada tanto pelo desenvolvimento de mecanismos adaptativos locais no microambiente ovariano, bem como centrais no LC uma vez que este núcleo parece ser o principal modulador da atividade dos terminais simpáticos ovarianos. A *down regulation* de receptores adrenérgicos no ovário de ratas tratadas com VE em resposta a longos períodos de ativação dos terminais simpáticos ovarianos tem sido sugerido como um dos prováveis mecanismos adaptativos deste sistema à estimulação simpática

crônica (Barria, Leyton *et al.*, 1993a;Manni, Holmang *et al.*, 2005). A ausência de efeito do agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, em estimular a liberação de esteróides no ovário de ratas submetidas a 8 semanas de estresse por frio, observada neste estudo é sugestivo de uma *down regulation* dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e condizente com a adaptação do sistema nervoso simpático ovariano descrito no modelo do VE.

Como a indução da expressão de FRA e c-Fos, reconhecidos marcadores de atividade neuronal (Hughes and Dragunow, 1995), pelo estresse por frio nos neurônios do LC foi menos pronunciada após 8 semanas de estresse comparado com estresse agudo ou de 4 semanas, é possível que uma atenuação da responsividade do LC durante a exposição a longo prazo ao estresse por frio seja responsável pela redução da atividade simpática ovariana encontrada apenas após 8 semanas de estresse. A expressão de FRA ocorre tonicamente nos neurônios, e a queda na sua expressão tem sido também utilizada como indicativo de redução de atividade neuronal (Hoffman, Le *et al.*, 1994). Assim, dependendo do nível basal da expressão de FRA, sua expressão pode detectar tanto aumentos quanto quedas na atividade neuronal (Lerant, DeMaria *et al.*, 2001). Embora a expressão da proteína c-Fos no LC continue aumentada após 4 semanas de estresse, o número de neurônios imunorreativos é inferior ao encontrado após o estresse agudo, sugerindo uma progressão da resposta adaptativa ao longo das semanas de estresse que só é bem estabelecida após 8 semanas. O fato de que o pico de expressão de c-Fos ocorre dentro de 2 a 4 horas após o início do estímulo, e o retorno ao nível basal dentro de 6 a 8 horas e que a expressão de FRA persiste por mais de 24 horas (Sheng and Greenberg, 1990) pode explicar as diferenças quantitativas na expressão de FRA e c-Fos no LC mostradas no presente estudo em animais submetidos ao mesmo estímulo estressor.

Um perfil semelhante de resposta foi também observado em outros estudos e correlacionado com o surgimento de mecanismo adaptativos desencadeados em resposta a exposição crônica ao estresse (Miyata, Ishiyama *et al.*, 1995;Kiyohara, Miyata *et al.*, 1995;Featherby and Lawrence, 2004). O aumento da expressão de receptores adrenérgicos tipo alfa, envolvidos na inibição pré-sináptica noradrenérgica, nos neurônios do LC após a exposição crônica ao frio tem sido sugerido como um dos possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta adaptativa (Meyer, Palchadhuri *et al.*, 2000). Além disso, como tanto a expressão de FRA quanto a frequência de disparo dos neurônios do LC são drasticamente diminuídos pelo estradiol (Szawka, Rodovalho *et*

*al.*, 2009), podemos sugerir também que o aumento dos níveis plasmáticos de estradiol, iniciado após 4 semanas de estresse e atingindo níveis mais altos após 8 semanas, possa ser um dos fatores responsáveis pela diminuição da atividade do LC. Esta hipótese está de acordo com o efeito do estradiol em reduzir a expressão de c-Fos neste núcleo após o estresse de imobilização em ratas ovariectomizadas (Ueyama, Tanioku *et al.*, 2006).

Assim, embora a exposição prolongada ao estresse crônico e intermitente por frio tenha gerado respostas adaptativas centrais e periféricas, o aumento da atividade dos neurônios do LC e da atividade simpática ovariana durante as primeiras 4 semanas de estresse parece ser crucial para o desenvolvimento de alterações na morfologia ovariana e distúrbios endócrinos semelhantes àquelas descritas na SOP. A importância do LC nestes processos fica evidente nos dados que mostram que a lesão deste núcleo impede o desenvolvimento do quadro de SOP induzida por 8 semanas de estresse por frio (Bernuci, Szawka *et al.*, 2008) bem como diminui acentuadamente a liberação de noradrenalina no ovário dos animais estressados, como observado no presente estudo.

Em conjunto, os dados do presente estudo demonstram pela primeira vez uma relação funcional entre a atividade dos neurônios do LC, atividade simpática ovariana e secreção de hormônios esteróides durante o desenvolvimento da SOP induzida pelo estresse em ratas. O aumento da atividade simpática ovariana durante pelo menos as quatro primeiras semanas de estresse por frio pode ter sido a principal causa das alterações na foliculogênese que levaram às alterações endócrinas presentes na SOP. Estes resultados auxiliam o entendimento da complexa relação entre estresse, distúrbios no desenvolvimento folicular e secreção de esteróides na fisiopatologia da SOP.

### **Conclusão**

Os dados deste trabalho fornecem evidências que sustentam a hipótese de que o sistema nervoso simpático ovariano sob o controle do LC desempenha um importante papel na gênese da SOP induzida por estresse.

### **Referências**

1. Aguado LI. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc.Res.Tech.* 2002; 59 (6):462-473

2. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 1982; 110 (4):1124-1132
3. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Amant-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report 1. *Fertil.Steril.* 2009; 91 (2):456-488
4. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin.Endocrinol Metab* 2004; 89 (6):2745-2749
5. Baljet B, Drukker J. Some aspects of the innervation of the abdominal and pelvic organs in the human female fetus. *Acta Anat.(Basel)* 1982; 111 (3):222-230
6. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 1993; 133 (6):2696-2703
7. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 1993; 133 (6):2696-2703
8. Baruchin A, Weisberg EP, Miner LL, Ennis D, Nisenbaum LK, Naylor E, Stricker EM, Zigmond MJ, Kaplan BB. Effects of cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein, enzyme activity, and cofactor levels. *J Neurochem.* 1990; 54 (5):1769-1775
9. Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Rhoades TA, Bahr JM. Norepinephrine in the rat ovary: ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology* 1984; 115 (4):1426-1431

10. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* 2008; 149 (6):2907-2916
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72:248-254
12. Bruce NW, Willcox DL, Meyer GT, Waddell BJ. Effects of handling, anaesthesia, ovariectomy and adrenalectomy on serial measurements of plasma progesterone in 16-day pregnant rats. *J Endocrinol* 1984; 100 (2):189-193
13. Carmina E. Cardiovascular risk and events in polycystic ovary syndrome. *Climacteric.* 2009; 12 Suppl 1:22-25
14. Chang RJ. The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* 2007; 3 (10):688-695
15. Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin.North Am* 1992; 21 (4):833-858
16. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Ojeda SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Semin.Reprod.Med.* 2009; 27 (1):24-31
17. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* 2009; 150 (6):2906-2914
18. Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995; 136 (10):4681-4692

19. Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2000; 141 (3):1073-1082
20. Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology* 2000; 141 (12):4736-4750
21. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol.Reprod.* 2003; 68 (6):2038-2043
22. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr.Rev.* 1997; 18 (6):774-800
23. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 1985; 116 (4):1645-1652
24. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2000; 85 (11):4047-4052
25. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999; 22 (1):141-146
26. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2006; 91 (1):48-53
27. Featherby T, Lawrence AJ. Chronic cold stress regulates ascending noradrenergic pathways. *Neuroscience* 2004; 127 (4):949-960

28. Fiedler J, Jara P, Luza S, Dorfman M, Grouselle D, Rage F, Lara HE, Arancibia S. Cold stress induces metabolic activation of thyrotrophin-releasing hormone-synthesising neurones in the magnocellular division of the hypothalamic paraventricular nucleus and concomitantly changes ovarian sympathetic activity parameters. *J.Neuroendocrinol.* 2006; 18 (5):367-376
29. Foecking EM, McDevitt MA, costa-Martinez M, Horton TH, Levine JE. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents 1. *Horm.Behav.* 2008; 53 (5):673-692
30. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N.Engl.J.Med.* 1995; 333 (13):853-861
31. Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol.Cell Endocrinol* 2000; 163 (1-2):49-52
32. Genazzani AD. Neuroendocrine aspects of amenorrhea related to stress 1. *Pediatr.Endocrinol Rev.* 2005; 2 (4):661-668
33. Gerendai I, Kocsis K, Halasz B. Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microsc.Res.Tech.* 2002; 59 (6):474-483
34. Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Halasz B. Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrine.* 2009; 36 (2):179-188
35. Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 1998; 68 (4):244-256
36. Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 2005; 28 (3):319-324

37. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil.Steril.* 2001; 75 (6):1141-1147
38. Himelein MJ, Thatcher SS. Depression and body image among women with polycystic ovary syndrome. *J Health Psychol.* 2006; 11 (4):613-625
39. Hoffman GE, Le WW, Abbud R, Lee WS, Smith MS. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation 1. *Brain Res.* 1994; 654 (2):207-215
40. Hughes P, Dragunow M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol.Rev.* 1995; 47 (1):133-178
41. Jacobowitz D, Wallach EE. Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. *Endocrinology* 1967; 81 (5):1132-1139
42. Jedel E, Waern M, Gustafson D, Landen M, Eriksson E, Holm G, Nilsson L, Lind AK, Janson PO, Stener-Victorin E. Anxiety and depression symptoms in women with polycystic ovary syndrome compared with controls matched for body mass index 1. *Hum.Reprod.* 2010; 25 (2):450-456
43. Jedema HP, Finlay JM, Sved AF, Grace AA. Chronic cold exposure potentiates CRH-evoked increases in electrophysiologic activity of locus coeruleus neurons. *Biol.Psychiatry* 2001; 49 (4):351-359
44. Jiang XH, Guo SY, Xu S, Yin QZ, Ohshita Y, Naitoh M, Horibe Y, Hisamitsu T. Sympathetic nervous system mediates cold stress-induced suppression of natural killer cytotoxicity in rats 1. *Neurosci.Lett.* 2004; 358 (1):1-4
45. Kalantaridou SN, Makriganakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Stress and the female reproductive system. *J Reprod.Immunol.* 2004; 62 (1-2):61-68

46. Kaplan JR, Manuck SB. Ovarian dysfunction, stress, and disease: a primate continuum. *ILAR.J* 2004; 45 (2):89-115
47. Kiyohara T, Miyata S, Nakamura T, Shido O, Nakashima T, Shibata M. Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res.Bull.* 1995; 38 (2):193-201
48. Klein CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci.Lett.* 1988; 85 (2):217-222
49. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000; 141 (3):1059-1072
50. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AA, Ramirez VD. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc.Res.Tech.* 2002; 59 (6):495-502
51. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 1993; 133 (6):2690-2695
52. Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990; 126 (1):357-363
53. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990; 126 (1):364-375
54. Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L. Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine.* 2001; 15 (2):187-192

55. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet.Gynecol.Surv.* 2004; 59 (2):141-154
56. Lerant AA, DeMaria JE, Freeman ME. Decreased expression of fos-related antigens (FRAs) in the hypothalamic dopaminergic neurons after immunoneutralization of endogenous prolactin. *Endocrine.* 2001; 16 (3):181-187
57. Lookingland KJ, Ireland LM, Gunnet JW, Manzanares J, Tian Y, Moore KE. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations in discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Res.* 1991; 559 (1):82-88
58. Ma S, Morilak DA. Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2005; 17 (11):761-769
59. Manneras L, Cajander S, Lonn M, Stener-Victorin E. Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS. *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2009; 296 (4):R1124-R1131
60. Manni L, Holmang A, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E. Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Auton.Neurosci.* 2005; 118 (1-2):79-87
61. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum.Reprod.* 2010; 25 (2):544-551
62. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating

hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary.  
Endocrinology 1997; 138 (8):3320-3329

63. Meyer H, Palchoudhuri M, Scheinin M, Flugge G. Regulation of alpha(2A)-adrenoceptor expression by chronic stress in neurons of the brain stem. Brain Res. 2000; 880 (1-2):147-158
64. Miyata S, Ishiyama M, Shido O, Nakashima T, Shibata M, Kiyohara T. Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry. Neurosci.Res. 1995; 22 (2):209-218
65. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, III, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. Mol.Endocrinol. 1999; 13 (6):946-957
66. Nestler JE. Insulin regulation of human ovarian androgens  
1. Hum.Reprod. 1997; 12 Suppl 1:53-62
67. Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocr.Rev. 2001; 22 (4):502-548
68. Palkovits M, Jacobowitz DM. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). J.Comp Neurol. 1974; 157 (1):29-42
69. Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. J.Clin.Endocrinol.Metab 1998; 83 (2):582-590
70. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. J Clin.Endocrinol Metab 1988; 67 (3):460-464

71. Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR, Lara HE. Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* 2008; 149 (1):50-56
72. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2006; 91 (6):2396-2403
73. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organization. *Curr.Neuropharmacol.* 2008; 6 (3):235-253
74. Samuels ER, Szabadi E. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part II: Physiological and Pharmacological Manipulations and Pathological Alterations of Locus Coeruleus Activity in Humans. *Curr.Neuropharmacol.* 2008; 6 (3):254-285
75. Semenova II. [Adrenergic innervation of ovaries in Stein-Leventhal syndrome]. *Vestn.Akad.Med.Nauk SSSR* 1969; 24 (9):58-62
76. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990; 4 (4):477-485
77. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96 (1):219-226
78. Sosa ZY, Casais M, Rastrilla AM, Aguado L. Adrenergic influences on coeliac ganglion affect the release of progesterone from cycling ovaries: characterisation of an in vitro system. *J Endocrinol* 2000; 166 (2):307-318

79. Stein I, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935; 181-185
80. Stener-Victorin E, Jedel E, Janson PO, Sverrisdottir YB. Low-frequency electroacupuncture and physical exercise decrease high muscle sympathetic nerve activity in polycystic ovary syndrome. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2009; 297 (2):R387-R395
81. Stener-Victorin E, Jedel E, Manneras L. Acupuncture in polycystic ovary syndrome: current experimental and clinical evidence. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20 (3):290-298
82. Sverrisdottir YB, Mogren T, Kataoka J, Janson PO, Stener-Victorin E. Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2008; 294 (3):E576-E581
83. Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J.Neuroendocrinol.* 2009; 21 (7):629-639
84. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil.Steril.* 2004; 81 (1):19-25
85. Tian Y, Lookingland KJ, Moore KE. Contribution of noradrenergic neurons to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations in the regions of the rat brain containing incertohypothalamic dopaminergic neurons. *Brain Res.* 1991; 555 (1):135-140
86. Ueyama T, Tanioku T, Nuta J, Kujira K, Ito T, Nakai S, Tsuruo Y. Estrogen alters c-Fos response to immobilization stress in the brain of ovariectomized rats. *Brain Res.* 2006; 1084 (1):67-79
87. Valentino RJ, Foote SL, Page ME. The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993; 697:173-188

88. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin. Invest* 1998; 101 (12):2622-2629
89. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF, Jr. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1988; 66 (1):165-172
90. Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 1986; 7 (1):155-159
91. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary 1. *Lancet* 2003; 362 (9389):1017-1021
92. Weil SJ, Vendola K, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, Okafor J, Bondy CA. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *J Clin. Endocrinol Metab* 1998; 83 (7):2479-2485
93. Wolf R, Meier-Fleitmann A, Duker EM, Wuttke W. Intraovarian secretion of catecholamines, oxytocin, beta-endorphin, and gamma-amino-butyric-acid in freely moving rats: development of a push-pull tubing method. *Biol. Reprod.* 1986; 35 (3):599-607
94. Xu L, Chen X, Sun B, Sterling C, Tank AW. Evidence for regulation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by stress in rat adrenal medulla. *Brain Res.* 2007; 1158:1-10
95. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome; towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F (eds.), *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Scientific. 1992: 377-384



# 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](#)