

Luana Maria Silva Alves

EFEITOS DE ESTRÓGENO E DE PROGESTERONA NA
ATIVIDADE BASAL DO EIXO HIPOTÁLAMO HIPÓFISE ADRENAL

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Luana Maria Silva Alves

EFEITOS DE ESTRÓGENO E DE PROGESTERONA NA
ATIVIDADE BASAL DO EIXO HIPOTÁLAMO HIPÓFISE ADRENAL

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
mestre em Ciência.

Área de concentração: Fisiologia
Orientador: Dr. Celso Rodrigues Franci

Ribeirão Preto
2010

Dedicatória

Aos meus pais Luiz e Edna,
À minha irmã Tamara,
Ao Pauliano

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pela força e perseverança que me foram concedidas.

Agradeço ao prezado Professor Celso Rodrigues Franci por sua orientação, dedicação e pelo tratamento sempre cordial.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio e Profa. Dra Fernanda Klein Marcondes pelas sugestões e avaliação deste trabalho.

À Dra. Janete Anselmo-Franci, docente do departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto – USP e ao Dr. Guilherme de Araujo Lucas, docente do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela disponibilização do microscópio de fluorescência e o sistema de imagem.

Aos meus pais que não mediram esforços em prol do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Pauliano por estar sempre ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis.

Aos amigos de casa Tales, Mariana, Úrsula e Bianca pelo companheirismo e pelas horas agradáveis compartilhadas. Agradeço a Deus por ter colocados vocês na minha vida.

Aos amigos do laboratório Fabiana, Guillermo, Bruno, Iracema, Larissa, Camila, Leandro, Cármen e Waldecy, pela dedicação, disponibilidade, paciência e boa vontade em me ensinar tudo o que sabiam. Devo a vocês tudo que eu aprendi nesses anos.

Aos técnicos Rubens, Rogério e Marina pelo apoio técnico, ensinamentos, e amizade.

À FAPESP e CNPQ pelo auxílio financeiro.

Resumo

Há evidências de interação bidirecional dos eixos HPA e HPG envolvendo diferentes estruturas, entretanto, os mecanismos envolvidos são pouco compreendidos. Situações de estresse podem alterar a função reprodutiva, e hormônios gonadais podem modificar a resposta de estresse. O objetivo deste trabalho foi verificar se estrógeno (E_2) e progesterona (P_4) modificam a atividade basal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), analisada pelas secreções de corticosterona (CORT) e de P_4 e pelas expressões de receptores para corticosteróides (mineralocorticóides, MR e glicocorticóides, GR) em sítios cerebrais de retroalimentação do eixo HPA. Ratas Wistar adultas foram mantidas em ciclo claro-escuro de 12h e acesso livre à ração e água. O ciclo estral foi monitorado por esfregaço vaginal e a determinação da secreção de hormônio luteinizante (LH) foi realizada para confirmação do proestro. Seis amostras de sangue foram coletadas através de cateter na jugular, durante a tarde (13-18h), dos seguintes grupos de ratas: ovariectomizadas (OVX); controles em proestro; tratadas com antagonista de E_2 (tamoxifen) ou de P_4 (RU486), ou ambos; tratadas com os respectivos veículos dos antagonistas. O plasma foi separado e estocado para dosagens hormonais por radioimunoensaio. Após a última coleta de sangue, os animais foram anestesiados e perfundidos para remoção dos cérebros, que foram manipulados para verificação por imunofluorescência, da expressão de MR e de GR na região CA_1 e no subículo do hipocampo ventral, e de GR no núcleo paraventricular (PVN). Os resultados mostram que: a secreção de LH confirmou a fase de proestro; a secreção basal de CORT não foi alterada pelas manipulações de injeções nem pela remoção dos ovários; ocorreu pico de secreção de CORT e de P_4 às 14h em todos os grupos experimentais; os antagonistas de E_2 e de P_4 não alteraram a secreção total de CORT, porém o RU486 aumentou (às 13 e 15h) e o tamoxifen reduziu (às 15h) a concentração de CORT; um segundo pico de secreção de P_4 no final da tarde (17-18h) foi bloqueado pela ovariectomia e por Tamoxifen, e amplificado por RU486; o segundo pico de P_4 também não ocorreu em ratas tratadas com Tamoxifen e RU486; não houve alteração do número de neurônios com expressão de GR e MR na região CA_1 e no subículo do hipocampo ventral nem de GR no PVN. Em conclusão, nossos resultados indicam que: E_2 e P_4 podem exercer efeitos antagônicos sobre a secreção basal de CORT, respectivamente estimulatório e inibitório; os picos de secreção de P_4 têm origens diferentes, o primeiro (14h) da adrenal e o segundo (17-18h) do ovário; E_2 estimula a secreção ovariana de P_4 na tarde de proestro; E_2 e P_4 não alteram o número de neurônios que expressam GR e MR em sítios de retroalimentação do eixo HPA, mas não se pode descartar que alterem a atividade desses neurônios.

Abstract

There is evidence for a bidirectional communication between HPA and HPG axis involving different structures, however the involved mechanisms are poorly known. Stress situations may alter the reproductive function, and gonadal steroids may modify the stress response. The aim of this study was to verify if estrogen (E_2) and progesterone (P_4) can alter the basal activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, analyzed by corticosterone (CORT) and P_4 secretions and by mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (MR and GR, respectively) expression at HPA axis central feedback sites. Adult female Wistar rats were kept in 12h light-dark cycle and had free access to food and water. The estrous cycle was monitored by vaginal smears and the luteinizing hormone dosage was done to confirm proestrus. Six samples of blood were collected by jugular cannula, during the afternoon (13-18h), of the following groups: ovariectomized (OVX), proestrus controls, treated with E_2 or P_4 antagonists (tamoxifen or RU486, respectively), or with both, and treated with antagonists' vehicle. The plasma was stored for hormonal dosages by radioimmunoassay. After the last blood sample, animals were anesthetized, perfused, and the brains were removed and processed for immunofluorescence to analyze MR and GR expression at ventral hippocampus' CA₁ and subiculum, and GR expression at paraventricular nucleus (PVN). The results showed that: LH secretion confirmed the proestrus; CORT basal secretion was not altered by injections neither by ovariectomy; there was a CORT and a P_4 secretion peak at 14h in all experimental groups, E_2 and P_4 antagonists did not modify the CORT total secretion, however RU486 increased (at 13 and 15h) and tamoxifen reduced (at 15h) CORT levels, another P_4 secretion peak in the late afternoon (17-18h) was blocked by ovariectomy and tamoxifen, but enhanced by RU486, the P_4 second peak did not occur in rats treated with both tamoxifen and RU486, there were no changes in the number of neurons expressing GR and MR at ventral hippocampus' CA₁ and subiculum neither of GR expressing neurons at PVN. In conclusion, our results indicate that: E_2 and P_4 can have antagonistic effects over basal CORT secretion; stimulatory and inhibitory, respectively; the P_4 secretion peaks have different origins, the first (14h) is adrenal's and the second (17-18h) is ovarian: E_2 stimulates ovarian P_4 secretion in the proestrus afternoon; E_2 and P_4 do not alter the number of neurons that express MR and GR at HPA axis feedback sites, but one can not exclude the possibility that they alter the activity of these neurons.

Índice

1. Introdução	1
1.1 – Estresse	2
1.2 – Eixo HPA	2
1.2.1 – PVN	3
1.2.2 – CRH	4
1.2.3 – ACTH	5
1.2.4 – Corticosterona (CORT)	5
1.2.5 – Retroalimentação Negativa	6
1.2.6 – GR e MR	6
1.2.7 – Hipocampo	9
1.3 – Interação dos eixos HPA e HPG	10
1.3.1 – ER α e ER β	11
1.3.2 – Esteróides Gonadais e Funções Cerebrais	12
1.3.3 – Influência do Eixo HPG sobre o Eixo HPA	13
1.3.3.1 - Ação dos Esteróides Ovarianos sobre a Secreção de CORT e ACTH	14
1.3.3.2 - Ação dos esteróides ovarianos sobre CRH e AVP	15
1.3.3.3- Ação dos Esteróides Ovarianos sobre GR e MR	16
1.3.3.4 - Ação dos Esteróides Gonadais sobre a Retroalimentação Negativa	17
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1 – Animais e Manipulação	22
3.2 – Tratamentos com Antagonistas de E ₂ (tamoxifen) e de P ₄ (RU486)	22
3.3 – Procedimento Experimental	22
3.4 – Dosagens Hormonais	23
3.5 – Perfusão e Preparação do Tecido Cerebral para Imuno-Histoquímica	25
3.6 – Imuno-Histoquímica	25
3.7 – Regiões Cerebrais de Interesse	26
3.8 – Aquisição das Imagens	27
3.9 – Contagem Neuronal	28
3.10 – Análise Estatística	28
4. Resultados	30
4.1 – Dosagens Hormonais	31
4.1.1 – LH	31

4.1.2 – Corticosterona	31
4.1.3 – Progesterona	32
4.2 – Imuno-histoquímica	35
4.2.1 – GR	35
4.2.1.1 – PVN	35
4.2.1.2 – CA1 Ventral	36
4.2.1.3 – Subículo Ventral	36
4.2.2 – MR	41
4.2.2.1 – CA1 Ventral	41
4.2.2.2 – Subículo Ventral	41
5. Discussão	45
5.1 – Secreção de Corticosterona	46
5.2 – Ações de antagonistas de E_2 e P_4 na secreção de CORT	47
5.3 – Ações dos antagonistas de E_2 e P_4 na secreção de P_4	48
5.4 – Receptores (GR/MR)	49
6. Referências Bibliográficas	53

1. Introdução

1.1 - Estresse

Alterações no ambiente e seu impacto na fisiologia humana e animal constituem o fundamento do estudo do estresse. O termo estresse é amplamente usado para descrever respostas emocionais e biológicas frente a situações adversas. O efeito depressor do estresse sobre o sistema imunológico, a reprodução e o comportamento de mamíferos tem sido amplamente demonstrado (RILEY, 1981; HARBUZ, LIGHTMAN, 1992).

1.2 - Eixo HPA

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) corresponde a um sistema regulador que integra funções endócrinas e neurológicas. Há três características principais na atividade deste eixo: (1) o ritmo circadiano da atividade basal do eixo; (2) a ativação induzida por estresse; (3) a retroalimentação negativa mediada por corticosteróides (DALLMAN *et al.* , 1987).

A secreção de glicocorticóides varia ao longo do dia e o ritmo circadiano é gerado em mamíferos pela atividade do núcleo supraquiasmático (SCN), cuja lesão abole essa ritmicidade. Aferências diretas descritas do núcleo supraquiasmático do hipotálamo para o núcleo paraventricular (PVN) devem ser responsáveis pela mudança rítmica característica da secreção basal do eixo HPA. Em ratos, o eixo HPA apresenta uma atividade diurna com pico de secreção hormonal ocorrendo no início da fase escura do dia; em humanos, o pico de cortisol é observado logo antes do amanhecer (Fig. 1) (DALLMAN *et al.* , 1987; BRADBURY *et al.* , 1994; HANDA *et al.* , 1994; HERMAN, MUELLER, 2006).

O eixo HPA, um dos sistemas efetores primários ativados durante estresse, funciona para minimizar os desvios da homeostase e ajudar o organismo a retomar o equilíbrio após algum desafio. A resposta do eixo HPA ao estresse é fundamental para a sobrevivência e bem estar de todos os organismos vertebrados. Estressores fisiológicos atuam diretamente sobre o PVN do hipotálamo, provavelmente via projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico. Por outro lado, estressores psicológicos requerem uma interpretação por estruturas cerebrais superiores. Regiões límbicas prosencefálicas conectam-se ao PVN via interações com neurônios gabaérgicos no núcleo do leito da estria terminal, área preóptica e hipotálamo (HERMAN, CULLINAN, 1997; HERMAN, MUELLER, 2006).

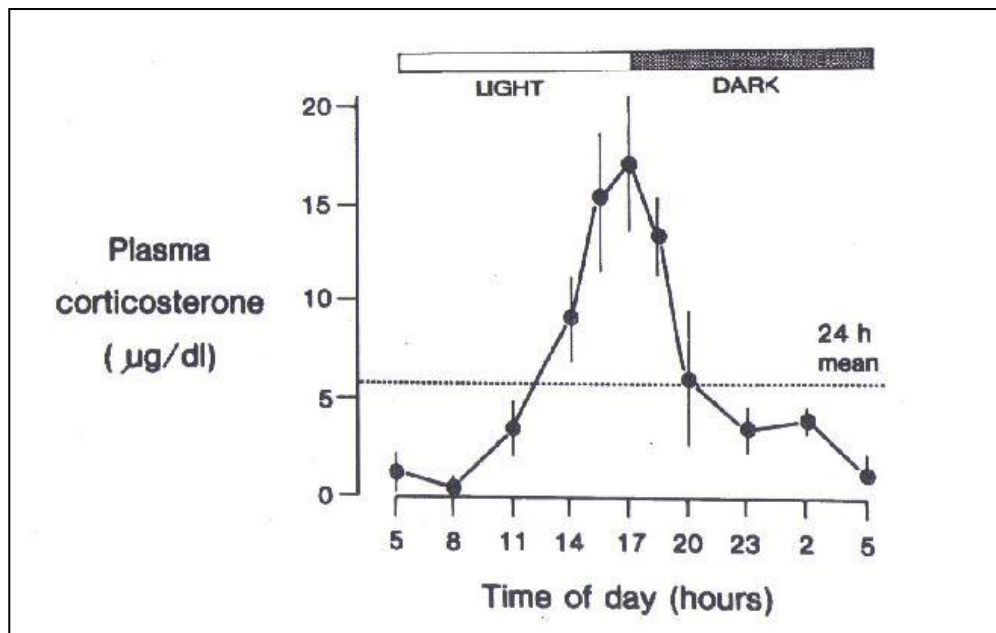


Figura 1. Variação diurna na concentração de corticosterona em ratos machos jovens. A linha tracejada representa a média dos valores das 24 horas (imagem retirada de Dallman *et al.*, 1987).

1.2.1 – PVN

O hipotálamo é uma estrutura relativamente pequena do prosencéfalo dos vertebrados que desempenha ação primordial em mecanismos neurais assegurando a homeostase, defesa, e reprodução, ou seja, assegura a sobrevivência do animal e da espécie (RISOLD *et al.*, 1997).

O PVN apresenta três tipos principais de células que desempenham essencialmente funções motoras: neurônios neurosecretores magnocelulares que liberam hormônios para circulação sistêmica; neurônios neurosecretores parvocelulares que liberam hormônios para o sistema porta hipofisário; neurônios com projeções descendentes para centros autonômicos no tronco e centros somatomotores. Os sistemas neurosecretores magnocelular e parvocelular estão associados, respectivamente, aos lobos posterior e anterior da hipófise (SWANSON, SIMMONS, 1989; RISOLD *et al.*, 1997).

A deafferentação total ou anterior do PVN aumenta a expressão de RNAm de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP) indicando que vias neuronais inibitórias são necessárias para a manutenção do tônus basal do eixo HPA. A inibição do eixo HPA mediada por neurônios pode provir de diversos locais, entre os quais o mais intensamente estudado é o hipocampo (HERMAN, CULLINAN, 1997).

1.2.2- CRH

A interação funcional do o sistema nervoso central (SNC) com o sistema endócrino por meio da adeno-hipófise foi primeiramente postulado por Harris (1948). Ele propôs que fatores de origem hipotalâmica liberados para o sangue porta-hipofisário seriam responsáveis pelo controle da secreção dos hormônios pela adeno-hipófise. A caracterização do CRH, um peptídeo de 41 aminoácidos, permitiu um estudo detalhado da liberação e interação de vários fatores no sangue porta hipofisário, que influenciam a liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (HARBUZ, LIGHTMAN, 1992).

Existem evidências que a ativação do sistema noradrenérgico no estresse é o mecanismo primário responsável pela liberação de CRH a partir de neurônios no PVN, possivelmente através do receptor α_1 , além de outros sistemas de neurotransmissores envolvidos (acetilcolina, serotonina-5-HT e ácido gama-aminobutírico-GABA) (DUNN, BERRIGE, 1990; VAMVAKOPOULOS, CHORUSOS, 1993).

Neurônios imunorreativos ao CRH são amplamente distribuídos ao longo do cérebro, tronco encefálico e tecidos não neuronais. Os axônios dos neurônios parvocelulares CRH do PVN terminam na zona externa da eminência mediana, onde o CRH, principal secretagogo de ACTH, é liberado para atingir a circulação porta hipofisária. Além de estimular a secreção de ACTH por, um mecanismo de adenilato ciclase mediado por AMPc, o CRH induz a transcrição do RNAm de pró-opiomelanocortina (POMC), precursor de ACTH (BOHLER *et al.* , 1990; HARBUZ, LIGHTMAN, 1992).

Outros peptídeos têm sido descritos em co-expressão com CRH em neurônios neurosecretores parvocelulares: vasopressina (AVP); encefalina; peptídeo histidina isoleucina (PHI); neurotensina; angiotensina II (AII); colecistocinina (CCK). Destes, pelo menos três (CRH, AVP e AII) compartilham associação funcional como estimuladores da secreção de ACTH e parecem ser regulados por esteróides adrenais circulantes, além de aferências neurais de outras regiões do cérebro (SAWCHENKO, 1987; SWANSON, SIMMONS, 1989).

A AVP tem ação sinérgica potente ao CRH para indução da secreção de ACTH. A co-expressão de AVP ocorre em 50% dos terminais e axônios CRH positivos de animais em repouso. Há evidências que a AVP potencia a resposta secretória do corticotrofo ao CRH por induzir um aumento do número de receptores para CRH na superfície do corticotrofo (DALLMAN *et al.* , 1987; DUNN, BERRIGE, 1990; HARBUZ, LIGHTMAN, 1992).

1.2.3 – ACTH

Os corticotrofos representam 3-10% da população de células da hipófise anterior e sintetizam ACTH como parte de uma grande proteína precursora, a pró-ópiomelanocortina (POMC). A clivagem proteolítica e o processamento desta molécula na cisterna do retículo endoplasmático rugoso, Golgi, e vesículas secretórias formam três peptídeos maduros (β -LPH, um peptídeo 16K N-terminal e o ACTH) secretados na circulação, tanto constitutivamente, como pela ação de secretagogos (DALLMAN *et al.* , 1987).

1.2.4 – Corticosterona (CORT)

O ACTH da circulação sistêmica estimula a secreção de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) pela zona fasciculada do córtex da adrenal. Essa secreção também é dependente do tamanho da adrenal (massa secretória) e da responsividade da glândula (KITAY, 1963; FUNDER, SHEPPARD, 1987; FUNDER *et al.* , 1988).

Os glicocorticóides são liberados em respostas de estresse, as quais são mediadas e/ou moduladas por eles, alertando o organismo às mudanças fisiológicas e no ambiente para defesa da homeostase. A ação geral dos glicocorticóides está relacionada tanto com a preparação como com a recuperação do desequilíbrio homeostático, ou seja, com o estresse e a adaptação (DE KLOET *et al.* , 1993; FUNDER, SHEPPARD, 1987; HERMAN, CULLINAN, 1997; HERMAN, MUELLER, 2006).

As ações dos glicocorticóides em vários mecanismos fisiológicos e processos fisiopatológicos interferem: na mobilização de glicose a partir do fígado, que aumenta a disponibilidade de combustível celular, disponibilizando energia do metabolismo para suprir as demandas durante o estresse; no ganho de massa corpórea; na concentração de amilase pancreática; no conteúdo vertebral de cálcio; no angiotensinogênio plasmático; nas concentrações de renina e angiotensina, assim como na atividade da renina plasmática; na produção de CBG (globulina ligadora de corticosterona); na massa do timo; na iniciação e no controle de respostas imunes. O controle inadequado da resposta de glicocorticóides ao estresse representa um risco para a saúde e bem estar do organismo. Estes hormônios também influenciam uma variedade de processos no sistema nervoso central, como: proliferação e diferenciação celular; atividade de sistemas de neurotransmissores; modulação da memória de eventos aversivos; humor e estado emocional, talvez ajudando a maximizar os comportamentos relacionados à sobrevivência em função de um desafio

homeostático. Além disso, os glicocorticóides também controlam sua própria síntese e liberação completando uma alça de retroalimentação negativa na hipófise anterior e em estruturas cerebrais (ARRIZA *et al.* , 1988; DALLMAN *et al.* , 1987; HARBUZ, LIGHTMAN, 1992; HERMAN, MUELLER, 2006).

1.2.5 – Retroalimentação Negativa

O aumento da concentração plasmática de glicocorticóides promove inibição sobre as áreas que sintetizam os produtos que desencadeiam sua secreção e assim impede a hiperativação do eixo HPA. Desta forma os glicocorticóides agem fasicamente para inibir a atividade biossintética e secretora do eixo HPA, num processo denominado retroalimentação negativa (KOVÁCS *et al.* , 2000).

A retroalimentação negativa pelos glicocorticóides é o principal fator de controle do eixo HPA, porém aferências indiretas via circuitos neuronais também estão implicadas na regulação dos neurônios AVP/CRH do PVN, sinalizando tanto o estado fisiológico momentâneo como a presença de possíveis ameaças (DALLMAN *et al.* , 1987; HERMAN *et al.* , 1992; HERMAN, MUELLER, 2006).

A denominação clássica de “retroalimentação lenta” refere-se à atividade de transcrição basal dos genes CRH e AVP e depende da concentração de glicocorticóide antes do estresse. Por outro lado, a “retroalimentação rápida” refere-se à ação da CORT plasmática, liberada na situação de estresse, especificamente sobre a liberação dos peptídeos e também sobre a expressão gênica dos neuropeptídios (KOVÁCS *et al.* , 2000).

1.2.6 – GR e MR

O efeito inibitório da CORT sobre o eixo HPA é traduzido primariamente por um receptor protéico intracelular de esteróide que funciona como um fator de transcrição ativado por hormônio. Existem dois tipos de receptores de glicocorticóides no SNC. Os receptores tipo I, também chamados de receptores de mineralocorticóide (MR), ligam-se à aldosterona, CORT, cortisol, e deoxicorticosterona com a mesma afinidade. Os receptores tipo II, também chamados de receptores de glicocorticóide (GR), por outro lado, ligam preferencialmente dexametasona > cortisol > corticosterona > deoxicorticosterona > aldosterona (HARBUZ, LIGHTMAN, 1992, SPENCER *et al.* , 1998).

A concentração de CORT circulante livre e a consequente ocupação dos receptores, podem variar consideravelmente ao longo do dia e após estresse. Os MR e GR respondem a concentrações diferentes de glicocorticóides, e juntos eles conferem uma faixa dinâmica ampla de sensibilidade hormonal (ARRIZA *et al.* , 1988; DE KLOET *et al.* , 1993).

A afinidade dos MR por CORT é, cerca de, 5 a 10 vezes maior que a dos GR (Fig. 2). Os GR têm menor afinidade e maior capacidade. A diferença na ocupação de MR e GR por CORT é mais pronunciada no período da manhã, quando a concentração plasmática de CORT é suficiente para ocupar a maioria (90%) dos MR e apenas 5-10% dos GR. A ativação de MR por concentrações baixas de CORT durante o nadir do ciclo circadiano é suficiente para manter a atividade basal do eixo HPA e a ocupação quase completa desses receptores caracteriza sua ação permissiva e tônica. Quando a concentração de CORT aumenta tal como no pico circadiano ou em situação de estresse, aumenta também a ocupação dos GR (67-74%), com alteração pequena na ocupação dos MR (mais de 90%). A ativação dos GR é necessária para manter a atividade normal do eixo HPA durante o pico do ciclo circadiano e durante estresse agudo. Contudo, sob estas condições, a ativação do MR desempenha efeito significativo para potencializar as ações da CORT nos GR para manutenção da atividade do eixo HPA (REUL, DE KLOET, 1985; DALLMAN *et al.* , 1987; HARBUZ, LIGHTMAN, 1992; DIORIO *et al.* , 1993; SPENCER *et al.* , 1998).

GR e MR medeiam os efeitos da CORT de modo coordenado e frequentemente antagonístico: (I) no hipocampo, a ativação dos MR mantém, enquanto a dos GR suprime a excitabilidade, momentaneamente aumentada por um estímulo excitatório; (II) os MR centrais participam no controle da sensibilidade da resposta do sistema neuroendócrino ao estresse; (III) os MR no hipocampo têm ação reguladora na reação comportamental e na seleção da resposta. Os efeitos mediados por GR facilitam o armazenamento de informações. No hipocampo, a ativação crônica de GR promove *downregulation* do número de GR e aumento do número de MR. A ativação dos MR causa a *downregulation* de ambos receptores. Também há um ritmo circadiano com a ligação máxima dos MR na fase "PM", na qual os GR sofrem *downregulation*. A teoria da regulação do receptor de corticosteróide propõe que desequilíbrios dos efeitos mediados por GR e MR devem alterar a suscetibilidade do indivíduo ao estresse e às doenças relacionadas ao estresse (DE KLOET *et al.* , 1993).

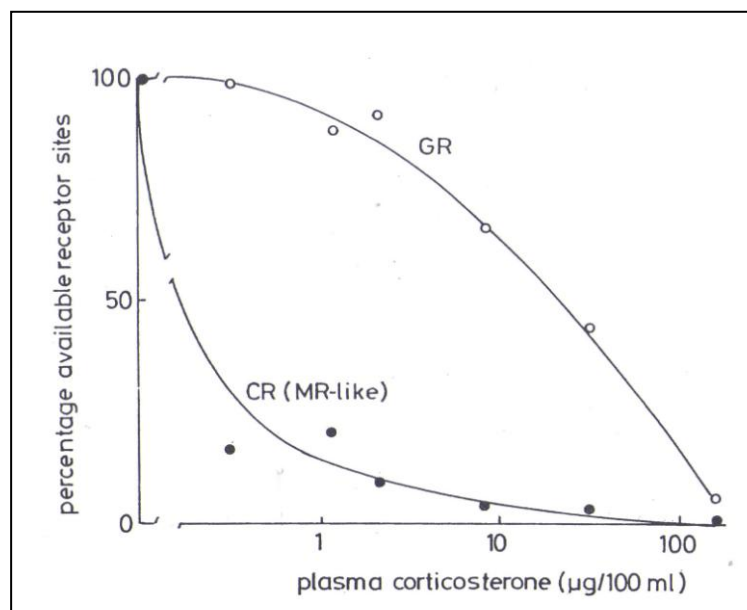


Figura 2. Disponibilidade de CR (MR) e GR no citosol do hipocampo em relação ao aumento da concentração de corticosterona (imagem retirada de Reul e De Kloet, 1985).

Os MR têm uma distribuição restrita ao hipocampo (principalmente subículo dorsal, CA1 dorsal e giro dentado) e a sítios sensoriais e motores fora do hipocampo. Há menos MR no septo lateral e amígdala, e pouco ou nada no hipotálamo. Propõe-se que os corpos celulares de neurônios que expressam MR residam principalmente no hipocampo, e suas conexões com neurônios CRH do PVN ocorram diretamente ou indiretamente através de interneurônios, para inibir a capacidade dos neurônios CRH durante a retroalimentação negativa por CORT (DALLMAN *et al.*, 1987; JACOBSON, SAPOLSKY, 1991; HARBUSZ, LIGHTMAN, 1992; BRADBURY *et al.*, 1994; GOMEZ-SANCHES *et al.*, 2006).

A expressão abundante de GR em grupos celulares implicados na regulação neuroendócrina, autonômica e de respostas comportamentais a estímulos estressores, sugere que os glicocorticóides promovem retroalimentação nestes circuitos ativados por estresse. Contrariamente aos MR, os GR apresentam uma distribuição mais ampla que envolve hipocampo, agrupamentos neuronais catecolaminérgicos no tronco encefálico (locus coeruleus, núcleo do trato solitário, etc.), septo lateral, córtex cerebral, amígdala central e PVN (REUL, DE KLOET, 1985; VAN EEKELLEN *et al.*, 1987; DALLMAN *et al.*, 1987; JACOBSON, SAPOLSKY, 1991; HARBUSZ, LIGHTMAN, 1992). Há evidências da ação de glicocorticóides sobre neurônios CRH no PVHmpd, que expressam GR, para reduzir a

taxa de síntese de CRH e vasopressina, como também na eminência mediana para influenciar a liberação desses hormônios no sistema porta (SWANSON, SIMMONS, 1989).

1.2.7 – Hipocampo

A inibição da atividade do eixo HPA por glicocorticóides em rato ocorre em sítios hipotalâmicos e supra-hipotalâmicos. O hipocampo é o sítio supra-hipotalâmico primordial no qual os glicocorticóides atuam para regulação neuroendócrina, além de ações na proliferação e diferenciação neuronal, morte neuronal, potencial de membranas e modulação da ansiedade (JACOBSON, SAPOLSKY, 1991; SAPOLSKY *et al.*, 1991; AHIMA *et al.*, 1992; DE KLOET *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1998; EDINGER, FRYE, 2005).

Lesões no hipocampo aumentam a secreção de ACTH e CORT em condição basal ou de estresse, a expressão de RNAm para CRH e AVP em neurônios parvocelulares do PVN, indicando uma desinibição da resposta do eixo HPA. Por outro lado, a estimulação do hipocampo em ratos e humanos inibe a atividade do eixo HPA. Além de inibir a secreção dos secretagogos hipotalâmicos do ACTH (CRH, oxitocina e vasopressina) o hipocampo pode regular diferencialmente cada um deles (JACOBSON, SAPOLSKY, 1991; SAPOLSKY *et al.*, 1991; DE KLOET *et al.*, 1993; HERMAN, CULLINAN, 1997; HERMAN, MUELLER, 2006).

A retroalimentação por glicocorticóide via GR no PVN não suprime completamente a expressão de RNAm para CRH e AVP quando o hipocampo é removido, indicando que esta estrutura exerce uma inibição tônica potente sobre os neurônios CRH/AVP. Entretanto, o hipocampo também pode alterar a secreção de corticosteróides independentemente do ACTH, por ação sobre a aferência do nervo esplâncnico para a adrenal a qual estimula a secreção de corticosteróides (HERMAN *et al.*, 1989a,b; JACOBSON, SAPOLSKY, 1991).

Com a possível exceção da área subicular ventral, as demais regiões hipocâmpais, não se projetam diretamente para o PVN parvocelular medial, mas sim através de várias estruturas intermediárias: (1) septo lateral e núcleo do leito da estria terminal, os quais recebem aferências do hipocampo via fórnix pré e pós comissural; (2) hipotálamo basal medial, que recebe aferência do subículo ventral via trato córtico-hipotalâmico (HERMAN *et al.*, 1989; RISOLD *et al.*, 1997).

1.3 - Interação dos eixos HPA e HPG

A interação dos eixos HPA e HPG fica especialmente evidente durante o funcionamento anormal de um deles. Por exemplo, a ausência do ritmo circadiano adrenal resulta em ciclos ovarianos irregulares e o estresse pode causar efeito inibitório sobre a função reprodutiva. A esteroidogênese ovariana anormal resulta em regulação anormal do eixo HPA, como se observa em mulheres com amenorréia hipotalâmica, uma condição associada à deficiência de estrógeno, nesta situação ocorre secreção basal de cortisol elevada assim como respostas menos efetivas ao CRH (VIAU, MEANEY, 1991; XIAO *et al.*, 1994; CAREY *et al.*, 1995).

Exposição ao estresse pode alterar a função reprodutiva em ambos os sexos. Os hormônios secretados pelo eixo HPA inibem esta função, contudo ainda há controvérsia sobre os mecanismos envolvidos. O aumento da secreção de corticosteróides da adrenal inibe o comportamento sexual. Há evidências que o aumento destes hormônios induzido por estresse inibe indiretamente a esteroidogênese, diminui a responsividade da hipófise ao GnRH e portanto, a secreção de LH. A concentração de LH declina com estresse e com administração i.c.v de CRH. Este neuro-hormônio participa na disfunção dos parâmetros reprodutivos por seu efeito inibitório sobre a secreção de GnRH, por uma via direta, já que neurônios CRH fazem sinapse diretamente com neurônios GnRH na área preoptica, ou por uma via indireta, no núcleo arqueado, mediada por proopiomelanocortina/ 13-endorfina. Pode ser que esse bloqueio do GnRH pelo CRH seja um mecanismo para limitar a duração do pico de LH. O ACTH, por sua vez, poderia atrasar a puberdade, interromper a gestação, e inibir a ovulação (SHIVERS *et al.*, 1983; FERIN *et al.*, 1984; RIVIER, VALE, 1985; BOHLER *et al.*, 1990; VIAU, MEANEY, 1991; CHROUSOS, GOLD, 1992; HANDA *et al.*, 1994; SPEERT *et al.*, 2002; BAO *et al.*, 2005).

Há evidências para uma interação bidirecional entre os eixos HPA e HPG. Os hormônios do eixo HPA têm ação inibitória em diferentes níveis do eixo HPG (hipotálamo, hipófise, gônadas e tecidos alvos para esteróides gonadais). Por outro lado, os esteróides gonadais alteram a atividade do eixo HPA, em condições basais e de estresse (VIAU, MEANEY, 1991; VAMVAKOPOULOS, CHROUSOS, 1993; HANDA *et al.*, 1994; SPEERT *et al.*, 2002).

A atividade basal do eixo HPA assim como a ritmicidade e a responsividade ao estresse mudam com as flutuações do ciclo estral. A ovariectomia reduz a concentração de corticosterona e a reposição de estrógeno reverte esta situação, sugerindo que o estrógeno é um regulador positivo do

eixo. Após um declínio do metaestro para o diestro, na tarde do proestro, aproximadamente quando ocorre o pico pré-ovulatório de LH, há um aumento brusco na quantidade de RNAm de CRH em compartimentos seletivos do PVN parvocelular (CRITCHLOW *et al.* , 1963; BOHLER *et al.* , 1990; LAFLAME *et al.* , 1998; DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.* , 2001; SPEERT *et al.* , 2002; RHODES *et al.* , 2004). Além disso, a transcrição de MR e de CRH aumenta na manhã do proestro, um período onde um número grande de células *FOS* positivas estão co-localizadas com neurônios CRH. Se a concentração de estradiol circulante é responsável por este efeito ainda não se sabe, mas podemos observar que a administração de 17 β - estradiol exógeno altera a transcrição de CRH induzida por estresse em ratas OVX (LAFLAME *et al.* , 1998).

O aumento de CORT no proestro pode estar relacionado à mobilização de suprimentos calóricos, uma vez que, normalmente, neste estágio do ciclo, ou após suplementação com estrógeno, ratas ficam mais ativas, mas diminuem a ingestão de comida e água. Sendo assim, o aumento da disponibilidade de carboidratos, após uma resposta de glicocorticóide aumentada ao estresse durante o proestro, poderia assegurar um suprimento adequado de substratos energéticos necessários para subsequente ovulação e comportamento reprodutivo (VIAU, MEANEY, 1991; ATKINSON, WADDELL, 1997).

1.3.1 - ER α e ER β

Os efeitos do estrógeno no cérebro são mediados por dois subtipos de receptores: ER α e ER β . Eles são controlados por genes diferentes, têm a mesma afinidade por 17 β -estradiol, e distribuem-se extensivamente pelo cérebro, porém de maneira diversa. Efeitos antagonísticos mediados por ER α e ER β podem ser verificados, por exemplo, em células HeLa *in vitro*, nas quais o ER α medeia a ativação e o ER β medeia a inibição da transcrição (BAO *et al.* , 2005; VASUDEVAN *et al.* , 2005).

Em ratos, há expressão de RNAm para ER α no núcleo hipotalâmico ventromedial, núcleo arqueado, hipocampo, órgão subfornicial, núcleo talâmico ventrolateral, núcleo amigdalóide lateral e basolateral, núcleo endopiriforme dorsal, área preoptica, núcleo do leito da estria terminal, tronco encefálico inferior (SHUGHRUE *et al.* , 1997).

A expressão de RNAm para ER β pode ser encontrada nas seguintes áreas: bulbo olfatório, área preoptica, núcleos hipotalâmicos: supraóptico, paraventricular, supraquiasmático e tuberal,

núcleo do leito da estria terminal, amígdala medial, zona incerta, área tegmental ventral, cerebelo (células de Purkinje), lâminas III-V, VIII, e X da medula espinhal, e glândula pineal; enquanto um fraco sinal de hibridização foi observado no núcleo arqueado. Pode-se notar que algumas destas áreas são relacionadas à função do eixo HPA. O E₂ afeta muitos elementos deste eixo, tem efeitos sobre aferências neurais para células CRH, a síntese e liberação de CRH, oxitocina, AVP e ACTH, e o metabolismo dos glicocorticóides (VIAU, MEANEY, 1991; SHUGHRUE *et al.*, 1997).

Em ratos, o PVN expressa, quase exclusivamente, ER β tanto na divisão parvocelular quanto na magnocelular. As células das regiões parvocelulares dorso e ventromedial do PVN expressam quantidade grande de RNAm para ER β e esses receptores podem ser diferencialmente co-localizados com CRH ou AVP. A adrenalectomia reduz a expressão de RNAm de ER β no PVN; resposta revertida pela reposição com CORT de forma dose-dependente (ALVES, *et al.*, 1998; HRABOVSKY *et al.*, 1998; LAFLAME *et al.*, 1998; ISGOR *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2008).

O córtex cerebral e o hipocampo expressam RNAm para ER α e ER β , porém com intensidade muito maior para o segundo. No adulto, a expressão de ER no hipocampo é baixa e encontra-se principalmente em interneurônios ao redor da região das células piramidais. Entretanto, o significado funcional é evidente pelas alterações induzidas por estrógeno em receptores NMDA e na expressão de RNAm para GR e MR (HANDA *et al.*, 1994; SHUGHRUE *et al.*, 1997).

1.3.2 - Esteróides Gonadais e Funções Cerebrais

Os esteróides gonadais influenciam profundamente várias funções cerebrais. O E₂ age em certos aspectos do desenvolvimento neural tanto em machos quanto em fêmeas e as diferenças de ações entre os sexos podem envolver concentrações localizadas de E₂, que ficam retidas em sítios hipotalâmicos ao longo do período perinatal (BAUM, 2003).

O E₂ age na regulação da estrutura e da função de vários sistemas neuronais no cérebro de ratos adultos. A ação do E₂ está relacionada à regulação de funções homeostáticas como temperatura, balanço energético entre outras, além de respostas de estresse, reprodução, comportamento sexual, cognição, aprendizado, memória, comportamentos motivados, humor, saúde psiquiátrica e proteção contra isquemia (SHUGHRUE *et al.*, 1997; LEVIN, 2001; ISGOR *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2005; LI, SHEN, 2005; NIYOMCHAI *et al.*, 2005).

Há evidências para ação neuroprotetora do E₂. Estados hipo-estrogênicos (mulheres em período pós-menopausa) são acompanhados pela perda de neurônios β-endorfina (POMC) e o subsequente decréscimo nas funções autonômicas (KELLY *et al.* , 2005). Por outro lado, concentrações moderadas de E₂ podem melhorar o desempenho cognitivo, diminuir o comportamento depressivo e de ansiedade. Em ratas ovariectomizadas (OVX) e adrenalectomizadas (ADX), os efeitos anti-depressivos e ansiolíticos do E₂ foram restaurados pela reposição de doses baixas de corticosterona, sugerindo ação permissiva desta para o efeito do E₂ (WALF, FRYE, 2005; HUANG *et al.* , 2008). Ratas em proestro, em que ocorre elevação da concentração de corticosterona, também apresentam redução no comportamento depressivo e de ansiedade em comparação com ratas em outras fases do ciclo estral (WALF, FRYE, 2005).

Progestinas, particularmente as progestinas 5α-reduzidas, modulam o comportamento ansiolítico e anti-depressivo de fêmeas de roedores (WALF, FRYE, 2005). Tetra-hidro-progesterona (THP) é um metabólito da progesterona com propriedades ansiolíticas associadas à sua modulação alostérica do receptor GABA_A. A alopregnenolona, outro metabólito da progesterona, atenua as respostas endócrinas de estresse (TOUFEXIS *et al.* , 2004; BETHEA, CENTENO, 2008).

1.3.3 - Influência do Eixo HPG sobre o Eixo HPA

A concentração plasmática de CORT é alterada pela síntese, depuração, disponibilidade de globulina ligadora de corticosterona (CBG) e metabolização (FIGUEIREDO *et al.* , 2006). Os esteróides gonadais podem interferir direta ou indiretamente na atividade do eixo HPA. Diretamente, modificando a sensibilidade de sítios de retroalimentação negativa ou a síntese de corticosteróides pela adrenal. Indiretamente, alterando sistemas enzimáticos hepáticos e a síntese de proteínas ligadoras de CORT (CRITCHLOW *et al.* , 1963). Além disso, podem alterar a sensibilidade da adrenal ao ACTH (FIGUEIREDO *et al.* , 2006).

O E₂ estimula diretamente a produção de CORT pela adrenal *in vitro* e *in vivo*, assim como em células adrenocorticais dispersas. Há evidências que esse aumento ocorra devido à sensibilidade maior da adrenal ao ACTH e à conversão maior de colesterol a pregnanolona (PREG), que por si só aumentaria a produção de desoxicorticosterona (DOC) e CORT (NOWAK *et al.* , 1995; YOUNG *et al.* , 2001; SEALE *et al.* , 2004).

1.3.3.1 - Ação dos Esteróides Ovarianos sobre a Secreção de CORT e ACTH

A administração de E_2 aumenta a secreção basal de CORT e a secreção de CORT e ACTH em resposta ao estresse físico em ambos os sexos. O aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e CORT induzido por estresse pela inalação de éter foi similar em ratas OVX e machos, porém maior em ratas intactas ou OVX tratadas com E_2 . A ovariectomia reduz a secreção de CORT e de ACTH basal ou induzida por estresse. Redução aguda da concentração E_2 , como ocorre após a ovariectomia, reduz a atividade de células corticotróficas, detectável pela redução da secreção de β -endorfina e β -lipotropina. Essa resposta é revertida pelo tratamento com E_2 . Este efeito positivo do E_2 sobre a secreção de CORT, também foi mostrado em ratos tratados com antagonista de E_2 nos quais ocorreu inibição da secreção de CORT em resposta ao estresse de contenção em comparação aos animais tratados com veículo (CHIHARA *et al.*, 1978; LESNIEWSKA *et al.*, 1990; BURGESS, HANDA, 1992; HANDA *et al.*, 1994; CAREY *et al.*, 1995; ISGOR *et al.*, 2003; SEALE *et al.*, 2004; KELLY *et al.*, 2005).

Alguns estudos não observaram diferenças na secreção de CORT induzida por estresse ao longo do ciclo estral, sugerindo que sob certas condições a atividade do eixo HPA não seria necessariamente alterada (GUO *et al.*, 1994; RIVIER, 1999; SEALE *et al.*, 2004).

Outros autores verificaram que o efeito do E_2 sobre a secreção de CORT e ACTH é dose-dependente. As secreções de CORT basal e induzida por estresse em ratas OVX podem ser reduzidas por doses baixas de E_2 em prazo curto e elevadas por doses altas de E_2 em longo período de tempo (VIAU, MEANEY, 1991; YOUNG *et al.*, 2001; WALF, FRYE, 2005).

A administração de progesterona (P_4) reduz a secreção de CORT em ratos machos e fêmeas em repouso (GALA, WESTPHAL, 1965). A P_4 parece inibir os efeitos facilitatórios do E_2 sobre a secreção de ACTH e CORT após estresse (VIAU, MEANEY, 1991; RHODES *et al.*, 2004). Considerando que a P_4 previne ou reduz os efeitos do estrógeno, a amplitude menor no ritmo de secreção de CORT no dia do estro, poderia estar relacionada às concentrações mais altas de P_4 no final da fase de proestro (DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.*, 2001). Outros trabalhos mostram que a P_4 não tem efeito sobre a atividade do eixo HPA em condição basal ou de estresse (CAREY *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 2001).

1.3.3.2 - Ação dos esteróides ovarianos sobre CRH e AVP

Elementos responsivos ao E₂ (EREs) foram identificados na região promotora dos genes CRH e AVP. O E₂ ligado aos EREs estimula a expressão do gene CRH em roedores e a transcrição do CRH e AVP (VAMVAKOPOULOS, CHORUSOS, 1993; SHAPIRO *et al.* , 2000; BAO *et al.* , 2005; HUANG *et al.* , 2008). Entretanto, os dados de efeitos do E₂ sobre a síntese de CRH no PVN são conflitantes. Isto dificulta o entendimento da interação das mudanças centrais induzidas por E₂ com os eventos neurosecretórios do hipotálamo ativado por estresse. Portanto, apesar de evidências para ação modulatória do E₂ nas respostas do PVN ao estresse, continua não esclarecida a participação do E₂ em áreas cerebrais envolvidas no controle da secreção de CORT induzida por estresse em fêmeas (FIGUEIREDO *et al.* , 2006).

O tratamento crônico e agudo com E₂ estimula o aumento de RNAm para CRH no PVN de animais ovariectomizados (VAMVAKOPOULOS, CHORUSOS, 1993; DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.* , 2001; BETHEA, CENTENO, 2008). O aumento da expressão de RNAm para FOS em resposta ao estresse é potencializado pelo E₂ (LUND *et al.* , 2004). Em primatas, a administração de E₂ em dose semelhante a do pico pré-ovulatório também aumenta o CRH no PVN (BETHEA, CENTENO, 2008). Contudo, outros trabalhos mostram que o tratamento crônico com E₂ diminui a expressão de CRH (BURGESS, HANDA, 1992), ou que o tratamento E₂ e P₄ inibe o aumento da expressão de FOS no PVN, induzido pelo estresse em ratas OVX (FIGUEIREDO *et al.* , 2006). E outros mostram que o E₂ não apresenta efeito sobre o RNAm de CRH (REDEI *et al.* , 1994). O estrógeno pode reduzir a atividade de CRH hipotalâmico pela ação sobre sistemas de neurotransmissores e de neuropeptídeos cerebrais que regulam o eixo HPA (YOUNG *et al.* , 2001).

A administração i.c.v de norepinefrina em doses baixas aumenta (receptores α_1 adrenérgicos) enquanto em doses altas inibe (receptores β) a liberação de CRH, O E₂ parece causar *up-regulation* dos receptores α_1 adrenérgicos e *down-regulation* dos β adrenérgicos (VIAU, MEANEY, 1991).

O E₂ regula positivamente a expressão da proteína ligante de CRH nos corticotrofos apesar da expressão baixa de ERs nestas células. Isso facilitaria o retorno do eixo HPA à homeostase após estresse durante o proestro e na preparação para o estro endócrino e comportamental (SPEERT *et al.* , 2002).

A P₄ inibe a secreção de ACTH e CRH *in vitro* (VIAU, MEANEY, 1991). Em macacas OVX, o tratamento com P₄ reduziu o CRH assim como seu RNAm (BETHEA, CENTENO, 2008). Em ratas

OVX, a reposição com P₄ sozinha ou em combinação com E₂ atenuou o aumento de CRH induzido por estresse, enquanto o CRH basal ficou inalterado (TOUFEXIS *et al.* , 2004). A alopregnenolona, metabólito da progesterona, reduz o aumento de CRH por estresse. A alopregnanolona pode atuar como agonista sobre os receptores GABA_A e, desta forma, poderia produzir o mesmo efeito inibitório sobre neurônios CRH que as inervações GABAérgicas (TOUFEXIS *et al.* , 2004; BETHEA, CENTENO, 2008).

1.3.3.3- Ação dos Esteróides Ovarianos sobre GR e MR

Há evidência que tanto E₂ quanto P₄ atuem na resistência relativa à retroalimentação negativa por glicocorticóides em fêmeas. A ação dos esteróides gonadais sobre o hipocampo, uma região que modula diretamente a atividade do PVN parece provável. Receptores para esteróides gonadais foram descritos no hipocampo e em outras estruturas que inervam o PVN, estrutura na qual a expressão é limitada. Estas observações indicam que esteróides gonadais podem modular diretamente a expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo (juntamente aos glicocorticóides endógenos), e talvez indiretamente (vias transsinápticas) a expressão de CRH. A expressão MR e GR no hipocampo de fêmeas, em todas as fases do ciclo estral, é menor do que em machos (HANDA *et al.* , 1994; PATCHEV, ALMEIDA, 1996; DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.* , 1999; YOUNG *et al.* , 2001).

O E₂ pode alterar o mecanismo de retroalimentação negativa da CORT mediado por GR e MR e também a distribuição de receptores de glicocorticóides no cérebro. Tem sido mostrado que o estrógeno diminui a capacidade de ligação de GR e a quantidade de seu RNAm na adeno-hipófise, hipotálamo e hipocampo (CAREY *et al.* , 1995; LUND *et al.* , 2004; WALF, FRYE, 2005).

O E₂ não altera as concentrações de GR e MR em nenhuma das regiões cerebrais incluindo hipotálamo médio basal e hipocampo, em ratas. Os resultados sugerem que a expressão basal dos receptores para corticosterona não é afetada por tratamento crônico com E₂ (BURGES, HANDA, 1992). Alternativamente, o tratamento com E₂ pode induzir uma mudança pós-traducional do GR, tal como uma meia vida mais curta, assim como tem sido mostrado após tratamento com dexametasona. Além disso, o tratamento com E₂ interfere em duas funções mediadas por GR: a *down regulation* do receptor e a supressão hormonal (DONG *et al.* , 1988; AHIMA *et al.* , 1992; CAREY *et al.* , 1995; DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.* , 2001).

Como o tratamento com E₂ reduz a habilidade do receptor de glicocorticóide para se autorregular, pode haver um impedimento funcional do receptor de glicocorticóide apesar de sua capacidade aparente de ligação normal. Assim, a hiper-ativação do eixo HPA após estresse em ratos tratados com E₂ pode ser, em parte, devido ao impedimento da retroalimentação lenta mediada por receptores de glicocorticóide (BURGESS, HANDA, 1992; DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.*, 2001).

O E₂ apresenta ligação baixa com receptores de corticosteróide, não afeta a expressão de GR em células tipo A nem a capacidade de ligação dos GR hipocampais (AHIMA *et al.*, 1992). Entretanto, o E₂ aumenta a supressão dos GR hipocampais induzida por doses supra-fisiológicas de CORT em ratos OVX e ADX, potenciando a retroalimentação negativa da CORT (FIGUEIREDO *et al.*, 2006). O E₂ reduz a expressão de MR e de seu RNAm no hipotálamo e hipocampo e a capacidade dos MR hipocampais (CAREY *et al.*, 1995).

A progesterona pode ligar-se aos receptores MR e GR em sítio diferente dos glicocorticóides agindo como antagonista destes, e dessa forma, aumentar a taxa de dissociação entre glicocorticóides e seus receptores. O tratamento com progesterona não altera o número de receptores GR, mostrando que a regulação da função do GR pela progesterona pode ocorrer de outra forma. Há evidências de que concentrações plasmáticas maiores de P₄ em fêmeas podem contribuir para redução da afinidade dos glicocorticóides por GR e assim diminuir a efetividade da retroalimentação negativa do cortisol durante a resposta ao estresse (AHIMA *et al.*, 1992; KELLER-WOOD *et al.*, 1988; TURNER, 1992).

O tratamento com P₄ causa diminuição da afinidade de ligação do MR, que deve refletir a presença do esteróide competitivo no citosol mais do que uma mudança intrínseca no receptor, já que a progesterona tem muita afinidade pelo MR e atua de forma competitiva. Além disso, esse tratamento reverte a diminuição da capacidade do receptor induzida por estrógeno. A natureza da interação da progesterona com o MR hipocampal parece ser antagonística. A ocupação limitada do MR pela progesterona poderia contribuir para o aumento da atividade do eixo HPA no final do proestro (CAREY *et al.*, 1995).

1.3.3.4 - Ação dos Esteróides Gonadais sobre a Retroalimentação Negativa

A amplitude e a duração da resposta do eixo HPA é maior em fêmeas indicando que a retroalimentação negativa deve ser menos efetiva (TURNER, 1992; YOUNG *et al.*, 2001). Assim, os

MR, em fêmeas, deveriam estar menos ocupados em concentrações baixas de CORT do que em machos. Se os MR agem para manter a atividade basal do eixo HPA, então qualquer redução da afinidade destes receptores deveria causar o aumento das concentrações basais de ACTH como de CORT. Outros trabalhos mostram que o E₂ pode estar envolvido na inibição da retroalimentação negativa mediada por GR em fêmeas (HANDA *et al.*, 1994; TURNER, 1992).

Tem sido mostrado que a P₄ antagoniza a inibição dos glicocorticóides sobre a secreção de β-endorfina em cultura de células hipofisárias, a inibição da liberação CRH por retroalimentação rápida de CORT em células hipotalâmicas isoladas e a inibição de ACTH pela CORT *in vivo*. Estas ações podem explicar as concentrações altas de CORT maternas no período final da gestação. Contudo, na ausência de corticosteróides, a P₄ parece também ter uma ação agonista à deles, desde que inibe a liberação de ACTH induzida por CRH e liberação de CRH a partir do hipotálamo (KELLER-WOOD *et al.*, 1988). No entanto, o trabalho de Young *et al.* (2001) mostrou que a progesterona não afetou a retroalimentação mediada por glicocorticóide.

2. Objetivos

Considerando que: a atividade do eixo HPA e os mecanismos de retro-alimentação que a controlam sofrem influência de esteróides sexuais (nas fêmeas, E_2 e P_4), de modo ainda não devidamente conhecido; o E_2 provém essencialmente do ovário, enquanto a P_4 origina-se do ovário e da adrenal e a maioria dos estudos restringe-se a animais ovariectomizados com ou sem reposição hormonal; e que entre a manhã e noite de proestro há atividade maior do eixo HPA.

O objetivo geral do trabalho foi: verificar se estrógeno (E_2) e progesterona (P_4) modulam a atividade basal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

Os objetivos específicos do trabalho foram: analisar a secreção de corticosterona e progesterona pela adrenal e as expressões de MR e de GR nas seguintes condições:

- na fase de proestro (presença de E_2 e P_4)
- após ovariectomia (ausência da ação de E_2 e P_4 de origem ovariana, mas presença da ação de P_4 de origem adrenal)
- após tratamento com antagonista de E_2 (ausência da ação de E_2 , mas permanência da ação de P_4 de origem ovariana e adrenal)
- após tratamento com antagonista de P_4 (ausência de ação da P_4 de origem ovariana e adrenal permanência de ação de E_2)
- após tratamento com antagonistas de E_2 e P_4 (ausência de ação E_2 de origem ovariana e de P_4 de origem ovariana e adrenal)

3. Materiais e Métodos

3.1 - Animais e Manipulação

Nos experimentos foram utilizadas ratas Wistar, pesando 250-280g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP e mantidas no Biotério do departamento de Fisiologia da FMRP-USP em caixas coletivas (cinco animais por caixa), sob fotoperíodo de 12/12 horas (luz das 06-18 horas), à temperatura de aproximadamente 22°C, com água e ração *ad libitum*. O ciclo estral das ratas foi monitorado diariamente utilizando a técnica do esfregaço vaginal e os animais que apresentaram pelo menos três ciclos regulares foram utilizados no experimento.

Ratas em metaestro ou diestro foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de ketamina (100mg/kg, Ketamina Agener® União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu-SP, Brasil) e xilazina (20mg/kg, Dopaser® Laboratório Calier S.A. Barcelona, Espanha) e submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. No período pós-cirúrgico as ratas permaneceram em local aquecido até a recuperação da anestesia e receberam dose profilática de antibiótico veterinário (0,2 mL I.M., Pentabiótico® Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas, SP, Brasil) e analgésico flunixinina meglumina (2,5mg/kg I.M, Banamine®, Schering-Plough Saúde Animal Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os animais foram mantidos, 5 por caixa, em recuperação durante 7 dias, no Biotério.

No dia anterior ao procedimento experimental, ratas ovariectomizadas (OVX) uma semana antes, e ratas em diestro dos demais grupos foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de tribromoetanol (250mg/Kg, Sigma-aldrich, Milwaukee, USA) em salina isotônica, para implantação de um cateter (Silastic® Dow Corning Co. Midland, Michigan, USA) na jugular externa até o átrio direito, segundo técnica descrita previamente (HARMS, OJEDA, 1974). Em seguida, os ratos ficaram em caixas individuais até a realização das coletas de sangue, no dia seguinte à cirurgia (Fig. 3).

3.2 - Tratamentos com Antagonistas de E₂ (tamoxifen) e de P₄ (RU486)

Tamoxifen (3 mg/0,2 mL de óleo de milho/animal, s.c.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ou óleo de milho (0,2 mL) foram administrados a ratas ciclando na manhã do metaestro e manhã do diestro (9h). RU486 (2 mg/0,2 mL óleo de milho/animal s.c.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ou óleo de milho (0,2 mL) foram administrados a ratas ciclando na manhã (8h) e na tarde (17h) do metaestro e do diestro e na manhã do proestro (8h) (Fig. 3).

3.3 - Procedimento Experimental

No dia do experimento, ao redor de 12:30h foi conectada uma extensão de polietileno (PE-50) contendo salina heparinizada (100 U.I/ml) ao catéter implantado na jugular, para permitir coleta de amostras de sangue com os animais movimentando-se livremente. Amostras de sangue (0,6 mL) foram coletadas em série às 13, 14, 15, 16, 17 e 18 horas. A reposição imediata de volemia após cada coleta foi realizada com injeção de salina isotônica. As coletas seriadas de sangue de todos os grupos experimentais, com exceção do grupo ovariectomizado, foram realizadas na fase de proestro, quando há elevação da secreção de estrógeno e de progesterona. Ao final do experimento os animais foram submetidos à perfusão de fixador (paraformaldeído 4%) sob anestesia (ketamina e xilazina, 100 e 20 mg/Kg respectivamente) para remoção do cérebro (Fig. 3)

A representação esquemática do cronograma dos experimentos está apresentada na figura 3. O protocolo experimental deste projeto foi submetido à análise pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP. Aprovação n°. 078/2008 (25 de Agosto de 2008).

3.4 - Dosagens Hormonais

O sangue coletado em cada experimento foi centrifugado e o plasma congelado a -20 °C até a realização das dosagens de CORT, P₄ e LH por radioimunoensaio (RIE).

A progesterona foi determinada por meio de conjunto de reagentes para RIE adquiridos da Diagnostic System Laboratories (DSL-3400, INC. USA). Parâmetros de ensaio: doses mínima detectável de 0,3 ng/ml; erro intra-ensaio de 3,5%; erro inter-ensaio de 6 %.

Para dosagem de CORT foi realizada a extração prévia com etanol. No RIE foram utilizados padrão e anticorpo específico adquiridos da Sigma Co. (St. Louis, Missouri, USA) e CORT triciada adquirida da Amershan (Piscataway, New Jersey USA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5 / 0,05%). Parâmetros de ensaio: dose mínima detectável de 2 ng/ml; erro intra-ensaio de 5 %; erro inter-ensaio de 8,5%.

A concentração plasmática de LH foi determinada por RIE de duplo anticorpo, com anticorpos específicos e padrões adquiridos junto ao *National Program of Pituitary Hormone, National Institute of Health* (Torrance, California, USA). O anticorpo secundário para a precipitação da reação do RIE foi produzido em ovelha pelo laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). O LH foi iodinado e purificado no mesmo laboratório. Parâmetros de controle do ensaio: dose mínima detectável de 0,05 ng/ml; erro intra-ensaio de 4%; erro inter-ensaio de 10,5%.

3.5 - Perfusão e Preparação do Tecido Cerebral para Imuno-Histoquímica

Os animais foram perfundidos com 80 ml de tampão Fosfato salina (PBS) 0,01 M, pH 7,4 e em seguida com 320 ml de solução de paraformaldeído 4% em tampão Fosfato 0,1 M. Após a perfusão, o cérebro foi retirado imediatamente e imerso em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas e em seguida transferido para uma solução de sacarose 30% até a saturação do tecido. Após a crioproteção, o material foi congelado em isopentano por 30 segundos e mantido à temperatura de -70° C até a secção e o processamento para imuno-histoquímica. Secções coronais de 20 µm foram feitas tendo como referência o Atlas Estereotáxico (SAWNSON, 1992) e montadas em lâminas gelatinizadas.

3.6 - Imuno-Histoquímica

As secções foram inicialmente lavadas com PBS 0,1 M por 25 minutos e, em seguida incubadas em solução de PBS + glicina 0,1 M, por 10 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito pela incubação das secções por 1 hora em solução de PBS 0,1M + BSA (albumina bovina sérica) 1% + triton 0,1%.

Os tecidos foram incubados com o anticorpo policlonal produzido em coelho, específico para GR (M-20, Santa Cruz Biotechnology- USA), na diluição 1:1000, por aproximadamente 20 horas à temperatura ambiente. Em seguida, após as lavagens com PBS, as secções foram incubadas por 45 minutos em PBS com Anti-IgG de coelho produzida em cabra e conjugada com AlexaFluor 594 (Molecular Probe, USA).

Na imuno-histoquímica para marcação de MR as secções foram lavadas com PBS 0,1 M por 15 minutos e posteriormente com PBS 0,1 M + triton 0,3% por mais 15 minutos. Em seguida os tecidos foram incubados por 10 minutos em PBS 0,1 M + glicina 0,75% + triton 0,3%, posteriormente incubados por 60 minutos em PBS 0,1 M + BSA 2% + triton 0,3%. A seguir, os tecidos foram incubados com anticorpo monoclonal produzido em camundongo específico para MR (MR1-18 6 G1, gentilmente cedido pelo Dr. Celso E. Gomez-Sanchez, University of Mississippi Medical Center, USA) na diluição 1:500 por 48 horas a 4°C. Após as lavagens com PBS, as secções foram incubadas por duas horas em PBS com anti-IgG de camundongo produzida em cabra e conjugada a AlexaFluor 594.

Após as incubações com anti-IgG conjugada com cromóforo, as lâminas foram lavadas com PBS por 50 minutos e por último, passadas na água destilada para retirar o excesso de sal e então

cobertas com lamínulas usando Fluoromount-G (Eletron Microscopy Science, Hatfield, PA) como meio de montagem.

3.7 - Regiões Cerebrais de Interesse

As áreas de interesse neste trabalho são a porção parvocelular do PVN equivalente ao nível -1,78 mm a partir do bregma (Fig. 4) e as regiões do hipocampo ventral, CA1 e subículo, equivalente aos níveis -4,6 mm, -5,0 mm, -5,25 mm e -5,65 mm a partir do bregma (Fig.5).

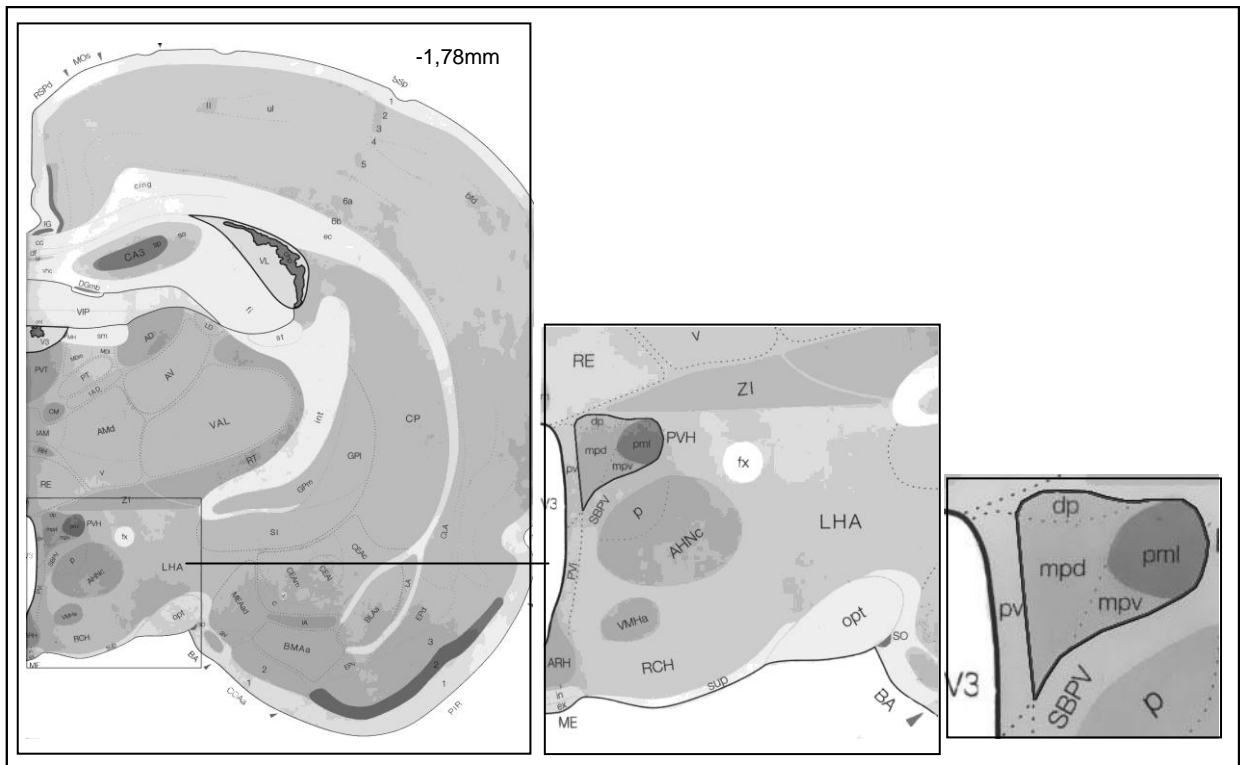


Figura 4. Porção parvocelular do PVN analisada (adaptado de Swanson, 1992).

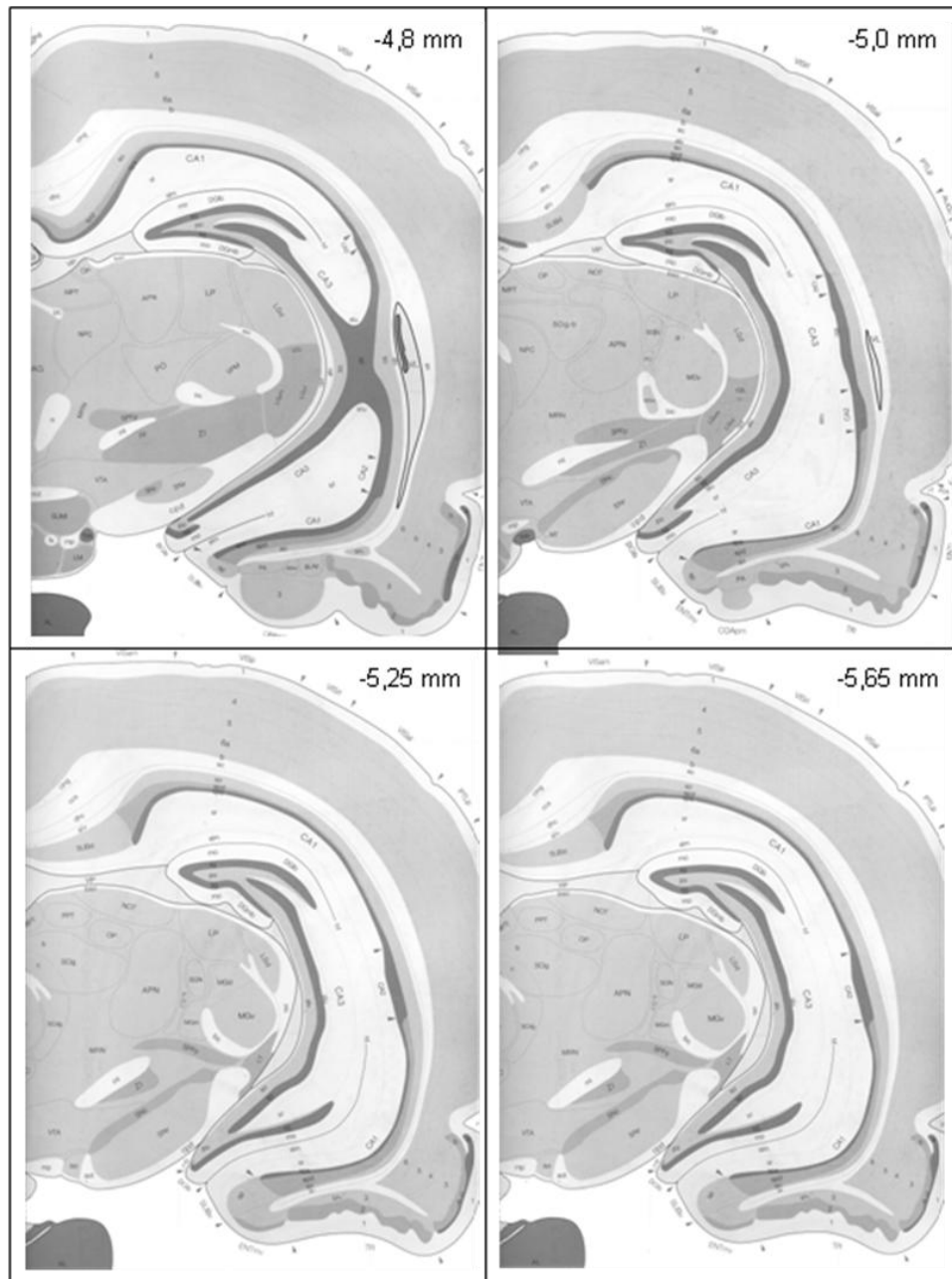


Figura 5. Imagem representativa dos níveis hipocâmpais aproximados em que são analisados CA1 e subículo ventrais. A) -4,8 mm a partir do bregma, B) -5,0 mm a partir do bregma, C) -5,25 mm a partir do bregma e D) -5,65 mm a partir do bregma (figura retirada de Swanson, 1992).

3.8 - Aquisição das Imagens

As secções foram examinadas em microscópio para fluorescência Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Germany) e as imagens capturadas por câmara digital (Carl Zeiss, Germany). As secções nas áreas cerebrais de interesse contendo neurônios marcados positivamente para MR e GR (apenas GR no PVN) foram adquiridas, classificadas de acordo com o Atlas Estereotáxico (SWANSON, 1992) e fotografadas bilateralmente.

3.9 - Contagem Neuronal

A contagem de células marcadas foi feita manualmente com base em critérios de contagem, levando em consideração a intensidade da coloração nuclear e citoplasmática, visualização no mesmo plano e delimitação dos componentes celulares. Para essa contagem foi utilizado o programa computacional Image J® (programa computacional disponibilizado gratuitamente pelo National Institute of Health, USA - <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Para cada animal, uma amostra de cada região cerebral de interesse (PVN, CA1 ventral ou subículo ventral) foi adquirida.

Os neurônios com marcação para GR nas fotomicrografias bilaterais do PVN parvocelular (-1,78mm a partir do bregma) foram contados obtendo-se uma amostra do número de neurônios nesta região. É importante salientar que a secção analisada também apresenta uma porção magnocelular lateral, mas como não há GR nesta região, consideramos todas as células marcadas como pertencentes à porção parvocelular (Fig. 4).

No CA1 ventral foi feita imuno-histoquímica para MR e GR. Como esta é uma área muito extensa foram fotografadas segmentos desta área, dois do lado direito e dois do lado esquerdo. Os segmentos do mesmo lado foram distanciados entre si para que não houvesse sobreposição das células fotografadas, conforme ilustrado na figura 6. Cada segmento fotografado correspondia a uma área de $155555 \mu\text{m}^2$, calculada com base na barra de escalas de $100 \mu\text{m}$. Foi calculada a média aritmética do número de células por segmentos de cada secção e posteriormente uma média das células contadas por segmentos nas 4 secções analisadas, obtendo-se no final uma amostra do número de células por $155555 \mu\text{m}^2$ de CA1 (Fig. 5; 6).

O subículo ventral foi fotografado bilateralmente, uma fotomicrografia por lado, em cada fotomicrografia foi contado o número de neurônios que expressaram marcação para MR ou GR e em seguida, foi calculada a média aritmética do número de neurônios marcados nas 4 secções bilaterais analisadas, obtendo-se no final uma amostra do número de células marcadas por subículo ventral (Fig. 5; 6).

3.10 - Análise Estatística

Os resultados das dosagens de CT e P_4 foram expressos por média \pm erro padrão da média, submetidos à análise de variância de dois fatores (TWO-WAY ANOVA) com medidas repetidas,

seguida de pós-teste Tukey (SigmaStat for Windows Version 3.10, 2004). As duas variáveis analisadas foram tratamento e horário de coleta. Os resultados de dosagem hormonal avaliados como área sob a curva (AUC) foram submetidos à análise de variância de um fator (ONE-WAY ANOVA) seguido do pós teste de Tukey. Os dados do pico de secreção de LH foram submetidos ao teste T. Os resultados de contagem neuronal foram submetidos à análise de variância de um fator (ONE-WAY ANOVA). A diferença estatisticamente significativa foi considerada para $P < 0.05$.

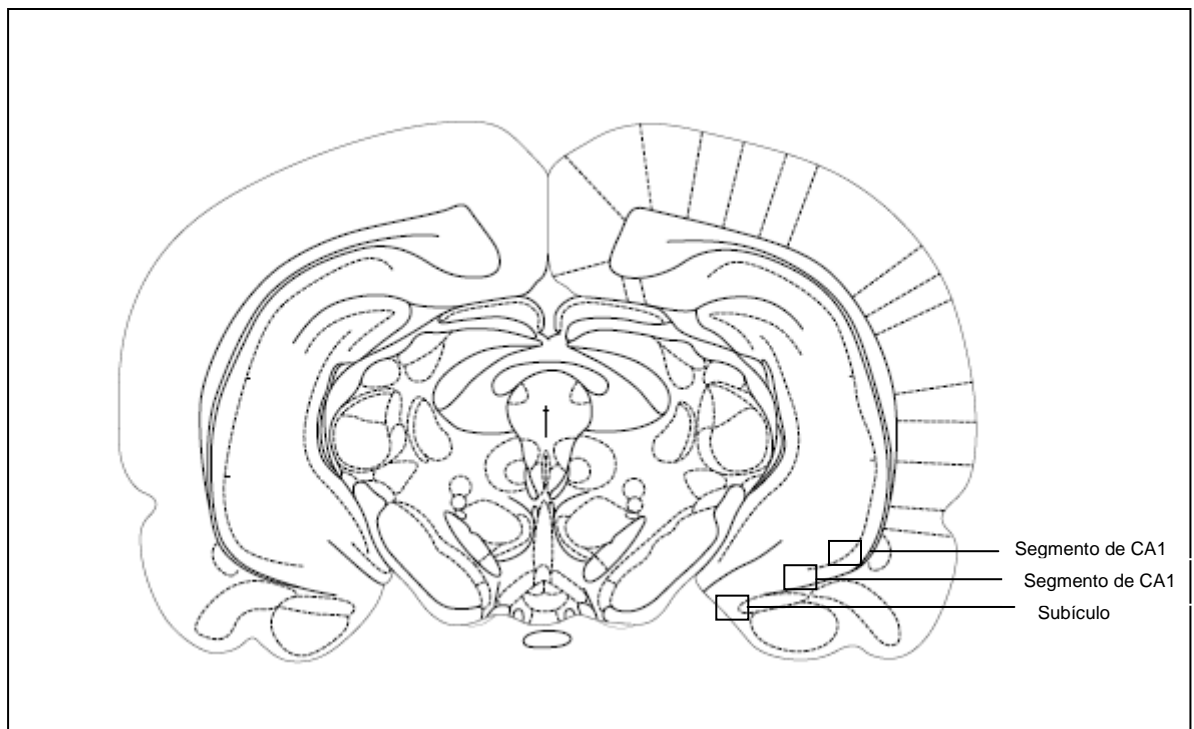


Figura 6. Localização dos segmentos de CA1 e subículo ventral do hipocampo (figura retirada de Paxinos e Watson, 1997).

4. Resultados

4.1 - Dosagens Hormonais

4.1.1 - LH

As ratas utilizadas neste trabalho tiveram a fase de proestro verificada pelo esfregaço vaginal realizado pela manhã e confirmada pela determinação do pico pré-ovulatório de LH à tarde (Figura 7).

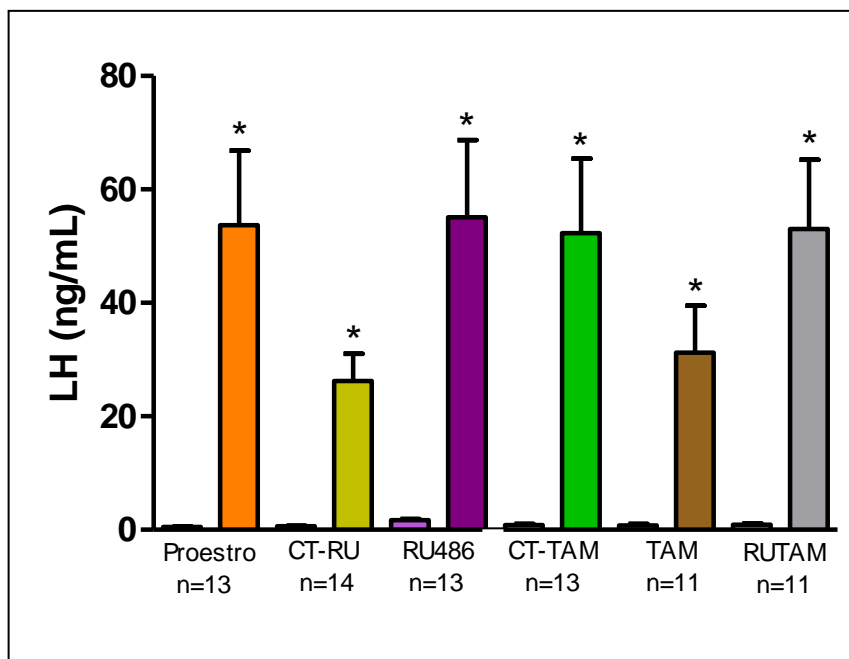


Figura 7. Secreção de LH na tarde do proestro. Valores basais à esquerda e valores de pico à direita em cada grupo. Os valores de pico foram significativamente maiores que os valores basais. * Diferença significativa em relação ao valor basal do mesmo grupo, $P < 0,05$.

4.1.2 - Corticosterona

A dosagem de CORT foi utilizada para avaliar a atividade do eixo HPA a partir da secreção da adrenal. Não houve diferença da concentração plasmática de CORT entre os grupos controles tratados com óleo de milho, CT-TAM e CT-RU e o grupo de ratas em proestro que não recebeu nenhuma injeção subcutânea. Isto indica que a injeção subcutânea não constituiu um fator de estresse para os animais (Figura 8 A).

Nos horários das 13 e 15 horas a secreção de CORT pelo grupo RU486 foi maior que no seu grupo controle ($p=0,018$ e $p=0,009$, respectivamente) (Figura 8 B). Entretanto, o grupo tratado com RU486 não apresentou área sob a curva (em $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$) de concentração plasmática de CORT ($456,6 \pm 54,6 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$) diferente do grupo CT-RU ($357,1 \pm 30,8 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$), indicando que o bloqueio da ação da progesterona não afetou a secreção total de CORT na tarde do proestro (Figura 8 E).

Somente no horário das 15h a secreção de CORT pelo grupo TAM foi menor que a secreção do grupo CT-TAM ($p=0,009$) (Figura 8 C). As áreas sob as curvas de concentração plasmática de CORT (Figura 8 E) não foram diferentes entre os grupos TAM ($288,0 \pm 35,6$ ng.h/mL) e CT-TAM ($375,7 \pm 35,0$ ng.h/mL). Estes resultados mostram que o bloqueio da ação do estrógeno não causou alteração da secreção total de CORT pela adrenal.

Nos horários das 15 e 16 horas a secreção de CORT pelo grupo RUTAM foi maior que no seu grupo controle ($p=0,007$ e $p=0,011$, respectivamente) (Figura 8 D). A secreção total de CORT, representada pelas áreas sob as curvas (Figura 8 E) não foi diferente entre o grupo RUTAM ($455,8 \pm 34,2$ ng.h/mL) e o grupo CT-RU ($357,1 \pm 30,8$ ng.h/mL), mostrando que essa secreção também não se altera com o bloqueio simultâneo das ações de ambos hormônios, estrógeno e progesterona.

Confirmando que a ação do estrógeno e da progesterona de origem ovariana não interfere na secreção total de CORT na tarde do proestro, o grupo OVX não mostrou diferença do grupo Proestro (Figura 8 A).

4.1.3 - Progesterona

Não houve diferença na secreção de P_4 entre os grupos controles tratados com óleo, CT-TAM e CT-RU e o grupo Proestro. O grupo OVX apresentou secreção de P_4 menor que os grupos Proestro ($p<0,001$) e CT-TAM ($p=0,004$) ($F_{3,305} = 7,142$ $p<0,001$) (Figura 9 A).

O grupo tratado com RU486, apresentou secreção de P_4 aumentada às 13 ($p=0,003$), 15 ($p<0,001$), 16 ($p=0,016$), 17 ($p=0,016$) e 18 horas ($p<0,001$) em relação ao grupo CT-RU (Figura 9 B), A secreção total de progesterona foi maior no grupo RU486 ($132,7 \pm 10,2$ ng.h/mL) do que no grupo CT-RU ($69,4 \pm 9,3$ ng.h/mL) ($F_{1,131} = 21,621$ $p<0,001$) (Figura 9 E).

A secreção de P_4 no grupo TAM foi menor que do grupo CT-TAM ($p<0,001$) às 18 horas (Figura 9 C) porém, não houve diferença na secreção total (Figura 9 E) entre esses grupos ($59,2 \pm 6,3$ e $77,6 \pm 9,1$ ng.h/mL, respectivamente).

Com relação à variável horário a secreção de P_4 foi maior no grupo RUTAM às 14 e 15 horas ($p=0,022$ e $p<0,001$, respectivamente) (Figura 9 D). Contudo, a secreção total de progesterona mostrou que esta medida no grupo RUTAM ($101,9 \pm 10,1$ ng.h/mL) não foi diferente do grupo CT-RU ($69,4 \pm 9,3$ ng.h/mL).

A secreção total de P_4 , no grupo RU486 foi maior que nos grupos CT-RU ($p<0,001$), CT-TAM

($p < 0,01$) e TAM ($p < 0,001$); e no grupo RUTAM foi maior que no grupo TAM ($p < 0,05$) (Figura 9 E).

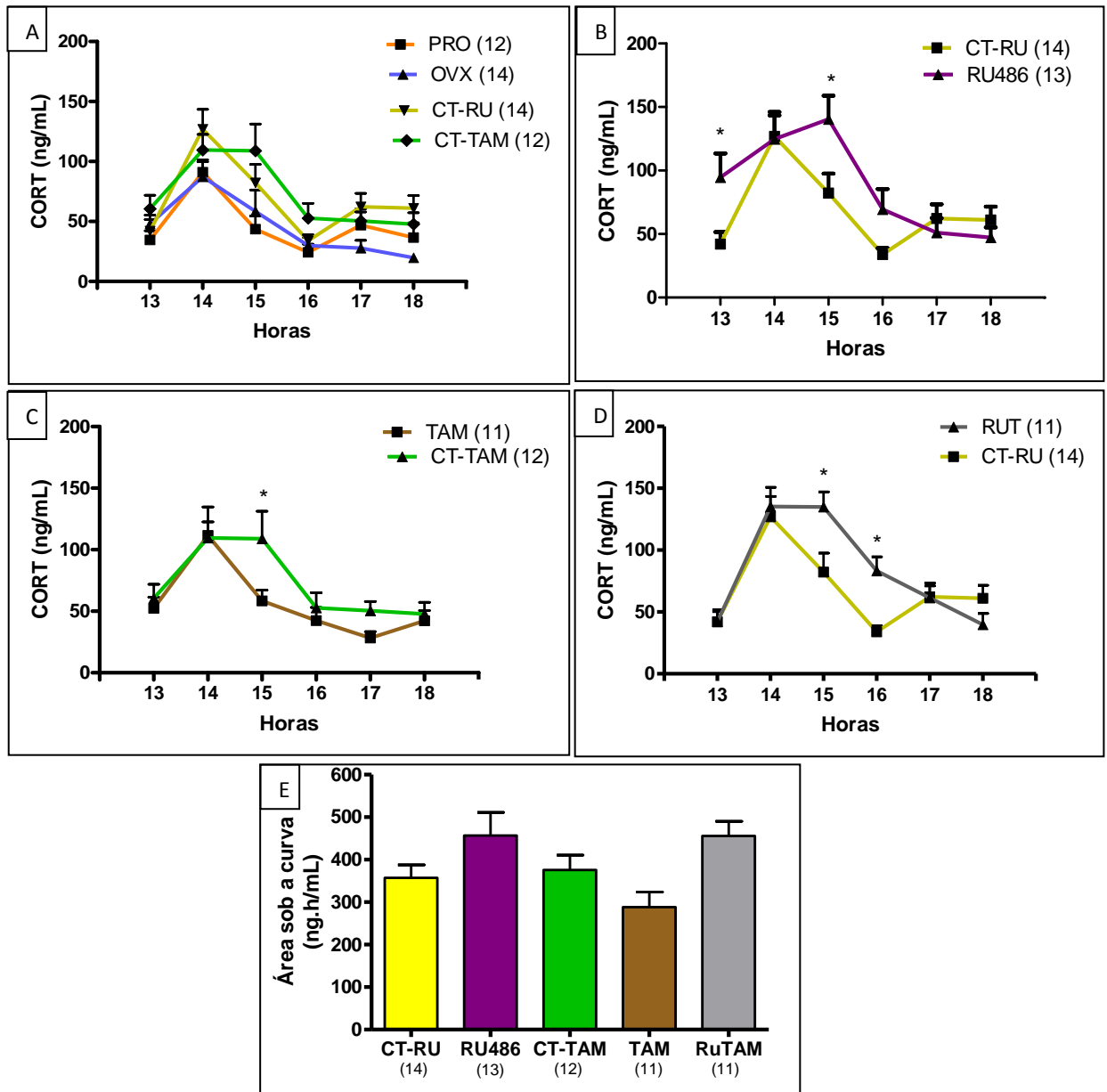


Figura 8. Evolução temporal da secreção de CORT (ng/mL) na tarde de proestro e secreção total indicada pela área sob a curva (ng.h/mL). (A) Comparação do grupo Proestro (PRO) com os dois grupos controles tratados com óleo de milho (CT-RU e CT-TAM) e com o grupo ovariectomizado (OVX); (B) comparação do grupo RU486 e seu controle; (C) comparação do grupo Tamoxifen (TAM) e seu controle; (D) comparação do grupo tratado com RU486 e Tamoxifen (RUTAM) e seu controle; (E) comparação das áreas sob as curvas de evolução temporal da secreção de CORT. Entre parênteses o número de animais no respectivo grupo: PRO, n=12; OVX, n=14; CT-RU, n=14; RU486, n=13; CT-TAM, n=12; TAM, n=11 e RUTAM, n=11. * Diferença significativa em relação à secreção de CORT do grupo abaixo no mesmo horário, $P < 0,05$.

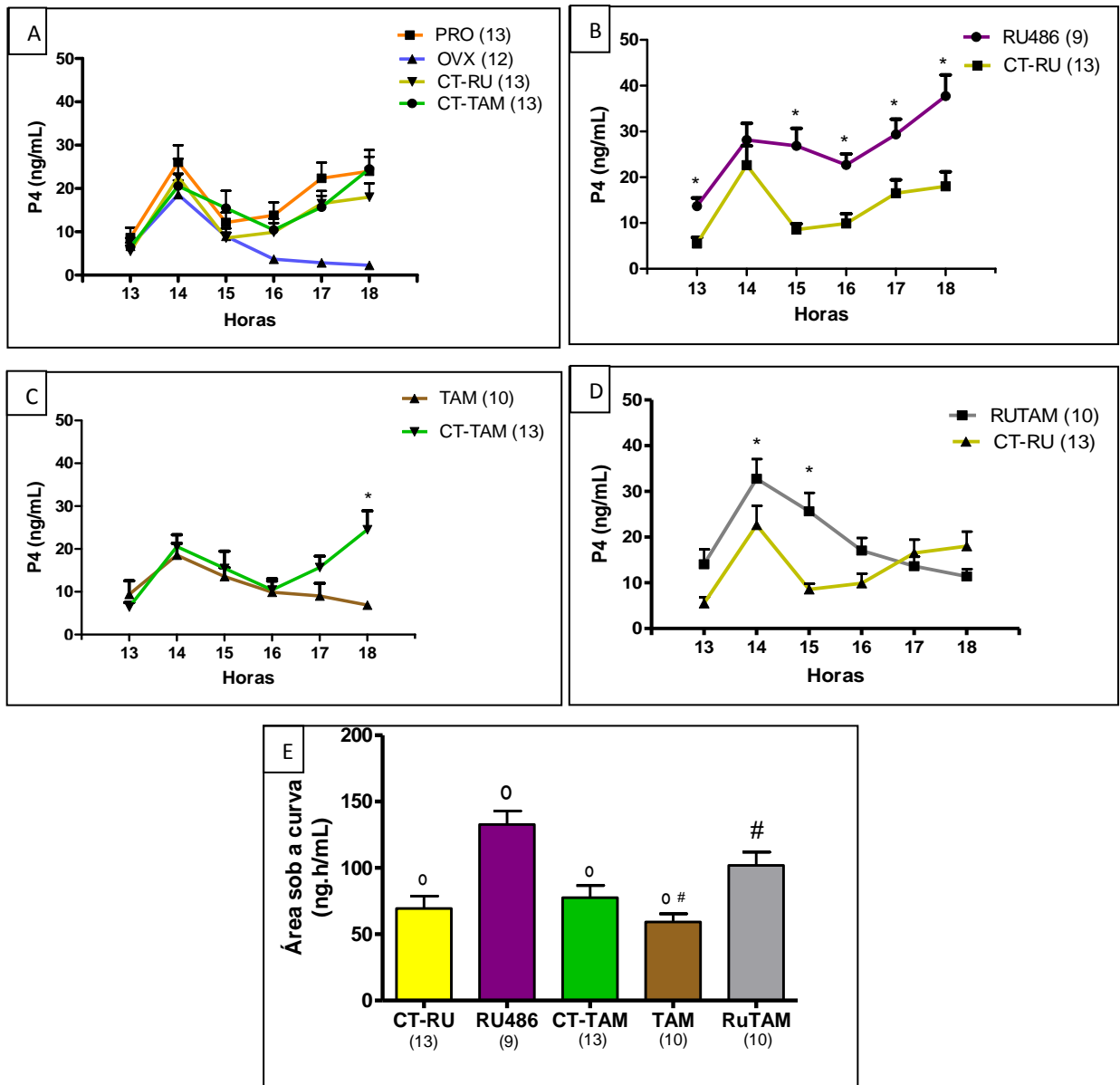


Figura 9. Evolução temporal da secreção de progesterona (P₄, ng/mL) na tarde do proestro e secreção total indicada pela área sob a curva (ng.h/mL). (A) Comparação do grupo Proestro (PRO) com os dois grupos controles tratados com óleo de milho (CT-RU e CT-TAM) e com o grupo ovariectomizado (OVX); (B) comparação do grupo RU486 e seu controle; (C) comparação do grupo Tamoxifen (TAM) e seu controle; (D) comparação do grupo tratado com RU486 e Tamoxifen (RUTAM) e seu controle; (E) comparação das áreas sob as curvas de evolução temporal da secreção de CORT. Entre parênteses o número de animais no respectivo grupo: PRO, n=13; OVX, n=12; CT-RU, n=13; RU486, n=9; CT-TAM, n=13; TAM, n=10 e RUTAM, n=10. * Diferença significativa em relação à secreção de P₄ do grupo abaixo no mesmo horário, P < 0,05. ^o Diferença significativa da área sob a curva em relação ao grupo RU486, P < 0,05. # Diferença significativa da área sob a curva em relação ao grupo RUTAM, P < 0,05.

4.2 - Imuno-histoquímica

4.2.1 - GR

As áreas de interesse para a contagem das células com expressão de GR e MR foram escolhidas por serem sítios onde ocorre retroalimentação negativa da CORT sobre o eixo HPA. Estas áreas são CA1 ventral e subículo ventral do hipocampo, e PVNp (apenas GR).

4.2.1.1 - PVN

O número de células marcadas com GR no grupo RU486 não foi diferente ($357,8 \pm 23,6$) do grupo CT-RU ($387 \pm 23,0$). O grupo TAM ($399,2 \pm 11,0$) também não apresentou diferença em relação a seu controle, CT-TAM ($382,7 \pm 39,6$), quanto a este parâmetro. Assim como o grupo tratado com ambos antagonistas, RUTAM ($379,9 \pm 21,3$), não foi diferente do seu controle, CT-RU ($387 \pm 23,0$). Por fim, o número de células GR no PVNp do grupo Proestro ($354,0 \pm 21,1$) foi semelhante ao número de células marcadas nesta área no grupo OVX ($377,9 \pm 30,2$) (Figuras 10, 13).

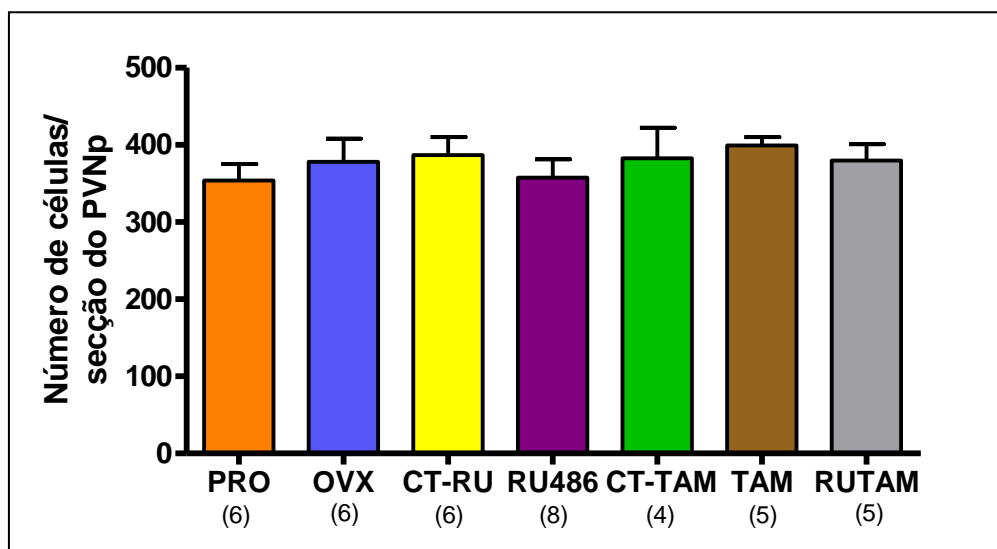


Figura 10. Número de células com imunorreatividade para receptores de glicocorticóides (ir-GR) por secção da região parvocelular do núcleo paraventricular (PVNp) nos diferentes grupos: Proestro (PRO); ovariectomizado (OVX); RU486 e seu controle (CT-RU); Tamoxifen (TAM) e seu controle (CT-TAM); RUTAM (RU486 e Tamoxifen). Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

4.2.1.2 - CA1 Ventral

Nesta região, o número de células GR marcadas foi semelhante no grupo Proestro (213,8± 7,83) e no grupo OVX (205,6 ± 8,2). A contagem neuronal nos grupos RU486 (202,1 ± 10,8) e CT-RU (232,9 ± 12,4) e RUTAM (200,7 ± 2,6) e CT-RU (232,9 ± 12,4) também não mostrou nenhuma diferença estatística. O mesmo ocorreu na contagem de células no CA1 do grupo TAM (229,9 ± 7,3) e CT-TAM (232,7 ± 7,3) (Figuras 11, 14).

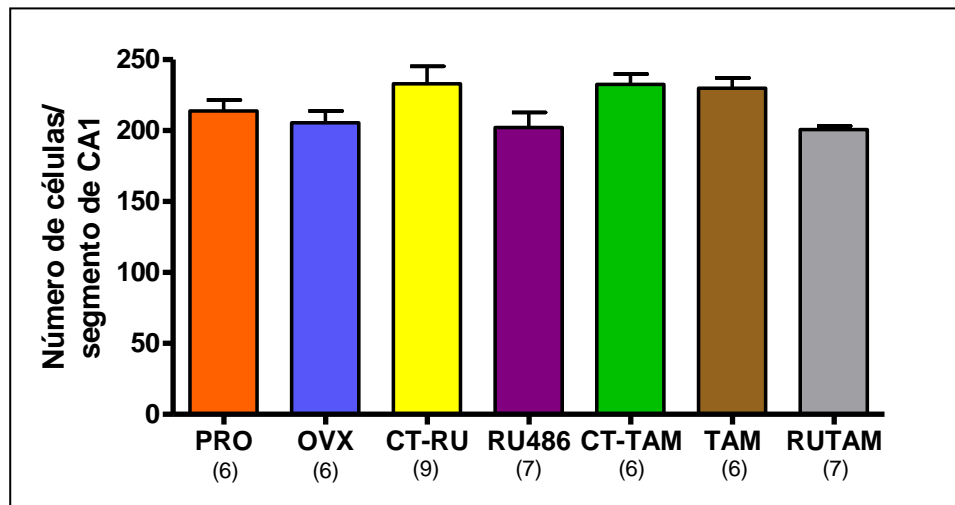


Figura 11. Número de células com imunorreatividade para receptores de glicocorticóides (ir-GR) por segmento da região CA1 ventral do hipocampo nos diferentes grupos: Proestro (PRO); ovariectomizado (OVX); RU486 e seu controle (CT-RU); Tamoxifen (TAM) e seu controle (CT-TAM); RUTAM (RU486 e Tamoxifen). Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

4.2.1.3 - Subículo Ventral

O subículo ventral não apresentou diferença significativa na contagem do número de células GR marcadas nos diferentes tratamentos em relação a seus grupos controles: Proestro (473,3 ± 17,3) e OVX (503 ± 24,9), RU486 (466,6 ± 36,7) e CT-RU (467,4 ± 34,7), TAM (488,5 ± 6,9) e CT-TAM (533,2 ± 29,0), RUTAM (452,1 ± 25,9) e CT-RU (467,4 ± 34,7) (Figuras 12, 15).

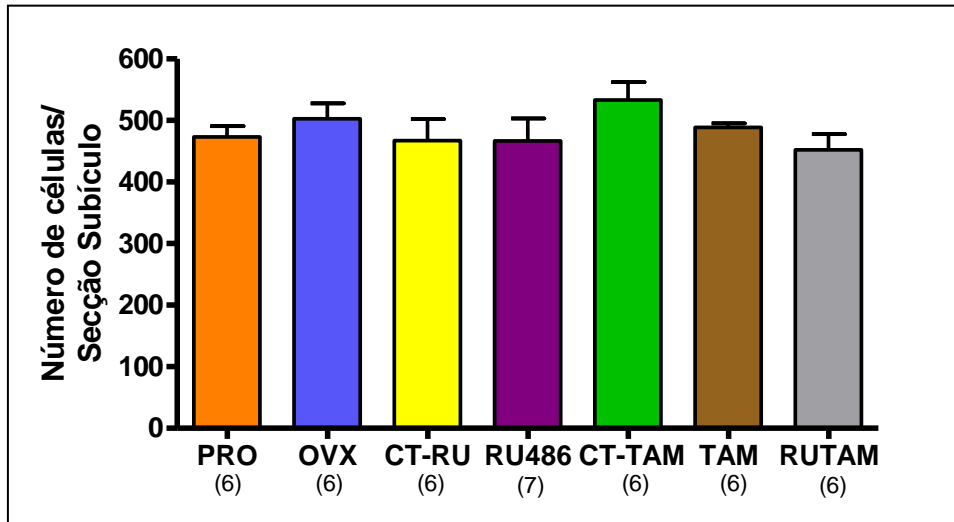
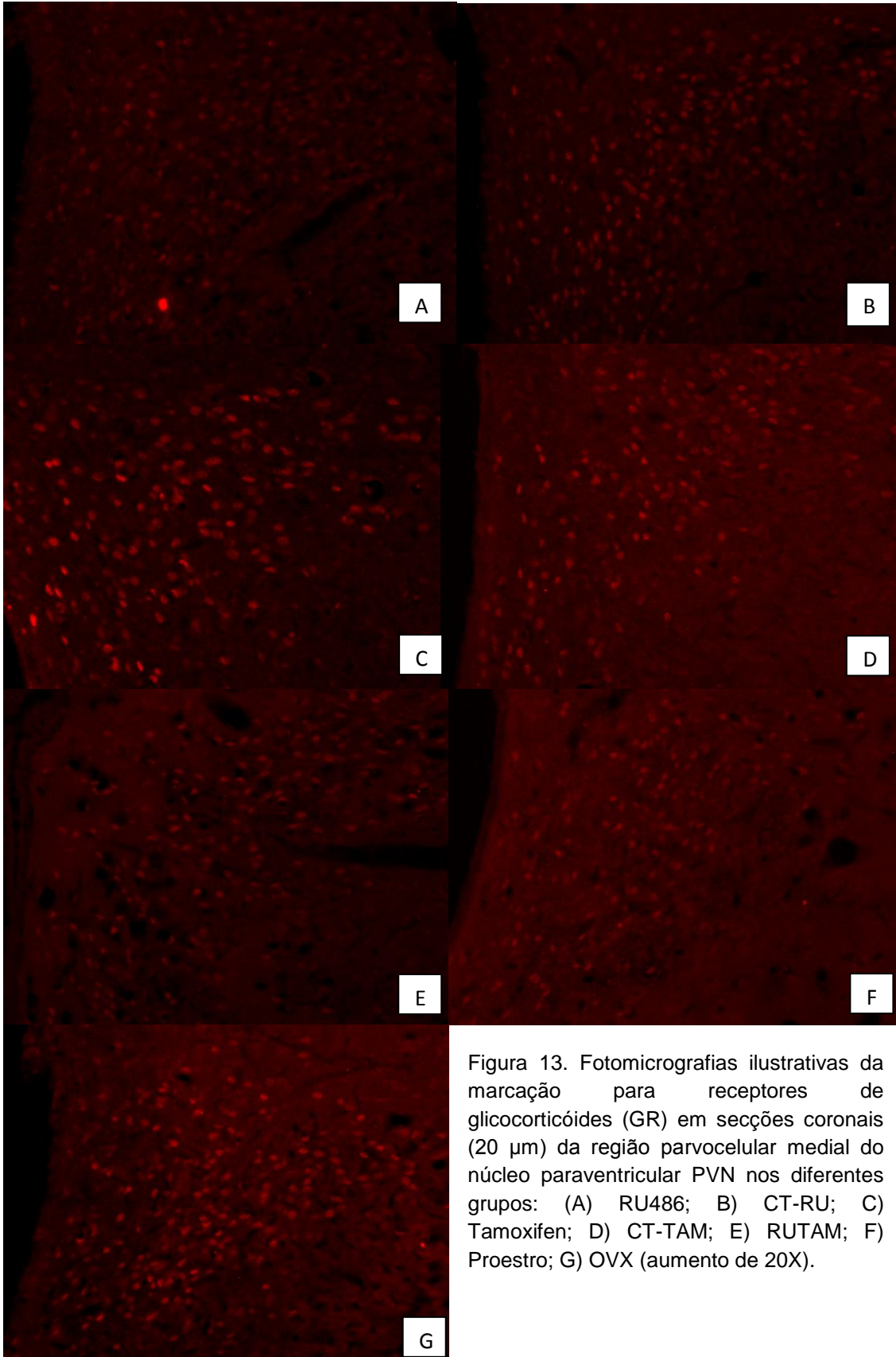


Figura 12. Número de células com imunorreatividade para receptores de glicocorticóides (ir-GR) por secção de subículo ventral do hipocampo nos diferentes grupos: Proestro (PRO); ovariectomizado (OVX); RU486 e seu controle (CT-RU); Tamoxifen (TAM) e seu controle (CT-TAM); RUTAM (RU486 e Tamoxifen). Entre parênteses o número de animais em cada grupo.



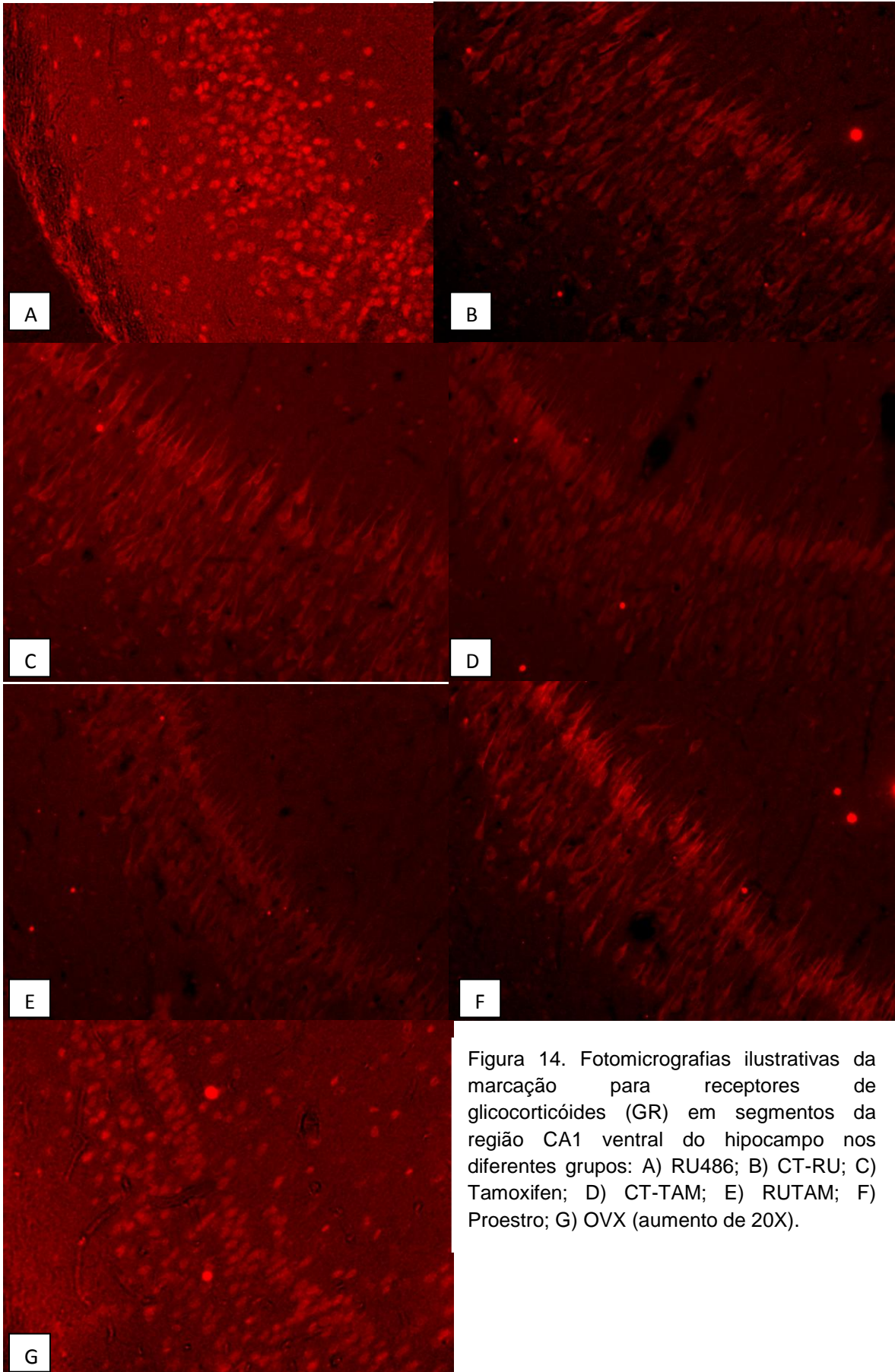
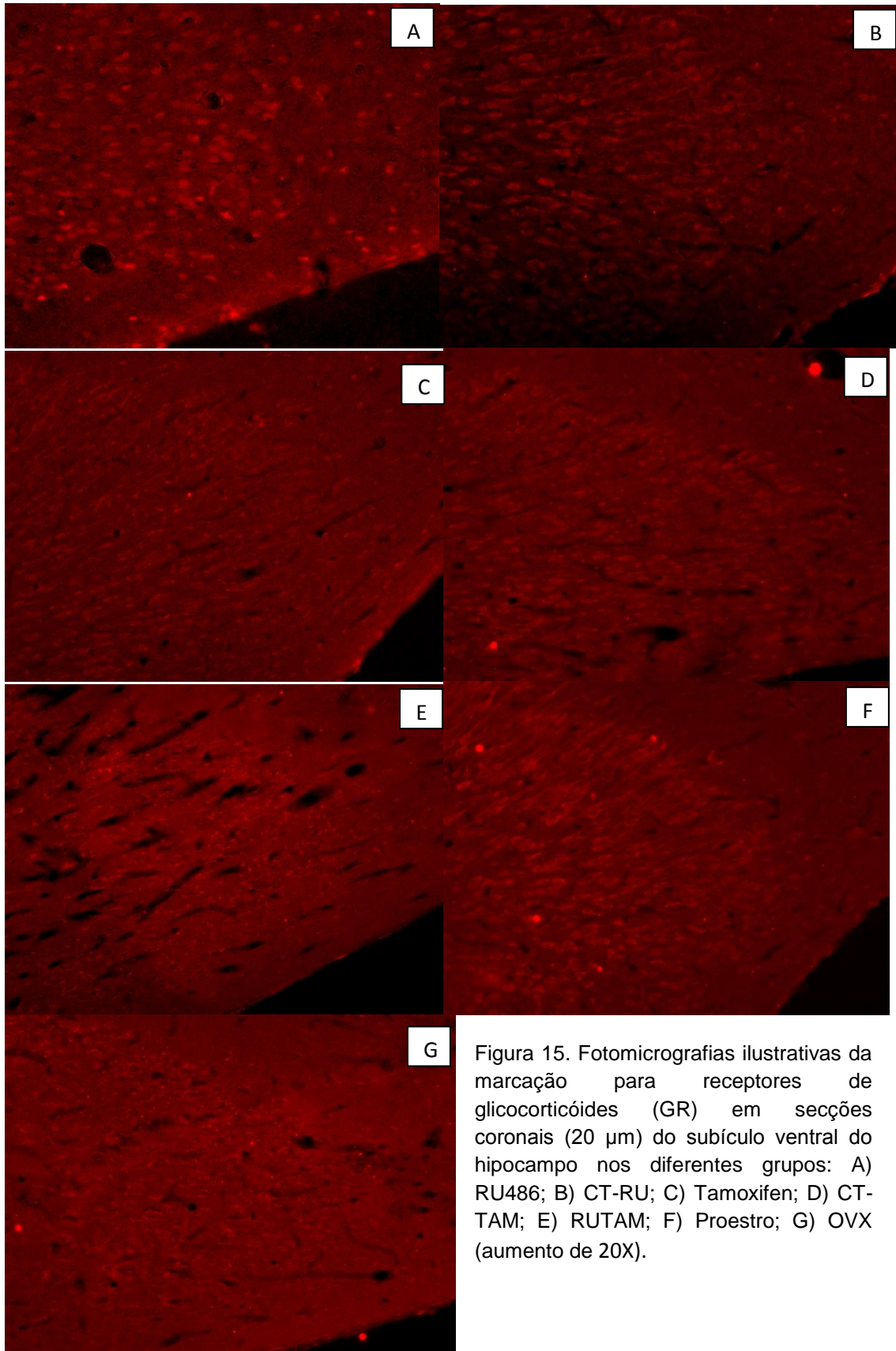


Figura 14. Fotomicrografias ilustrativas da marcação para receptores de glicocorticóides (GR) em segmentos da região CA1 ventral do hipocampo nos diferentes grupos: A) RU486; B) CT-RU; C) Tamoxifen; D) CT-TAM; E) RUTAM; F) Proestro; G) OVX (aumento de 20X).



4.2.2 - MR

4.2.2.1 - CA1 Ventral

O número de células marcadas com MR no grupo OVX ($208,7 \pm 5,5$) não diferiu do número de células marcadas no grupo Proestro ($211,9 \pm 12,8$). Os animais tratados com RU486 ($229,7 \pm 9,2$) apresentaram número semelhante de células marcadas com MR no CA1 que o grupo CT-RU ($252,26 \pm 13,31$). O grupo TAM ($215,2 \pm 6,3$) também não apresentou diferença estatística em relação a seu controle CT-TAM ($228,8 \pm 8,9$). O grupo tratado com ambos antagonistas, RUTAM ($217,2 \pm 6,7$) não mostrou diferença na expressão de MR nesta região comparado ao controle CT-RU ($252,3 \pm 13,3$) (Figuras 16, 18).

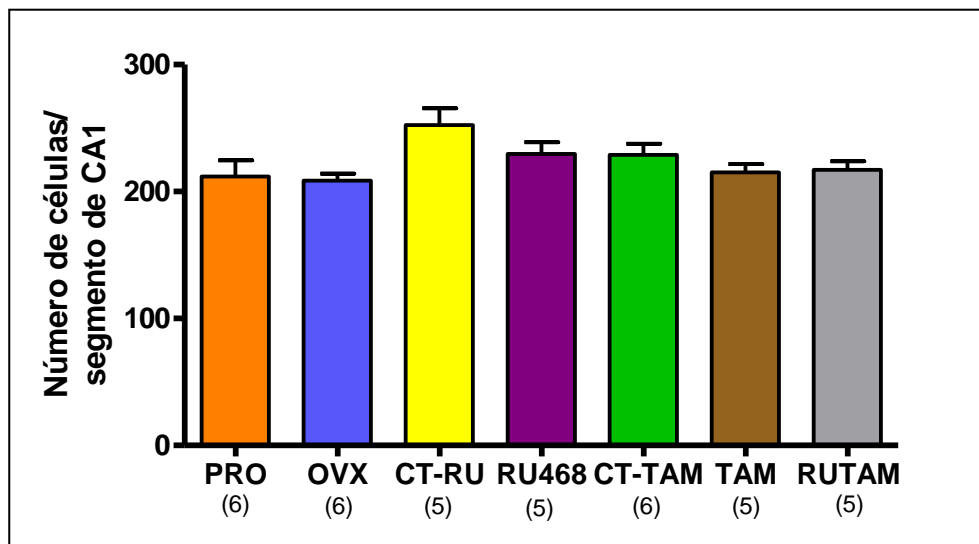


Figura 16. Número de células com imunorreatividade para receptores de mineralocorticóides (ir-MR) por segmento da região CA1 ventral do hipocampo nos diferentes grupos: Proestro (PRO); ovariectomizado (OVX); RU486 e seu controle (CT-RU); Tamoxifen (TAM) e seu controle (CT-TAM); RUTAM (RU486 e Tamoxifen). Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

4.2.2.2 - Subículo Ventral

Nesta região o número de marcações para MR foi semelhante nos grupos Proestro ($461,8 \pm 9,88$) e OVX ($478,8 \pm 12,30$), RU486 ($491,7 \pm 24,5$) e CT-RU ($517,3 \pm 11,1$), TAM ($490,6 \pm 29,5$) e CT-TAM ($502,7 \pm 17,5$) assim como nos grupos RUTAM ($488,8 \pm 21,1$) e CT-RU ($517,3 \pm 11,1$) (Figuras 17, 19).

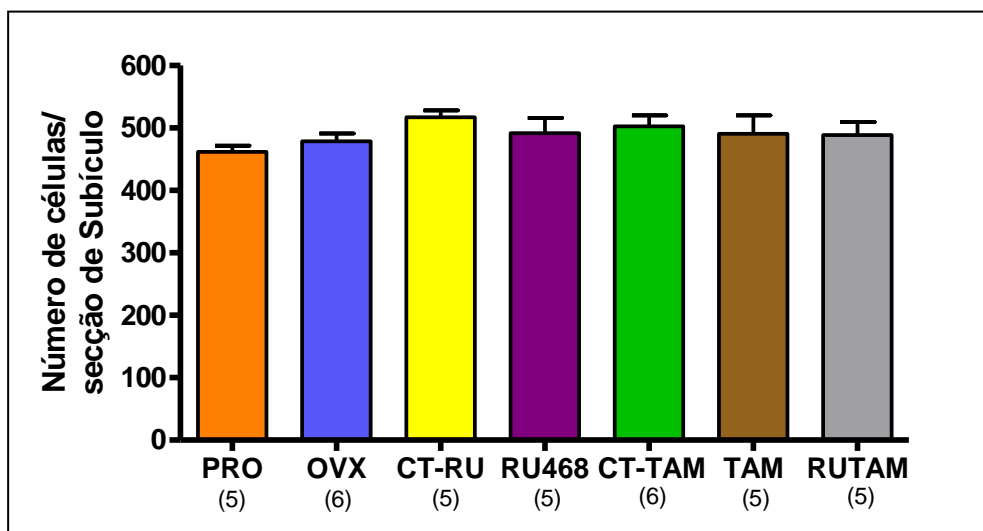


Figura 17. Número de células com imunorreatividade para receptores de mineralocorticóides (ir-MR) por secção de subículo ventral do hipocampo nos diferentes grupos: Proestro (PRO); ovariectomizado (OVX); RU486 e seu controle (CT-RU); Tamoxifen (TAM) e seu controle (CT-TAM); RUTAM (RU486 e Tamoxifen). Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

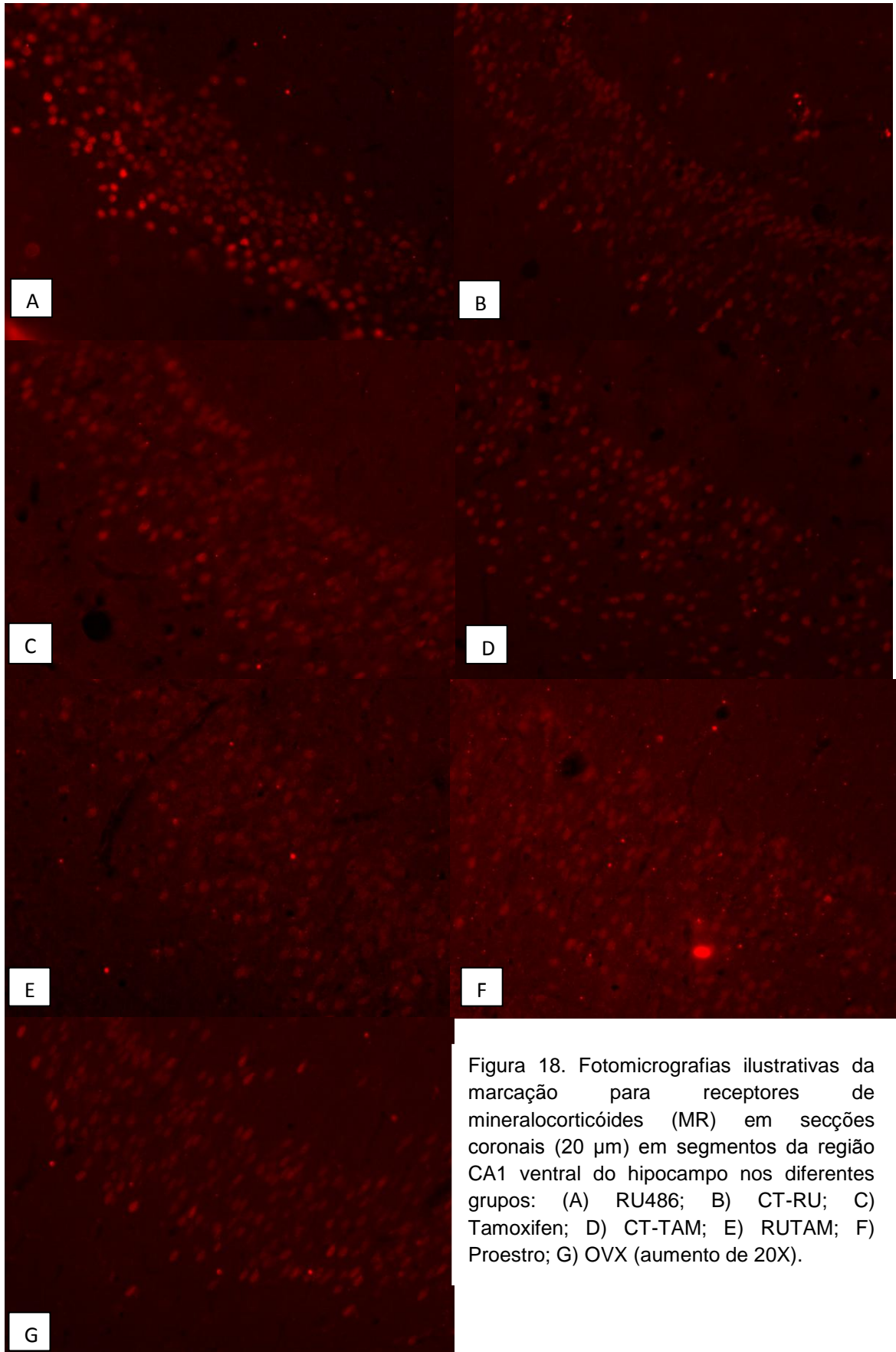


Figura 18. Fotomicrografias ilustrativas da marcação para receptores de mineralocorticóides (MR) em secções coronais (20 μ m) em segmentos da região CA1 ventral do hipocampo nos diferentes grupos: (A) RU486; B) CT-RU; C) Tamoxifen; D) CT-TAM; E) RUTAM; F) Proestro; G) OVX (aumento de 20X).

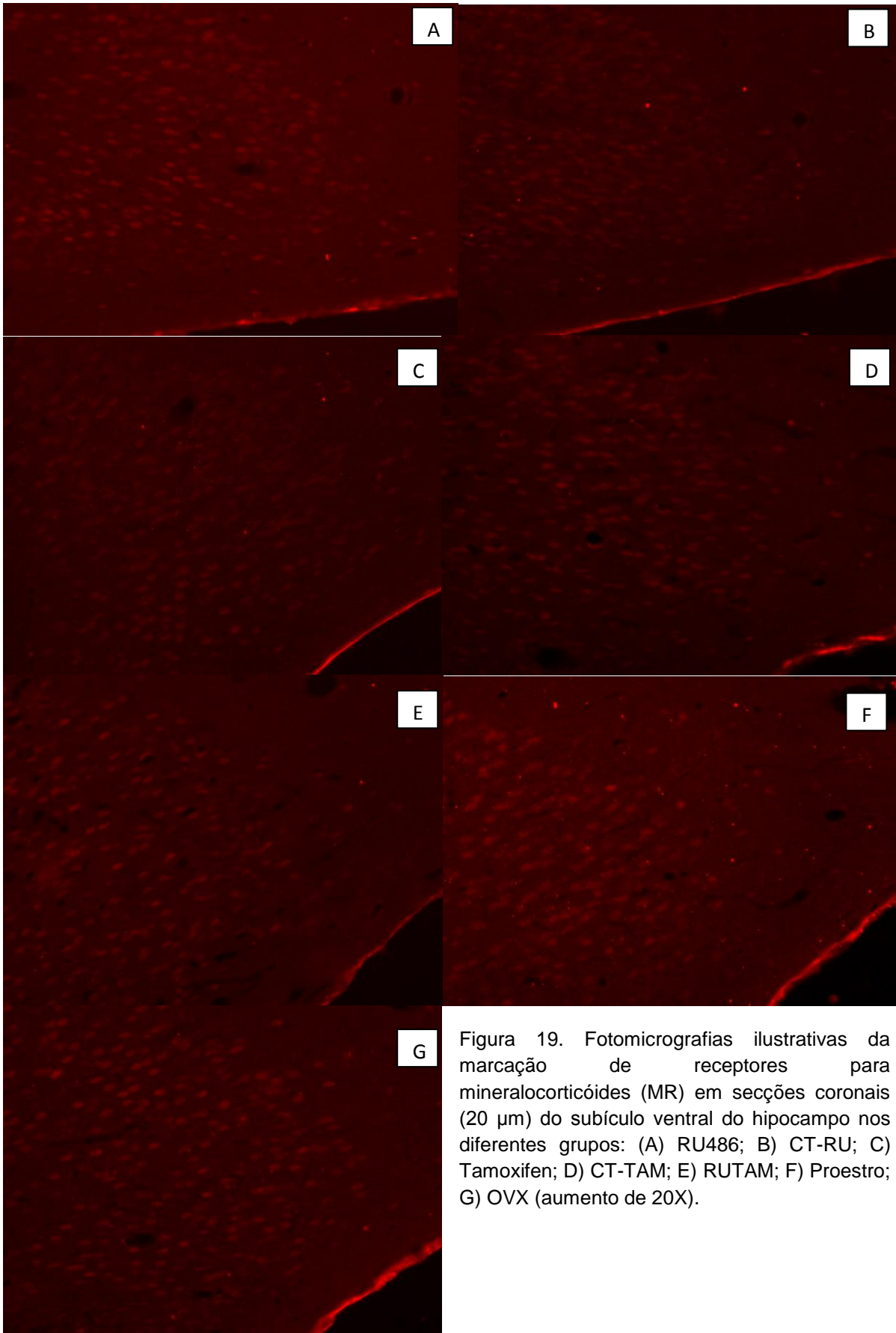


Figura 19. Fotomicrografias ilustrativas da marcação de receptores para mineralocorticóides (MR) em secções coronais (20 μ m) do subículo ventral do hipocampo nos diferentes grupos: (A) RU486; (B) CT-RU; (C) Tamoxifen; (D) CT-TAM; (E) RUTAM; (F) Proestro; (G) OVX (aumento de 20X).

5. Discussão

5.1 - Secreção de Corticosterona

Não houve diferença na concentração plasmática basal de CORT entre ratas controle, que receberam injeções de óleo, e ratas em proestro ou ovariectomizadas. Isto indica que: as injeções subcutâneas per si, utilizadas nos tratamentos executados em nossos experimentos, não constituíram fator estressor capaz de induzir alteração significativa da secreção de CORT; a remoção dos ovários não altera a secreção basal de CORT.

Em fêmeas ocorre alteração da atividade basal do eixo HPA ao longo do ciclo estral: a expressão de RNAm para CRH e a secreção de CORT são maiores no proestro do que nas outras fases do ciclo (ATKINSON, WADDELL, 1997; CRITCHLOW *et al.* , 1963; LAFLAME *et al.* , 1998; SEALE *et al.* , 2004; VIAU, MEANEY, 1991). Além disso, o eixo HPA é mais sensível ao estresse durante o proestro. O aumento da sensibilidade do eixo HPA ao estresse durante o proestro pode ser um mecanismo pelo qual condições ambientais desfavoráveis à reprodução sinalizam uma inibição da atividade do eixo HPG ou um mecanismo protetor para assegurar sucesso reprodutivo durante o estro (VIAU, MEANEY, 1991). No entanto, ainda está para ser esclarecido se isto ocorre devido aos hormônios sexuais aumentados nesta fase do ciclo. Alguns pesquisadores mostraram que a redução da concentração de CORT após a ovariectomia é revertida pela administração de estrógeno, indicando que talvez o estrógeno seja um fator responsável pelo aumento da secreção de CORT durante o proestro (SEALE *et al.* , 2004). Contudo outros estudos não mostraram diferenças na secreção de CORT induzida por estresse ao longo do ciclo estral, sugerindo que sob certas condições a atividade do eixo HPA não é necessariamente influenciada pela fase do ciclo estral (GUO *et al.* , 1994; RIVIER, 1999).

A atividade do eixo HPA varia em função de dois fatores principais, um deles é o ritmo circadiano, o outro fator é o estresse. O ritmo circadiano é quando concentrações basais de ACTH e de glicocorticóides variam marcadamente em animais não estressados, ao longo do curso do dia (FUNDER, SHEPPARD, 1987). A secreção de glicocorticóides varia de acordo com um ritmo circadiano, na maioria das espécies de vertebrados; em ratos e camundongos, o pico de secreção de CORT ocorre logo antes do início da fase escura do dia, enquanto em humanos o pico de cortisol é antes do raiar do dia (HERMAN, MUELLER, 2006).

O núcleo supraquiasmático (SCN) possui atividade de marca-passo circadiano para uma área ventral ao PVN, que deve influenciar transsinápticamente a expressão de CRH e AVP. O SCN tem

poucos GR e parece estar desacoplado do ritmo circadiano da atividade do eixo HPA (DE KLOET *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostram que ocorreu um pico de secreção de CORT por volta das 14h em todos os grupos experimentais, provavelmente, devido às condições experimentais a que estes animais foram submetidos. Na literatura há uma variabilidade grande do horário desse pico (15-20h), em função do ciclo claro/escuro (14/10h ou 12/12h) e do início (4-7h) e término (17 -21h) deste ciclo (CRITCHLOW *et al.*, 1963 ; SEALE *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 1994; DALLMAN *et al.*, 1987; ATKINSON, WADDELL, 1997). Nosso biotério funciona em ciclo de 12/12h com início do ciclo claro às 6h e término às 18h.

5.2- Ações de antagonistas de E₂ e P₄ na secreção de CORT

O bloqueio da ação do estrógeno e/ou da progesterona pelo uso de antagonistas (Tamoxifen e RU486, respectivamente) não alterou a secreção basal total de corticosterona na tarde de proestro. Entretanto, estes antagonistas afetaram pontualmente a secreção de CORT, com o RU 486 aumentando a secreção às 13 e às 15 horas e o tamoxifen reduzindo a secreção às 15 horas. O uso de antagonistas permite observar que o E₂ e a P₄ parecem exercer efeitos antagônicos sobre a secreção de CORT, respectivamente estimulatório e inibitório. Contudo, a ovariectomia não alterou a secreção de CORT em relação a ratas em proestro. Nesta situação além da retirada simultânea do E₂ e da P₄, outros fatores ovarianos cujas ações ainda são desconhecidas também são removidos.

Neste estudo as ratas estavam em condição basal e a administração de antagonista de E₂ não alterou a secreção total de CORT. Estudos sugerem que concentrações fisiológicas de estradiol atenuem a resposta de estresse, e o bloqueio da ação do E₂ em ratas com ciclo normal exacerbe essa resposta. É provável que o efeito do E₂ ocorra somente quando o eixo HPA está estimulado por algum estressor (YOUNG *et al.*, 2001).

Vários outros estudos mostram que o E₂ apresenta efeito estimulatório sobre o eixo HPA. As divergências entre os vários estudos em relação à ação do E₂ podem ser devido à diferença de doses utilizadas nos diferentes trabalhos como também, à forma de reposição (administração) durante longo ou curto período de tempo (BURGESS, HANDA, 1992; CAREY *et al.*, 1995; CHIHARA *et al.*, 1978; HANDA *et al.*, 1994; ISGOR *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2005; LESNIEWSKA *et al.*, 1990; SEALE *et al.*, 2004; VIAU, MEANEY, 1991; WALF, FRYE, 2005; YOUNG *et al.*, 2001).

É provável que o E_2 apresente ação sobre a modulação da resposta de estresse. Evidência disso é que fêmeas, em particular mulheres no período pós menopausa, apresentam uma incidência mais alta de depressão e de doenças relacionada ao estresse (KELLY *et al.* , 2005).

Poucos estudos avaliam o efeito da P_4 sobre o eixo HPA. Há evidências que a atividade do eixo HPA é positivamente regulada pelos ovários, e especificamente por E_2 que aumenta a secreção de ACTH e CORT após vários estressores, enquanto a progesterona previne ou reduz os efeitos facilitatórios do E_2 . A amplitude menor no ritmo de CORT observada no dia do estro poderia estar relacionada às concentrações mais altas de P_4 na fase final do proestro (DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.* , 2001; RHODES *et al.* , 2004). Essa diferença de efeitos de E_2 e P_4 é corroborada por nossos resultados.

5.3 - Ações dos antagonistas de E_2 e P_4 na secreção de P_4

Poucos estudos avaliam o efeito da P_4 sobre o eixo HPA. Nosso estudo mostrou que o tratamento com o antagonista de progesterona pode ter modificado a atividade basal do eixo HPA uma vez que a secreção de CORT também mostrou-se alterada pontualmente em dois dos horários analisados. A P_4 origina-se da adrenal e do ovário. Neste experimento, o tratamento com RU486 suprimiu a ação da P_4 originária de ambas as fontes. Em ratas ovariectomizadas somente a P_4 de origem ovariana é suprimida. Assim, mostramos que P_4 de origem adrenal não altera a atividade do eixo HPA em proestro.

Na tarde do proestro, os animais, apresentaram dois picos de secreção de P_4 , O primeiro às 14 horas e segundo entre 17 e 18 horas. O primeiro pico da secreção de P_4 (14h) coincide com o pico de secreção de corticosterona e deve ser de origem adrenal, pois, também ocorreu em ratas ovariectomizadas. O segundo pico de P_4 (no final da tarde) deve ser devido ao aumento de secreção ovariana, pois não ocorreu em ratas ovariectomizadas. Não houve diferença do primeiro pico de P_4 entre o grupo proestro e os outros grupos experimentais (tratados com veículo, tratados com antagonistas, ovariectomizados). No entanto, os grupos tratados com Tamoxifen (TAM e RUTAM) não apresentaram o segundo pico de P_4 (no final da tarde) assim como o grupo ovariectomizado. Isto indica que o tamoxifen deve ter causado um bloqueio da secreção de progesterona de origem ovariana e que o estrógeno interfere nessa secreção na tarde do proestro.

A secreção total de P_4 foi maior no grupo tratado com RU486 que nos grupos controle tratados com óleo e no grupo Tamoxifen; e maior no grupo tratado com RU486 e tamoxifen do que no grupo tratado somente com tamoxifen, indicando que no grupo RUTAM o efeito do tratamento foi devido ao RU486. Como o aumento da secreção de P_4 no grupo RU486 foi acompanhado, em dois dos horários analisados, por aumento da secreção de CORT, este efeito pode ser, pelo menos em parte, resultante de aumento da atividade do eixo HPA. O efeito do RU486 também pode ser devido: ao bloqueio da ação de retroalimentação negativa da P_4 sobre o eixo HPG, cuja atividade aumentada estimularia a secreção de progesterona, elevando sua concentração plasmática; ou a alguma ação periférica direta, que elevaria a secreção de P_4 .

No rato, a ação do RU 486 na produção de P_4 é controversa. Já foi mostrado que doses de RU486 que são efetivas para inibir a ovulação não alteram (SANCHEZ-CRIADO *et al.* , 1990; IWAMASA *et al.* , 1992), inibem (TANAKA *et al.* , 1991) ou estimulam a secreção de P_4 (VAN DER SCHOOT *et al.* , 1987; FORCELLEDO *et al.* , 1994; UILENBROEK, 1991; LE GOASCOGNE *et al.* , 1989)

Estudos *in vitro* mostraram uma ação estimulatória direta do RU 486 sobre a esteroidogênese ovariana, em células dispersadas da granulosa e lúteas de rata (MORGAN *et al.* , 1994; UILENBROEK *et al.* , 1992). O RU486 aumenta em cerca de quatro vezes a concentração de P_4 em células lúteas por inibir a atividade da 20α -hidroxiesteróide desidrogenase (UILENBROEK *et al.* , 1992) Contudo, outro trabalho mostrou ausência de RNAm para receptor de progesterona no corpo lúteo de rata indicando que a modulação da secreção de P_4 ovariana lútea pelo RU486 não deve ser um efeito ovariano direto (PARK-SARGE *et al.* , 1995). Este efeito estimulatório do RU486 sobre a secreção de P_4 pode ser mediado pela retirada da oposição exercida pela P_4 sobre a ação do E_2 , na hipófise, de aumentar a prolactina plasmática (VAN DER SCHOOT *et al.* , 1987; UILENBROEK, 1991). A hiperprolactinemia induzida por tratamento com RU486 resulta na persistência do corpo lúteo funcionalmente ativo (VAN DER SCHOOT *et al.* , 1990). É difícil distinguir entre um efeito ovariano direto do RU486 e um efeito hipotalâmico-hipofisário indireto (CURRY *et al.* , 1996).

5.4 - Receptores (GR/MR)

Outro parâmetro estudado neste trabalho foi a expressão dos receptores de glicocorticóides (GR) e mineralocorticóides (MR) em alguns sítios de retroalimentação do eixo HPA. Os dados sobre a

expressão de MR no hipotálamo são controversos. Dallman *et al.* (1987) dizem que a expressão de MR no hipotálamo é pouca ou inexistente e Swanson e Simmons (1989) mostraram que a expressão de RNAm para MR no PVN é cerca de 7 a 8 vezes menor que a expressão de GR. Contudo, Han *et al.* (2005) encontraram expressão de MR tanto no PVN parvocelular quanto no magnocelular. Neste trabalho não detectamos expressão de MR no PVNp por isso nos restringimos à análise da expressão de GR nesta região. O PVN é o sítio hipotalâmico de retroalimentação do eixo HPA e apresenta expressão elevada de GR, principalmente na região parvocelular, onde estão localizados neurônios CRH (DALLMAN *et al.*, 1987).

Nossos resultados mostraram expressão de GR e MR no CA₁ e no subículo do hipocampo ventral. O controle do eixo HPA é um microcosmo da função hipocampal, que envolve neurônios do CA₁ cujas aferências projetam-se para o subículo. É provável que a participação do hipocampo na regulação do estresse não seja homoganeamente distribuída ao longo de sua estrutura. As projeções topográficas do hipocampo ventral e dorsal são bastante distintas (HERMAN, MUELLER, 2006; SAPOLSKY *et al.*, 1991). Estudos de lesões de tratos de fibras hipocampais apóiam a hipótese de que as informações providas das células piramidais do CA₁ ventral e do subículo ventral do hipocampo constituem provavelmente, o principal mecanismo de regulação hipocampal sobre o tônus do eixo HPA (HERMAN *et al.*, 1992).

O subículo é o principal alvo das projeções do CA₁ e desempenha ação inibitória sobre o eixo HPA. No entanto, não há projeções diretas do subículo para neurônios efetores do PVN, indicando um mecanismo de ação transsináptico (HERMAN, MUELLER, 2006). O hipocampo restringe a atividade do eixo HPA indiretamente via estimulação de neurônios GABAérgicos localizados na região septal ventrolateral e no núcleo do leito da estria terminal (BNST), que se projetam para neurônios CRH, do PVN (HERMAN, CULLINAN, 1997). Além disso, o subículo também inerva várias estruturas límbicas prosencefálicas, tais como córtex pré-frontal, amígdala medial e septo lateral, que apresentam, projeções bi-sinápticas para o PVN. Assim, o subículo pode ter influência generalizada na integração límbica da resposta de estresse em diversos níveis e alterar a responsividade do eixo HPA (HERMAN, MUELLER, 2006).

Os receptores de corticosteróides são auto-regulados pelo aumento e diminuição da concentração de hormônio. Assim, a expressão dos receptores é aumentada pela adrenalectomia e reduzida pelo aumento da concentração de hormônio. A sensibilidade à retroalimentação pela

corticosterona aumenta ou diminui com a expressão respectivamente maior ou menor de receptores hipocampais (DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.*, 2001; JACOBSON, SAPOLSKY, 1991).

Nossos resultados mostraram que não houve diferença do número de neurônios com expressão de GR no PVN e de GR e MR no subículo e na região CA₁ do hipocampo ventral entre ratas controle em proestro, ovariectomizadas ou tratadas com antagonistas de estrógeno e/ou progesterona. Ainda não está esclarecido como os esteróides gonadais influenciam o eixo HPA e uma hipótese de atuação é sobre a retroalimentação do eixo HPA. Estrógenos e andrógenos revertem alterações de secreção de CORT após gonadectomia agindo em sítios hipotalâmicos ou supra-hipotalâmicos. O efeito do estrógeno sobre o eixo HPA está ausente em ratas adrenalectomizadas sugerindo que é dependente da retroalimentação do eixo HPA (SEALE *et al.*, 2004; WALF, FRYE, 2005).

Embora o hipocampo expresse receptores para E₂ há dúvidas se esse hormônio altera a expressão de GR e MR no hipocampo. Já foi mostrado que não ocorrem alterações da expressão de GR e MR após a ovariectomia ou reposição com estrógeno. Entretanto, a expressão de RNAm para GR no PVN de ratas ovariectomizadas é maior do que em ratas intactas ou ovariectomizadas com reposição de E₂. Assim, pode-se pensar na hipótese do E₂ alterar a retroalimentação pela CORT pela redução de RNAm para GR e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de GR funcionais envolvidos em tal processo (SEALE *et al.*, 2004). Outro estudo mostrou que os esteróides gonadais femininos atenuaram o aumento de RNAm de GR e MR resultante da remoção da retroalimentação adrenocortical endógena (PATCHEV, ALMEIDA, 1996). O aumento do conteúdo de RNAm para receptor de GR na hipófise é revertido por E₂. Os esteróides gonadais apresentam influência menor sobre a transcrição gênica dos MR, GR e CRH em condições basais; exercem efeitos semelhantes de glicocorticóides sobre a transcrição dos receptores de corticosteróides no hipocampo de animais privados de esteróides (ADX), e interagem com mecanismos mediados por glicocorticóides da regulação do eixo HPA através de mecanismos potencializadores ou atenuantes dependendo do sexo (PATCHEV, ALMEIDA, 1996; TURNER, 1992).

Apesar de não termos verificado ações do estrógeno e da progesterona sobre o número de neurônios que expressam GR e MR em sítios de retroalimentação do eixo HPA, não podemos descartar que esses hormônios alterem a atividade desses neurônios. Outros estudos seriam necessários, em continuidade, para verificar essa possibilidade.

Em conclusão, apesar de não haver diferença na secreção total de CORT entre os diferentes grupos e não ter sido observada variação no número de células que expressam GR e MR em sítios de retroalimentação, nossos resultados mostram através de ações pontuais dos antagonistas de E_2 e P_4 que estes hormônios podem apresentar ações antagônicas, respectivamente estimulatória e inibitória sobre a atividade do eixo HPA, corroborando com dados da literatura que mostram ação estimulatória do E_2 sobre o eixo HPA ao passo que a maioria dos trabalhos mostra ação inibitória ou ausência de influência da P_4 sobre este eixo.

6. Referências Bibliográficas

AHIMA, R. S. *et al.* Sexual dimorphism in regulation of type II corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Endocrinology*, v. 131, p. 1409-1416, 1992.

ALVES, S. E. *et al.* Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci*, v. 95, n. 6, p. 3281-6, 1998.

ARRIZA, J.L. *et al.* Neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron*, v. 1, p. 887-900, 1988.

ATKINSON, H. C. ; WADDELL, B. J. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology*, v. 138, n. 9, p. 3842-3848, 1997.

BAO, A. M. *et al.* Colocalization of corticotropin-releasing-hormone and oestrogen receptor-alpha in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in mood disorders. *Brain*, v. 128, p. 1301-13, 2005.

BAUM, M. J. Activational and organizational effects of estradiol on male behavioral neuroendocrine function. *Scand J Psychol*, v. 44, p. 213-220, 2003.

BETHEA, C. L. ; CENTENO, M. L. Ovarian steroid treatment decreases corticotropin-releasing-hormone (CRH) mRNA and protein in the hypothalamic paraventricular nucleus of ovariectomized monkeys. *Neuropsychopharmacology*, v.33, p. 546-556, 2008.

BOHLER, H. C. L. JR. *et al.* Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Mol. Brain Res.*, v. 8, p. 259-262, 1990.

BRADBURY, M. J. ; AKANA, S. F. ; DALLMAN, M. F. Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology*, v. 134, p. 1286-1296, 1994.

BURGESS, L. H. ; HANDA, R. J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated function in female rats. *Endocrinology*, v. 131, p. 1261-1269, 1992.

CAREY, M. P. *et al.* The influence of ovarian steroids on hypothalamic pituitary adrenal regulation in the female rat. *Journal of Endocrinology*, v. 144, p. 311-321, 1995.

CHIHARA, K. *et al.* Studies on the interaction of endorphins, substance P and endogenous somatostatin in growth hormone and prolactin release in rats. *Endocrinology*, v. 102, p. 281-288, 1978.

CHROUSOS, G. P. ; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 267, p. 1244-1252, 1992.

CRITCHLOW, V. *et al.* Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol*, v. 205, p. 807-815, 1963.

- CURRY; THOMAS; NOTHNICK; WARREN. Mifepristone and Ovarian Function. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 39, n. 2, p. 486-497, 1996.
- DALLMAN, M. F. ; *et al.* Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res*, v. 43, p. 113–173, 1987.
- DE KLOET, E. R. ; OITZL, M. S. ; JOELS, M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol*, v. 13, p. 433–455, 1993.
- DIORIO, D. ; VIAU, V. ; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 3839–3847, 1993.
- DONG, Y. *et al.* Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol*, v. 2, p. 1256-1264, 1988.
- DUNN, A. J. ; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.*, v. 15, p. 71-100, 1990.
- DUTRIEZ-CASTELOOT, I. *et al.* Hypothalamic–pituitary–adrenocortical and gonadal axis and sympathoadrenal activity of adult male rats prenatally exposed to morphine. *Neurosci. Lett.*, v. 263, p. 1–4, 1999.
- DUTRIEZ-CASTELOOT, I. *et al.* Activities of the pituitary–adrenal and gonadal axes during the estrous cycle in adult female rats prenatally exposed to morphine. *Brain Research*, v. 902, n. 1, p. 66-73, 2001.
- EDINGER, K. L. ; FRYE, C. A. Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, v. 30, p. 418-430, 2005.
- FERIN, M. ; VAN VUGT, D. A. ; WARDLAW, S. L. The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides. *Recent Prog. Horm. Res.*, v. 40, p. 441-485, 1984.
- FIGUEIREDO, H. F. *et al.* Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, n. 292, v. 4, p. 1173-82, 2006.
- FORCELLEDO, M. L. ; LEIVA, L. ; CROXATTO, H. B. Effects of RU 486 on the ovarian response of immature rats to pregnant mare's serum gonadotrophin or diethylstilbestrol. *Hum Reprod.* , v. 9, p. 24-31, 1994.
- FUNDER, J. W. ; SHEPPARD, K. Adrenocortical steroids and the brain. *Annu. Rev. Physiol.* , v. 49, p. 397-411, 1987.
- FUNDER, J. W. *et al.* Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor mediated. *Science*, v. 242, p. 583-585, 1988.
- GALA, R. R. ; WESTPHAL, U. Corticosteroid-binding globulin in the rat: studies on the sex difference. *Endocrinology*, v. 77, p. 841–851, 1965.

- GOMEZ-SANCHEZ; C. E. *et al.* Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*, v. 3, n. 147, p. 1343-1348, 2006.
- GUO, A. L. *et al.* Acute stress- or lipopolysaccharide-induced corticosterona secretion in female rats is independent os the oestrous cycle. *European Journal of Endocrinology*, v. 131, p. 535-539, 1994.
- HAN, F. *et al.* Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience Research*, v. 51, p. 371-381, 2005.
- HANDA, R. J. *et al.* Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav.* , v. 28, p. 464–476,1994.
- HARBUZ, M. S. ; LIGHTMAN, S. L. Stress and hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J. Endocrinol.* , v. 134, p. 327-339, 1992.
- HARMS, P. G. ; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol.* , v. 3, n. 36, p. 391-392, 1974.
- HARRIS, G. Neural control of pituitary gland. *Physiology Reviews*, v. 28, p. 139-179, 1948.
- HERMAN, J. P. *et al.* Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J. Neurosci.* , v. 9, p. 3072–3082, 1989a.
- HERMAN, J. P. *et al.* Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol Endocrinol.* , v. 3, p. 1886-1894, 1989b.
- HERMAN, J. P. *et al.* Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotrophin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Research*, v. 592, p. 228-238, 1992.
- HERMAN, J. P. ; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* , v. 20, p. 78-84, 1997.
- HERMAN, J. P. ; MUELLER, N. K. Role of ventral subiculum in stress integration. *Behavioural Brain Research.* , v. 174, p. 215-224, 2006.
- HRABOVSKY, E. ; *et al.* Expression of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, v. 139, n. 5, p. 2600-2604, 1998.
- HUANG, Q. *et al.* An estrogenic effect of 5 alpha-androstane-3beta, 17beta-diol on the behavioral response to stress and on CRH regulation. *Neuropharmacology*, v. 8, n. 54, p. 1233-8, 2008.
- ISGOR, C. *et al.* Estrogen receptor beta in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterona. *Neuroscience*, v. 4, n. 121, p. 837-45, 2003.
- IWAMASA, J. *et al.* The relationship between ovarian progesterone and proteolytic enzyme activity during ovulation in the gonadotropin-treated immature rat. *Biol Reprod.* , v. 46, p. 309-13, 1992.

JACOBSON, L. ; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.*, v. 12, p. 118–134, 1991.

JONES, B. C. *et al.* Contribution of Sex and Genetics to Neuroendocrine Adaptation to Stress in Mice. *Psychoneuroendocrinology*, v. 23, n. 5, p. 505-517, 1998.

KELLER-WOOD, M. ; SILBIGER, J. ; WOOD, C. E. Progesterone attenuates the inhibition of adrenocorticotropin responses by cortisol in nonpregnant ewes. *Endocrinology*, v. 1, n. 123, p. 647-51, 1988.

KELLY, M. J. ; QIU, J. ; RONNEKLEIV, O. K. Estrogen signaling in the hypothalamus. *Vitamines and Hormones*, v. 71, p. 123-145, 2005.

KITAY, J. I. Effects of oestradiol on pituitary–adrenal function in male and female rats. *Endocrinology*, v. 72, p. 947–954, 1963.

KOVÁCS, K. J. ; FÖLDES, A. ; SAWCHENKO, P. E. Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *The journal of neuroscience*, v. 10, n. 20, p. 3843-3852, 2000.

LAFLAME, N. *et al.* Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptor (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J. Neurobiol.* , v. 3, n. 36, p. 357-78, 1998.

LEGOASCOGNE, C. *et al.* Cell-specific variations and hormonal regulation of immunoreactive cytochrome P-450scc in the rat ovary. *J Reprod Fertil.* , v. 85, p.61-72, 1989.

LESNIEWSKA, B. *et al.* Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol-replaced rats. *Research in Experimental Medicine*, v. 190, p. 95–103, 1990.

LEVIN, E. R. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptor. *J Appl Physiol.* , v. 4, n. 91, p. 1860-7, 2001.

LI, R. ; SHEN, Y. Estrogen and brain: Synthesis, function and diseases. *Front Biosci*, v. 10, p. 257 – 267, 2005.

LUND, T. D. *et al.* Dihydrotestosterone may inhibit hypothalamo-pituitary-adrenal activity by acting through estrogen receptor in the male mouse. *Neurosci Lett*, v. 1, n. 365, p. 43-7, 2004.

MORGAN, A. *et al.* Antiprogestosterone (RU 486) effects on metalloproteinase inhibitor activity in human and rat granulosa cells. *Fert Steril.* , v. 61, p. 949-955, 1994.

NIYOMCHAI, T. *et al.* Progesterone inhibits behavioral responses and estrogen increases corticosterone levels after acute cocaine administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 80, n. 4, p. 603-610, 2005.

NOWAK, K. W. *et al.* Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci.* , v. 57, p. 833–837, 1995.

PARK-SARGE, O. K. *et al.* Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene? *Endocrinology*, v. 136, p. 1537-1543, 1995.

PATCHEV, V. K. ; ALMEIDA, O. F. X. Gonadal steroids exert facilitating and 'buffering' effects on glucocorticoid-mediated transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor genes in rat brain. *J Neurosci.* , v. 16, n. 21, p. 7077- 7084, 1996.

PAXINUS, G. ; WATSON, C. The rat brain. Third edition. Academic Press, 1997.

REDEI, E. *et al.* Fast glucocorticoid feedback inhibition of ACTH secretion in the ovariectomized rat: effect of chronic estrogen and progesterone. *Neuroendocrinol.* , v. 60, p. 113-123, 1994.

REUL, J. M. H. M. ; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain. Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, v. 117, p. 2505-2511, 1985.

RHODES, M. E. *et al.* Rat estrous cycle influences the sexual diergism of HPA axis stimulation by nicotine. *Brain Research Bulletin*, v. 64, p. 205-213, 2004.

RILEY, V. Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, v. 212, p. 1100–1109, 1981.

RISOLD, P. Y. ; THOMPSON, R. H. ; SWANSON, L. W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res. Brain Res. Rev.* , v. 24, p. 197–254, 1997.

RIVIER, C. ; VALE, W. Effect of the long-term administration of corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rat. *J. Clin. Invest.* , v. 75, p. 689-674, 1985.

RIVIER, C. Gender, Sex Steroids, Corticotropin-Releasing Factor, Nitric Oxide, and the HPA Response to Stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 64, n. 4, p. 739-751, 1999.

SANCHEZ-CRIADO, J. E. *et al.* A possible dual mechanism of the anovulatory action of antigrogestone RU 486 in the rat. *Biol Reprod.* , v. 42, p. 877-886, 1990.

SAPOLSKY, R. M. ; ZOLA-MORGAN, S. ; SQUIRE, L. R. Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *J. Neurosci.*, v. 11, p. 3695–3704, 1991.

SAWCHENKO, P. E. Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. *J Neurosci*, v. 7, p. 1093–1106, 1987.

SEALE, J. V. *et al.* Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol.* , v. 12, n. 16, p. 989-98, 2004.

SHAPIRO, R. A. ; XU, C. ; DORSA, D. M. Differential transcriptional regulation of rat vasopressin gene expression by estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology*, v. 11, n. 141, p. 4056-64, 2000.

SHIVERS, B. D. *et al.* Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature*, v. 304, p. 345-347, 1983.

SHUGRUE, P. J. ; LANE, M. V. ; MERCHENTHALER, I. Comparative distributions of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* , v. 1, n. 388, p. 507-25, 1997.

SPEERT, D. B. *et al.* Sexually dimorphic expression of corticotropin-releasing hormone-binding protein in the mouse pituitary. *Endocrinology*, v. 12, n. 143, p. 4730-41, 2002.

SPENCER, R. L. *et al.* Evidence for Mineralocorticoid Receptor Facilitation of Glucocorticoid Receptor-Dependent Regulation of Hypothalamic-Pituitary Adrenal Axis Activity. *Endocrinology*, v. 139, n. 6, p. 2718-2726, 1998.

SWANSON, L. W. ; SIMMONS, D. M. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol.* , v. 285, p. 413– 435, 1989.

SWANSON, L. W. *Brain Maps: Structure of the rat brain.* Amsterdam: Elsevier, 1992.

TANAKA, N. *et al.* Comparison of inhibitory actions of indomethacin and epostane on ovulation in rats. *Am J Physiol.* , v. 260, p. E170-E174, 1991.

TOUFEXIS, D. J. *et al.* Progesterone attenuates corticotropin-releasing-factor-enhanced but not fear-potentiated startle via the activity of its neuroactive metabolite, allopregnanolone. *The Journal of Neuroscience*, v. 45, n. 24, p. 10280-10287, 2004.

TURNER, B. B. Sex differences in the binding of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.* , v. 2, n. 581, p. 229-36, 1992.

UILENBROEK, J. T. J. Hormone concentrations and ovulatory response in rats treated with antiprogestagens. *J Endocrinology*, v. 129, p. 423-429, 1991.

UILENBROEK, J. T. J. ; WOUTERSEN, P. J. A. ; KARELS, B. Inhibition of induction of 20[alpha]-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat corpora lutea in vitro by the progesterone antagonist RU 486. *Life Sci.* , v. 50, p. 1173-1178, 1992.

VAMVAKOPOULOS, N. C. ; CHROUSOS, G. P. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression: potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/ inflammatory reaction. *J Clin Invest.* , v. 92, p.1896–1902,1993.

VAN EEKELLEN, J. A. M. *et al.* Immunocytochemical study on the intracellular localization of the type II glucocorticoid receptor in the rat brain. *Brain Research*, v. 436, p. 120–128, 1987.

VAN DER SCHOOT, P. ; BAKKER, G. H. ; KLIJN, J. G. Effects of the progesterone antagonist RU 486 on ovarian activity in the rat. *Endocrinology*, v. 121, p. 1375-82, 1987.

VAN DER SCHOOT, P. ; UILENBROEK, J. T. ; SLAPPENDEL, E. J. Effect of the progesterone antagonist mifepristone on the hypothalamo-hypophysial-ovarian axis in rats. *J Endocrinol.* , v. 124, n. 3, p. 425-32, 1990.

VASUDEVAN, N. ; KOW, L. M. ; PFAFF, D. Integration of steroid hormone initiated membrane actions to genomic functions in the brain. *Steroids*, v. 5-7, n. 70, p. 388-96, 2005.

VIAU, V. ; MEANEY, M. J. Basal and stress hypothalamic–pituitary–adrenal activity in cycling and ovariectomized-steroid treated rats. *Endocrinology*, v. 129, p. 2503–2511, 1991.

XIAO, E. *et al.* Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology*, v. 5, n. 135, p. 2093-8, 1994.

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

YOUNG, E. A. *et al.* Effects of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 6, n. 25, p. 881-91, 2001.

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](#)