



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia

**Alterações Endócrinas do Eixo
Hipotálamo-Hipófise-Gônadas em Ratas
Manipuladas no Período Neonatal**

Charlis Rainecki

Porto Alegre - RS
2002



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia

Alterações Endócrinas do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas em Ratas Manipuladas no Período Neonatal

*Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Fisiologia, da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas: Fisiologia.*

Charlis Rainecki

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre - RS
2002

"É mais freqüente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento: são os que conhecem pouco, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência."

Charles Darwin

“Aos meus pais”

Agradecimentos

A **DEUS**, primeiramente pelo dom da vida e por sempre me indicar a direção a qual devo seguir, a Ele os meus mais nobres e sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Aldo Bolten Lucion**, pela orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho, paciência e amizade a mim demonstrados, permitindo o meu ingresso no mundo científico.

Ao Prof. Dr. **Gilberto Luiz Sanvito**, pelo auxílio e contribuições durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dra. **Janete A. Anselmo-Franci** pelo interesse e sugestões que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Celso Rodrigues Franci**, pelo interesse e auxílio, fundamental na realização das dosagens hormonais.

À amiga incondicional **Sara Cristina Sagae** pelos anos de convivência sempre me apoiando nos momentos de dificuldade, pela amizade e companheirismo.

À **Cármem Marilei Gomes** pela amizade companheirismo e assistência em diversos momentos durante o experimento.

À **Gabriela Severino**, pelo auxílio no procedimento experimental e amizade.

Aos colegas de laboratório **Marcio Donadio, Márcia Breijeiron, Elisa Winkelmann, Erica Hermel, Isabel Fossati, Luciene Rodrigues, Anelise Todeschini, Fabrício Macagnan Clarice Sandi, Gabriela Pereira e Francine Pereira** que contribuíram com amizade e coleguismo nas mais diversas situações.

A todos os alunos de **Iniciação Científica** pela amizade, convivência e auxílio.

À **Ana Lucia Cecconello** primeiramente pela amizade, mais também pelos cafés da manhã que me levava no laboratório em épocas de experimento.

Aos professores membros da banca examinadora **Prof^a. Dr^a. Carla Dalmaz, Prof^a. Dr^a. Eloísa Loss, Prof^a. Dr^a. Maria Flavia e Prof. Dr. Edson Capp** pela atenção, interesse e sugestões.

À **Sônia A. Zanon, Ariana M. Fernandes e Cleyde Helena**, pela ajuda nas dosagens hormonais, sem as quais não seria possível a realização dessa dissertação.

Ao **Vanderlon, Diego e Mateus**, pelo cuidado com os animais.

Ao **Biotério Central da UFRGS**, pelo fornecimento dos animais.

Às secretárias da Pós-Graduação **Miriam, Uíra, Ana e Maria** sempre disponíveis para solucionando os problemas.

A **CAPES, FAPESP e FAPERGS**, órgãos que contribuíram com apoio financeiro.

À **Andréa Miura da Costa e Ligia Tchaicka** pela amizade e convivência.

A **Minha família**, que mesmo distante sempre estiveram presentes me incentivando nas dificuldades ou nos momentos em que pensei em desistir dessa longa caminhada.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Introdução.....	01
Respostas ao estresse.....	02
Período Hiporresponsivo ao Estresse.....	03
Estimulação Neonatal.....	04
Relação mãe-filhote.....	07
O Ciclo Estral da Rata.....	08
Estresse e Reprodução.....	11
Manipulação Neonatal e Reprodução.....	13
Justificativa.....	14
Objetivos.....	16
Material e Métodos.....	18
Animais.....	19
Estimulação Neonatal.....	19
Protocolo Experimental.....	20
Procedimentos Utilizados.....	21

Ciclo Estral.....	21
Ovariectomia.....	21
Reposição Hormonal.....	22
Canulação da Veia Jugular.....	22
Coletas de Sangue.....	22
Dosagem Hormonal.....	23
Contagem do Número de Óvulos.....	23
Análise Estatística.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	44
Relação Eixo HPA e HPG.....	45
Manipulação Neonatal, Esteróides Gonadais e Comportamento Sexual.....	45
Papel dos Esteróides Gonadais.....	46
Ovulação.....	49
Manipulação Neonatal e o Sistema Noradrenérgico Central.....	50
Conclusões.....	53
Referências Bibliográficas.....	55

Lista de Figuras

Figura 1. Concentrações plasmáticas (Média±EPM) de progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante e hormônio foliculo-estimulante obtidas em intervalo de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rata. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário calro-escuro (SMITH <i>et al.</i> , 1975).....	10
Figura 2. Modelo esquemático de manipulação neonatal.....	20
Figura 3. Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) durante o metaestro, diestro, proestro e estro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. Em cada uma das fases do ciclo estral as ratas tiveram sua veia jugular externa canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos, n = 12 a 15.....	28
Figura 4. Média das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o metaestro, n = 15 para os dois grupos (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	29
Figura 5. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o diestro, n = 15 para os dois grupos (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	30
Figura 6. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,001 quando se compara o grupo de ratas não manipuladas ao grupo manipulada (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	31
Figura 7. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o estro, n = 15 para os dois grupos (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	32
Figura 8. Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) durante o metaestro, diestro, proestro e estro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. Em cada uma das fases do ciclo estral as ratas tiveram sua veia jugular externa canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos, n = 10 a 15.....	33
Figura 9. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o metaestro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,05 quando se compara o grupo não manipulado ao manipulado (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	34
Figura 10. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o diestro, n = 15 para os dois grupos (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	35
Figura 11. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	36
Figura 12. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o estro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,01 quando se compara o grupo não manipulado ao manipulado (teste <i>t</i> de <i>Student</i>).....	37
Figura 13. Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) durante proestro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. As ratas tiveram sua veia jugular externa	

canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos, n = 10 a 15.....38

Figura 14. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,05 quando se compara o grupo não manipulado ao manipulado (teste *t* de *Student*).....39

Figura 15. Distribuição das ratas não manipuladas (n = 16) e manipuladas (n = 16) no período neonatal, de acordo com o número de óvulos no dia do estro (p<0,0001; Teste U de Mann-Whitney). Cada símbolo representa uma rata.....40

Figura 16. Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) de ratas manipuladas no período neonatal que quando adultas foram ovariectomizadas e repostas com estrodiol por 3 dias consecutivos, no quarto dia receberam progesterona, no dia da reposição de progesterona foi coletado sangue de 1 em 1 hora, iniciando-se às 13 horas. Para cada horário, nos dois grupos, n = 13 a 12.....42

Figura 17. Concentrações plasmáticas de FSH (ng/mL) de ratas manipuladas no período neonatal que quando adultas foram ovariectomizadas e repostas com estrodiol por 3 dias consecutivos, no quarto dia receberam progesterona, no dia da reposição de progesterona foi coletado sangue de 1 em 1 hora, iniciando-se às 13 horas. Para cada horário, nos dois grupos, n = 13 a 12.....43

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AVP – Arginina-Vasopressina

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

FSH – Hormônio folículo-estimulante

Gn – Gonadotrofinas

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPG – Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

LC – *Locus Coeruleus*

LH – Hormônio luteinizante

NA – Noradrenalina

OVX – Ovariectomizada

PRL - Prolactina

PVN – Núcleo paraventricular

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

SNC – Sistema Nervoso Central

Resumo

A manipulação no período neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para analisar os mecanismos pelos quais variações precoces no ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis na vida adulta. Nos ratos, a manipulação neonatal consiste do manuseio suave dos filhotes nos primeiros dias de vida em geral, durante as duas semanas após o parto. Quando adultos, os animais submetidos a essa manipulação apresentam uma menor secreção de glicocorticóides pela adrenal quando expostos a estímulos estressores, e um retorno mais rápido à concentração plasmática basal quando comparados aos ratos não manipulados. Trabalhos prévios demonstram que além de alterar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a manipulação pode alterar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, ratas manipuladas apresentam ciclos anovulatórios e uma diminuição do comportamento sexual.

Com isso, o nosso objetivo nesse trabalho foi analisar o perfil de secreção de estradiol e progesterona em ratas manipuladas no período neonatal nas quatro fases do ciclo estral, como também, verificar o efeito da manipulação sobre as concentrações plasmáticas de LH e FSH em ratas ovariectomizadas e com reposição hormonal.

No experimento I foram estudados dois grupos de ratas adultas: não manipuladas (fêmeas que nos 10 primeiros dias de vida não foram tocadas pelo experimentador ou tratador); e manipuladas (ratas que nos 10 primeiros dias pós-parto foram diariamente manipuladas pelo experimentador por 1 minuto, retornando para a mãe logo em seguida). Quando adultas, o ciclo estral das ratas foi controlado, e aquelas com 3 a 4 ciclos regulares seguidos tiveram a veia jugular externa canulada em cada uma das fases do ciclo estral (metaestro, diestro, estro e proestro). No dia seguinte ao da cirurgia às 8 horas da manhã, iniciaram-se as coletas de sangue (800 μ L) de 3 em 3 horas. O sangue foi centrifugado, o plasma coletado e destinado ao radioimunoensaio para estradiol e progesterona. As ratas cujo sangue foi coletado no proestro tiveram o número de óvulos contados na manhã seguinte.

No experimento II, as ratas manipuladas e não manipuladas foram ovariectomizadas e 3 semanas após receberam injeções subcutâneas de estradiol por 3 dias consecutivos às 9 horas da manhã, no quarto dia receberam progesterona às 10 horas e às 11 horas tiveram a veia jugular canulada. Neste mesmo dia às 13 horas, iniciaram-se as coletas de sangue (600 μ L) que foram realizadas de hora em hora, até às

18 horas. O sangue foi centrifugado o plasma coletado e destinado ao radioimunoensaio para LH e FSH.

Os resultados mostraram que as ratas manipuladas no período neonatal apresentam uma redução nas concentrações plasmáticas de estradiol no proestro e de progesterona no metaestro e no estro comparadas às não manipuladas. O número de óvulos encontrados na manhã do estro está reduzido nas ratas manipuladas quando comparado às não manipuladas, confirmando resultados prévios. A alteração destes esteróides gonadais pode explicar a redução do número de óvulos das fêmeas manipuladas. As concentrações plasmáticas de LH e de FSH não são diferentes entre os dois grupos, indicando que a responsividade do eixo hipotálamo-hipófise parece não ser alterada pela manipulação, no entanto é necessário realizar mais experimentos para que afirmações possam ser feitas a respeito da responsividade do eixo.

Introdução

Respostas ao Estresse

A manutenção de um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, pode ser constantemente ameaçada por uma variedade de distúrbios ou estímulos (internos ou externos). Nestas situações de ameaça ou perigo, os organismos desencadeiam uma série de respostas adaptativas, denominadas de sistemas de estresse, que consiste de um repertório bastante amplo de reações físicas e mentais que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes, tendendo a restabelecer o equilíbrio perdido (CHROUSOS & GOLD, 1992; LÓPEZ *et al.*, 1999).

Animais quando submetidos a estímulos estressantes apresentam uma rápida ativação de sistemas neuroendócrinos como resposta. Uma das reações que está bem estabelecida é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que tende a minimizar possíveis desvios do equilíbrio homeostático. Para isso, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que atuam ativando a hipófise anterior, promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (HANDA, 1994; FRANCIS *et al.*, 1996; HERMAN & CULLIMAN, 1997). No homem, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e no rato, a corticosterona.

Os glicocorticóides podem promover mudanças importantes no metabolismo, que se caracterizam por aumentar o catabolismo e reduzir os processos anabólicos, tendo como consequência uma maior disponibilização das reservas energéticas do animal para que este possa manter a homeostasia. A prolongada exposição ao estresse leva à exacerbação dos efeitos dos glicocorticóides provocando um crescente gasto metabólico que pode se tornar prejudicial e conduzir ao desenvolvimento de doenças, pois induz a imunossupressão (MEANEY, *et al.*, 1993). Por isso, existem mecanismos que tendem a limitar a resposta ao estresse.

O estresse induz, também, a ativação do sistema neurovegetativo simpático, que libera adrenalina e noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos e pela camada medular da adrenal, na corrente sanguínea onde vão atuar em conjunto com os glicocorticóides na lipólise, glicogenólise e catabolismo de proteínas. Sendo assim, as catecolaminas promovem várias alterações nas funções vegetativas contribuindo para que o organismo

possa restabelecer o equilíbrio, como prover substratos energéticos durante o estresse (KOPIN, 1995).

Além da descarga periférica de NA, o estresse induz a secreção deste neurotransmissor em todo o sistema nervoso, sendo que grande parte da NA central secretada em resposta ao estresse origina-se no *Locus coeruleos* (LC), onde ocorre uma diminuição no conteúdo de NA após o estresse, comprovando assim que este núcleo é extremamente sensível à maioria dos estímulos estressantes (MELIA & DUMAN, 1991; KONSTANDI *et al.*, 2000).

A ação da NA proveniente do LC na resposta ao estresse é reforçada por experimentos que comprovam que nessas situações ocorre um aumento da expressão da proteína *fos*, usada como marcador de atividade neuronal (CECCATELLI *et al.*, 1989; CULLINAN *et al.*, 1995), bem como por um aumento de tirosina hidroxilase (enzima limitante da produção de NA) no LC (MELIA & DUMAN, 1991).

Período Hiporresponsivo ao Estresse

A manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é essencial para sua normal maturação. Sendo assim, a administração de glicocorticóides em neonatos promove efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação de vários sistemas, inclusive o Sistema Nervoso Central (SNC) (LEVINE, 2001). Altas concentrações de glicocorticóides causam diminuição de mitose, mielinização e neuromorfogênese (BOHN, 1980), como também alterações neuroendócrinas quando adultos (ERKINE *et al.*, 1979). Com isto, é de grande importância que o animal mantenha o eixo HPA sob uma certa supressão durante o período neonatal, característica esta que é padrão no seu desenvolvimento, pois a corticosterona está elevada durante a fase final da gestação e nos dois primeiros dias após o nascimento, cai drasticamente e assim permanece até o 14º dia, como o CRH e ACTH que apresentam concentrações muito baixas durante todo este período (MARTIN *et al.*, 1977; WALKER *et al.*, 1986).

No rato adulto, a resposta ao estresse é caracterizada por um aumento da concentração plasmática dos hormônios clássicos do estresse como ACTH e corticosterona. Porém, durante as duas primeiras semanas de vida (do 2º ao 14º dia após o parto), esta resposta é diminuída, pois a hipófise e a glândula adrenal secretam pouco

ACTH e corticosterona respectivamente, que vão aumentando paulatinamente até a puberdade. Por esse motivo, este período é denominado “período hiporresponsivo ao estresse” (LEVINE, 1994; SAPLOSKY & MEANEY, 1986; WALKER *et al.*, 1986; WLAKER & VRANA, 1993).

O eixo HPA de ratos neonatos, de uma maneira peculiar é responsivo a estímulos aparentemente inofensivos, diferentemente de um animal adulto, pois alguns estímulos, como injeção de salina isotônica, entre outros, são capazes de promover uma certa ativação do eixo HPA aumentando a expressão de RNAm e RNA heteronuclear de CRH no PVN, como também a secreção de ACTH e corticosterona (DENT *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 1986).

Durante o período hiporresponsivo ao estresse, tanto estimulações aparentemente inofensivas, quanto estímulos estressores como frio e choque elétrico induzem a alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (LEVINE, 1994). Em ratos, um procedimento simples, como "manipular" os filhotes durante as duas primeiras semanas de vida, induz a estas alterações.

Estimulação Neonatal

Já há algumas décadas, a estimulação neonatal tem sido utilizada como um modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento dos sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroedócrinas estáveis (DENEMBERG, 1964; LEVINE, 1962).

Ratos manipulados no período neonatal apresentam uma atenuação no medo quando expostos a ambientes novos, ou seja, são mais ativos e defecam menos quando testados no campo aberto na vida adulta (FERNÁNDEZ-TERUEL *et al.*, 1991; LEVINE *et al.*, 1967). Semelhante ao rato, outros animais como o porco, também apresentam um período após o nascimento onde alterações ambientais podem resultar em permanentes modificações na função do eixo HPA e no comportamento (WEAVER *et al.*, 2000).

Sabe-se que os ratos manipulados na infância têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela adrenal quando expostos a estímulos estressores, ou seja, ratos manipulados apresentam uma menor secreção de

corticosterona que ratos não manipulados em situação de estresse. O retorno a concentrações plasmáticas basais deste hormônio ocorre com uma maior rapidez em ratos manipulados comparado aos não manipulados (HESS *et al.*, 1969; LEVINE *et al.*, 1993; MEANEY *et al.*, 1993).

Porém, não há diferença nas concentrações basais de corticosterona entre animais manipulados e não manipulados no período pós-natal. A diferença entre os dois grupos deve-se a uma sensibilidade diferencial do SNC ao mecanismo de retroalimentação negativa inibitório da supra-renal sobre o eixo HPA. Animais manipulados tem um aumento no número de receptores de glicocorticóides no hipocampo, o que não foi observado no hipotálamo, hipófise e nem na amígdala (LEVINE, 1994; MEANEY *et al.*, 1993; SAPOLSKY, 1994).

Postula-se que este aumento de receptores de glicocorticóides no hipocampo seria a causa das diferenças entre animais estimulados e não estimulados neonatalmente quando submetidos a estímulos estressantes (MEANEY *et al.*, 1993; SAPOLSKY, 1994). Para MEANEY & AITKEN (1985) esta maior concentração de receptores glicocorticóides, verificada no hipocampo de ratos adultos que sofreram manipulação neonatal, pode ser o resultado de um aumento no número de neurônios hipocampais, o que confirmaria a influência deste modelo na neurogênese do hipocampo.

Existem estudos que demonstram o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios encontrados em diferentes áreas do SNC de ratos. Na amígdala medial, a manipulação, promove uma diminuição no número de neurônios aos 11 e 90 dias de idade como também nos neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal aos 11 dias de idade em ratos machos e fêmeas (LUCION *et al.*, 1999). PEREIRA (2000) ao estudar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios imunorreativos a somatostatina no núcleo periventricular do hipotálamo de ratos machos de 11 dias de idade observou uma diminuição no número de neurônios somatostatinérgicos nesse núcleo. No entanto não se observou diferença na imunorreatividade a tirosina hidroxilase no núcleo arqueado, núcleo periventricular e PVN em ratos machos adultos manipulados no período neonatal (HERMEL *et al.*, 2001), nem no número de corticotrofos na hipófise anterior em ratos aos 11 dias de vida (AGUIAR *et al.*, 1997), indicando que a manipulação neonatal não afeta da mesma forma as estruturas do SNC.

A separação maternal, ou seja, retirar a mãe do convívio com os filhotes por um período de tempo, também promove alterações comportamentais e neuroendócrinas no

indivíduo. Animais separados da mãe por 4,5 horas, diariamente, nas três primeiras semanas de vida apresentam uma redução das concentrações plasmática de corticosterona em resposta a estresse por contenção em ratos pós-adolescência, resposta esta que não é acompanhada por aumento dos receptores de glicocorticóides no hipocampo (OGAWA *et al.*, 1994). Porém uma separação maternal por 24 horas aos 11 dias de vida reduziu a concentração dos receptores de glicocorticóides no PVN aos 20 dias de vida, esta redução não foi observada se durante a separação maternal os filhotes recebessem alimentação e fossem estimulados na área anogenital (VAN OERS *et al.*, 1999).

Separação maternal de 180 minutos realizada diariamente do 3º ao 12º dia de vida promove aumento na ansiedade tanto em machos quanto em fêmeas, o que pode ser evidenciado por uma diminuição no número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado, e pela redução no tempo gasto neste braço, essas respostas foram mais evidentes em machos (WIGGER & NEUMANN, 1999). Outro teste que demonstra este aumento na ansiedade é o campo aberto, onde o grupo separado caminha menos quando comparado ao controle (OGAWA *et al.*, 1994).

PLOTSKY & MEANEY (1993) observaram que animais que foram separados da mãe por 180 minutos nas duas primeiras semanas de vida apresentam um aumento na concentração de RNAm para CRH, assim como o conteúdo de CRH na eminência média quando comparados com animais que foram manipulados por 15 minutos. Animais separados da mãe 180 minutos por dia apresentam uma maior secreção de ACTH e noradrenalina em resposta a estresse por contenção que animais controles, no entanto, não se observou diferença nas concentrações basais nestes dois hormônios (LIU *et al.*, 2000a). Já uma separação maternal por 5 horas aumentou a concentração plasmática de corticosterona tanto basal quanto em resposta a estresse por novidade (BIAGINI *et al.*, 1998) Este conjunto de resultados indica que o ambiente neonatal que o animal se encontra pode determinar a responsividade do seu eixo HPA ao estresse por toda a vida.

Relação mãe-filhote

Para muitas espécies, a mãe representa fonte de alimentação, calor, proteção e educação, essenciais para o desenvolvimento de habilidades sociais normais. Algumas

espécies como o furão e o coelho, permanecem sozinhos a maior parte do dia; o furão recebe apenas uma, porém longa refeição; o coelho recebe cuidados maternos de 3 a 10 minutos por dia. Outros, como os ratos, requerem alimentação contínua durante os primeiros dias de vida, porém gradualmente os períodos de ausência maternal vão se tornando mais longos até a maturidade. De maneira similar, bebês de primatas não humanos permanecem grudados a suas mães a maior parte do dia durante os primeiros dias ou meses de vida, igualmente aos ratos, com o passar do tempo eles vão realizando mais atividades em separado, até se tornarem independentes das suas mães (DENENBERG, 1999; KUHN & SCHANBERG, 1998).

Alterações ou interferências nesta relação mãe-filhote no período neonatal, como a manipulação ou a separação maternal, podem provocar um distúrbio nesta relação, modificando assim o comportamento da mãe em relação a sua prole. Em geral, as mães de filhotes manipulados despedem mais tempo no cuidado da prole, sendo que, um dos comportamentos que se alteram é o de lambe os filhotes, as mães de filhotes manipulados lambem mais a prole do que as mães de filhotes não manipulados. Sabe-se que este comportamento da mãe em relação ao filhote pode alterar o desenvolvimento do SNC (MEANEY *et al.*, 1993; FRANCIS *et al.*, 1994; LEVINE *et al.*, 1994; LEVINE, 2001). Portanto, postula-se que seria a alteração nesta relação mãe-filhote a responsável pelo padrão comportamental e neuroendócrino observado em ratos manipulados no período pós-natal.

LIU *et al.* (1997) mostraram que os filhotes de mães que despendem mais tempo com os filhotes, lambendo-os mais, quando adultos apresentam um aumento da concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma menor secreção de ACTH e corticosterona em resposta a estresse, similar aos animais que foram manipulados no período neonatal.

A primeira semana de vida do rato é um período de intensa sinaptogênese hipocampal, analisando a sinaptofisina e a molécula de adesão à célula neural, dois marcadores da sinaptogênese, em animais que tiveram baixos e altos cuidados maternos observou-se que, tanto aos 18 quanto aos 90 dias de vida os animais com baixo cuidado maternal apresentaram uma significativa redução nestas moléculas, sugerindo que os animais cujas mães que tem um alto cuidado com a sua prole apresentam um aumento na taxa de sinaptogênese ou aumento na sobrevivência das sinapses. Sendo assim, a

variação no cuidado maternal pode ser considerado o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes (LIU *et al.*, 2000b).

O Ciclo Estral da Rata

Grande parte do conhecimento que possuímos, até o presente, sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos, cuja ovulação é espontânea, é baseado em estudos sobre o ciclo estral das ratas (FREEMAN, 1994). Esse ciclo é composto por quatro fases, que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período (MATTHEWS & KENYON, 1984), exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas (Gn) que estão associadas a alterações comportamentais. Por exemplo, o estro é o período no qual a fêmea apresenta o *desejo sexual*, ou seja, ela está pronta para o coito. Esta fase dura de 25 a 27 horas, e é durante este período, mais precisamente, durante a manhã do estro que ocorre a ovulação. Os períodos entre os estros são denominados proestro, metaestro e diestro. O proestro dura de 12 a 14 horas e precede o estro. Se não há concepção, após o estro existe um período de recuperação denominado de metaestro cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro que dura de 55 a 57 horas onde se reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (FREEMAN, 1994).

A ovulação requer picos de Gn e prolactina (PRL) no período pré-ovulatório. A variação das concentrações dos esteróides gonadais funciona como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório. O estradiol (um dos esteróides gonadais) apresenta uma baixa concentração plasmática entre o estro e a manhã do metaestro, e começa a aumentar na tarde desta fase, alcançando valores mais altos ao redor do meio dia do proestro, caindo no fim da tarde até atingir os valores basais no início da madrugada do estro. Enquanto que a concentração plasmática de progesterona (outro esteróide gonadal) começa a aumentar quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), atinge o pico juntamente com ele e retorna a valores basais na manhã do estro. Um segundo pico de progesterona inicia ao meio dia do metaestro, mantendo-se na madrugada do diestro e caindo para valores basais no início da manhã (figura 1) (BUTCHER *et al.*, 1974; SMITH *et al.*, 1975; FREEMAN, 1994).

Os padrões de secreção de PRL, LH e hormônio folículo-estimulante (FSH) são similares durante a maior parte do ciclo estral. As suas concentrações permanecem baixas e não mudam até à tarde e início da noite do proestro. A PRL inicia um aumento no fim da manhã do proestro e alcança valores elevados no fim da tarde da mesma fase e retorna a valores basais no início da manhã do estro. O pico do LH é similar ao da PRL, no entanto, o primeiro aumento do LH é observado na metade da tarde do proestro, chegando a valores de pico logo em seguida, no fim da tarde da mesma fase. O FSH apresenta um aumento inicial na sua secreção juntamente com o LH, com retorno as concentrações basais na metade da manhã do estro (figura 1) (BUTCHER *et al.*, 1974; SMITH *et al.*, 1975; FREEMAN, 1994).

Sendo assim, o aumento de estrógeno no diestro induz a um aumento na secreção de Gn na tarde do proestro, ou seja, a ovulação depende do mecanismo de retroalimentação positivo que os esteróides gonadais exercem sobre o eixo hipotálamo-hipófise (FREEMAN, 1994).

Este mecanismo de retroalimentação positivo do estrógeno pode ser demonstrado pelos picos diários de LH e PRL que ocorrem em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com estradiol (NEILL, 1972). Porém ratas OVX tratadas com estradiol e progesterona têm a descarga de LH adiantada e amplificada (KALRA & KALRA, 1983).

O mecanismo pelo qual o estrógeno estimula a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ainda não está claro. Dados indicam que o sistema noradrenérgico pode ser o principal mediador do mecanismo de retroalimentação positivo dos esteróides gonadais, não tendo, o estrógeno, ação direta sobre os neurônios GnRH secretores (JENNES *et al.*, 1992). Alguns autores demonstram, por estudos imunocitoquímicos, que o estradiol e receptores para estrógeno não estão colocalizados nos neurônios GnRH (HERBINSON *et al.*, 1995; SHIVERS *et al.*, 1983).

Corroborando esta hipótese, HERITAGE *et al.* (1980) encontraram esteróides gonadais nos neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral, inclusive LC. Nestes neurônios também foi detectada a presença de RNAm para receptores de estrógeno (SHUGRUE, *et al.*, 1997).

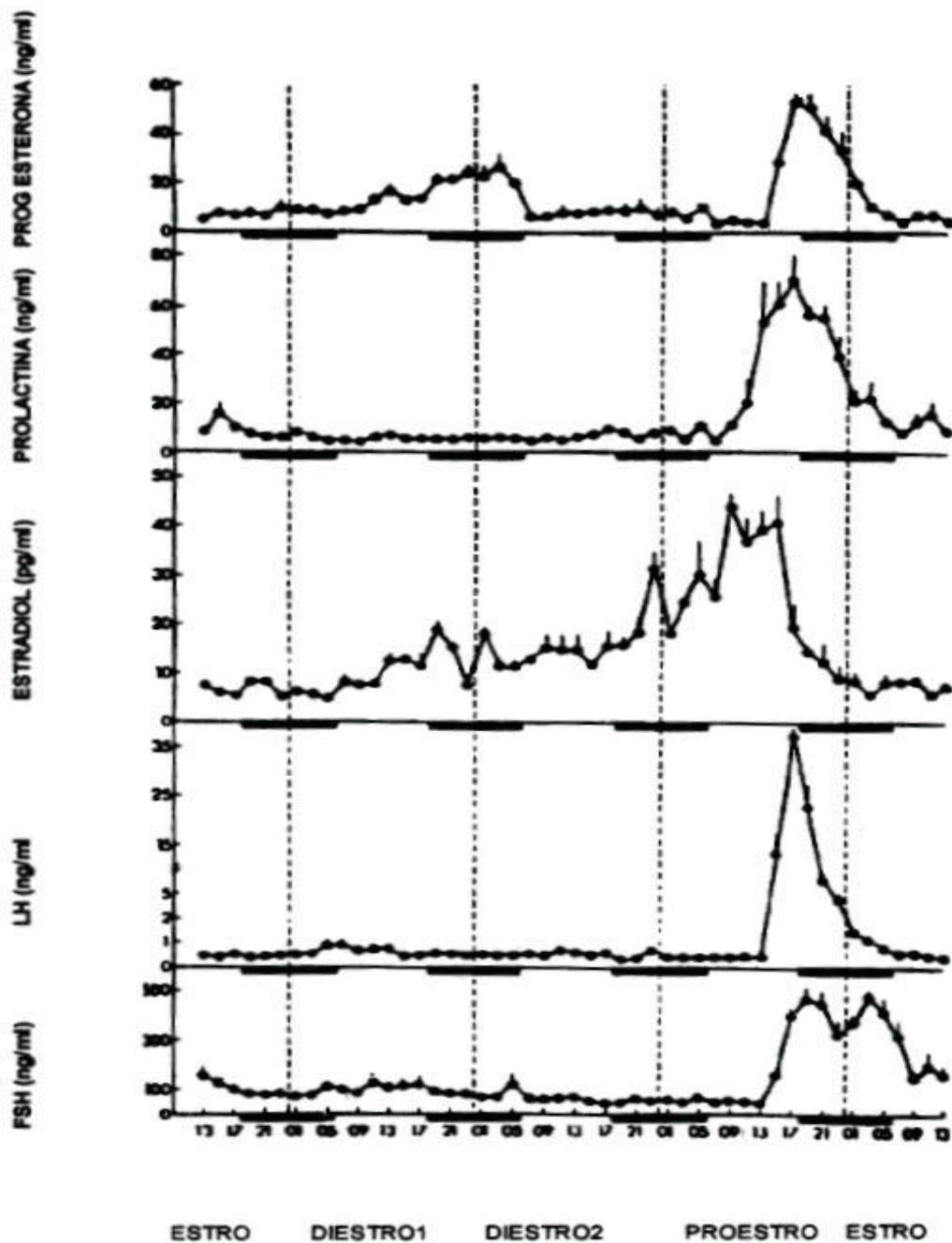


Figura 1. Concentrações plasmáticas (Média±EPM) de progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante e hormônio foliculo-estimulante obtidas em intervalo de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rato. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (SMITH *et al.*, 1975).

O mecanismo pelo qual o estrógeno estimula a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ainda não está claro. Dados indicam que o sistema noradrenérgico pode ser o principal mediador do mecanismo de retroalimentação positivo dos esteróides gonadais, não tendo, o estrógeno, ação direta sobre os neurônios GnRH secretores (JENNES *et al.*, 1992). Alguns autores demonstram, por estudos imunocitoquímicos, que o estradiol e receptores para estrógeno não estão colocalizados nos neurônios GnRH (HERBINSON *et al.*, 1995; SHIVERS *et al.*, 1983).

Corroborando esta hipótese, HERITAGE *et al.* (1980) encontraram esteróides gonadais nos neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral, inclusive LC. Nestes neurônios também foi detectada a presença de RNAm para receptores de estrógeno (SHUGRUE, *et al.*, 1997).

Porém HRABOVSKY *et al.* (2000) detectaram a expressão de RNAm do receptor β de estrógeno em neurônios GnRH secretores, como também a ligação de ^{125}I -estrógeno nestes neurônios, o que não exclui ou diminui a importância do sistema noradrenérgico na estimulação da secreção de GnRH, pois lesão eletrolítica no LC na manhã do proestro, em ratas ciclando regularmente, diminui o conteúdo de NA na área pré-óptica medial e hipotálamo médio basal e bloqueia a onda pré-ovulatória de Gn e com isso a ovulação (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997). Estes dados quando juntos contribuem para confirmar a hipótese da ação indireta do estrógeno na indução da liberação de GnRH e conseqüente ovulação.

Estresse e Reprodução

Em regra, as respostas neuroendócrinas do eixo HPA ao estresse tem um papel de inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gonada (HPG), tanto o CRH quanto a AVP inibem o GnRH e Gn em resposta ao estresse, portanto a função reprodutiva (FERIN, 1999). TOHEI *et al.* (1997) observaram que ratas expostas a vapores de éter apresentam um aumento na secreção de ACTH e corticosterona, no entanto ocorre uma diminuição na concentração de LH e FSH. E a administração de CRH resulta em uma diminuição da secreção de GnRH e LH (PETRAGLIA *et al.*, 1987).

Esta ação dos neurônios CRH em inibir o eixo gonadal se dá por inervação direta ou indireta, o CRH e a AVP podem agir diretamente sobre os neurônios GnRH inibindo-os, ou agir sobre neurônios proopiomelanocorticonérgicos (POMC) no núcleo

arqueado promovendo sua liberação e consecutiva inibição dos neurônios GnRH e dos neurônios noradrenérgicos do LC, pois estes excitam os neurônios GnRH; toda esta ação resulta em uma supressão da secreção de GnRH, e conseqüente inibição da onda pré-ovulatória de Gn, e ovulação (CHROUSOS *et al.*, 1998; RIVEST & RIVIER, 1995).

Sinais centrais e periféricos modulam a atividade dos neurônios GnRH. Alguns desses sinais são estimulatórios para a sua liberação como a NA e o neuropeptídeo Y; e alguns são inibitórios, como a beta-endorfina e a interleucina-1. Portanto, os eixos HPA e HPG são modulados e/ou controlados por aferentes noradrenérgicos, a ativação dos núcleos noradrenérgicos A1, A2 e LC tem estado relacionado ao estradiol e com a secreção de GnRH (ANSELMO-FRANCI & OLIVEIRA, 1996; JENNES, *et al.*, 1992); o LC faz projeções para a área pré-óptica e para o núcleo supraquiasmático, que estão envolvidos na regulação da secreção cíclica de hormônios da hipófise anterior (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; JONES & MOORE, 1977).

Em mulheres normais a prevalência de amenorréia é de aproximadamente 2%, porém esta taxa sobe para 100% quando estas mulheres são submetidas a estresse crônico, como por exemplo, em prisioneiras antes da execução (CHROUSOS *et al.*, 1998).

Fêmeas em geral apresentam uma maior liberação de ACTH em resposta a um estímulo estressor quando comparadas a machos (HANDA *et al.*, 1994). A resposta ao estresse em mulheres com as concentrações de estradiol alta e progesterona baixa é alterada, tornado-as mais sensíveis aos estímulos estressantes (TSEN *at al.*, 2001). Ratas quando em proestro, fase em que o estradiol e a progesterona estão altas, apresentam uma maior liberação de ACTH e corticosterona em resposta a estresse por imobilização, quando comparadas com ratas em diestro; ratas ovariectomizadas repostas apenas com estradiol apresentam também uma maior resposta ao estresse quando comparadas as ratas repostas com estradiol e progesterona (VIAU & MEANEY, 1991).

ROY *at al.* (1999) estudando macacas ovariectomizadas e repostas com estradiol e progesterona ou apenas com estradiol observaram que o RNAm para CRH no PVN está aumentado em macacas com reposição de estradiol apenas, sendo assim, o estradiol poderia estimular o gene do CRH promovendo sua transcrição e síntese, com o aumento da liberação de CRH; e a progesterona estaria exercendo uma ação antagônica a do

estradiol, o que não permite o aumento da expressão do RNAm para o CRH em macacas repostas com estradiol e progesterona.

Manipulação Neonatal e Reprodução

Trabalhos prévios mostraram que estímulos estressantes durante o período de diferenciação do SNC (pré-natal e logo após o nascimento) induzem a alterações estáveis que se manifestam de modo a diminuir o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas (FRANTZ *et al.*, 1998; LUCION *et al.*, 1997; WARD, 1972). O estresse na vida adulta do animal também tem como efeito uma diminuição da capacidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas (CHROUROS *et al.*, 1998).

Uma outra característica de ratas manipuladas é que a abertura vaginal ocorre mais tarde do que a de ratas não manipuladas, o que indicaria que a manipulação estaria retardando a instalação da puberdade (GOMES, 2001; SIECK & RAMALEY, 1975).

Ratas adultas, quando submetidas a estresse crônico, permanecem constantemente em diestro, porém ratas que foram manipuladas ou sofreram estresse crônico no período neonatal tem uma atenuação nesta indução do constante diestro (GONZÁLEZ *et al.*, 1994).

A manipulação neonatal ou a separação maternal não alteram a ritimicidade do ciclo estral, porém, ratas manipuladas quando em estro tem uma drástica redução do número de ovócitos, consecutivamente a manipulação neonatal reduz a capacidade reprodutiva das fêmeas por bloquear a ovulação (GOMES *et al.*, 1999; RHEES *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que a estimulação no período pós-natal não altera somente o eixo HPA, mas também altera o eixo HPG.

Justificativa

Como em ratas manipuladas o ciclo estral é anovulatório, provavelmente a manipulação neonatal está promovendo alguma alteração em um ou em alguns dos eventos necessários para que ocorra a ovulação. Sabendo-se da importância da variação das concentrações plasmáticas dos esteróides gonadais (estrógeno e progesterona) na indução da ovulação, e da secreção de LH e FSH; julgou-se pertinente desvendar se existe alteração nestas concentrações hormonais nas ratas manipuladas no período neonatal em relação às suas controles (não manipuladas), e se estas alterações podem ser o motivo dos ciclos anovulatórios.

Objetivos

Objetivo Geral

Analisar as concentrações plasmáticas de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas em ratas ciclando e ovariectomizadas com reposição hormonal que foram manipuladas no período neonatal.

Objetivos Específicos

- Verificar as concentrações plasmáticas basais de estradiol e progesterona nas quatro fases do ciclo estral em ratas que foram manipuladas no período neonatal. Descrever o perfil destes 2 hormônios das ratas durante o ciclo estral e comparar a área das concentrações entre as ratas manipuladas e não manipuladas.

- Avaliar o efeito da manipulação no período neonatal sobre as concentrações plasmáticas de LH e FSH em ratas ovariectomizadas com reposição hormonal.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas ratas tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes; aos 21 dias de vida os animais foram desmamados e as fêmeas foram mantidas em caixas, com no máximo 5 ratas cada até a idade adulta. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 18 horas e com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida constante em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Estimulação Neonatal

Não-manipulados (controle): animais que não sofreram qualquer tipo de manipulação até o dia 10 após o nascimento. Depois disso, as caixas eram limpas conforme a rotina do biotério.

Manipulados: animais que foram brevemente manipulados durante 1 minuto por dia, durante os 10 primeiros dias de vida. A manipulação consistiu em levar a ninhada para uma sala anexa ao biotério, com mesmo fotoperíodo e temperatura, separar os filhotes da mãe, que foi mantida em uma caixa ao lado, e manipulá-los utilizando-se luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho, gentilmente. Após essa manipulação todos os filhotes foram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe. Os procedimentos de manipulação iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes (Dia 1).

A figura 2 mostra de forma esquemática o procedimento de estimulação neonatal utilizado nesse experimento.

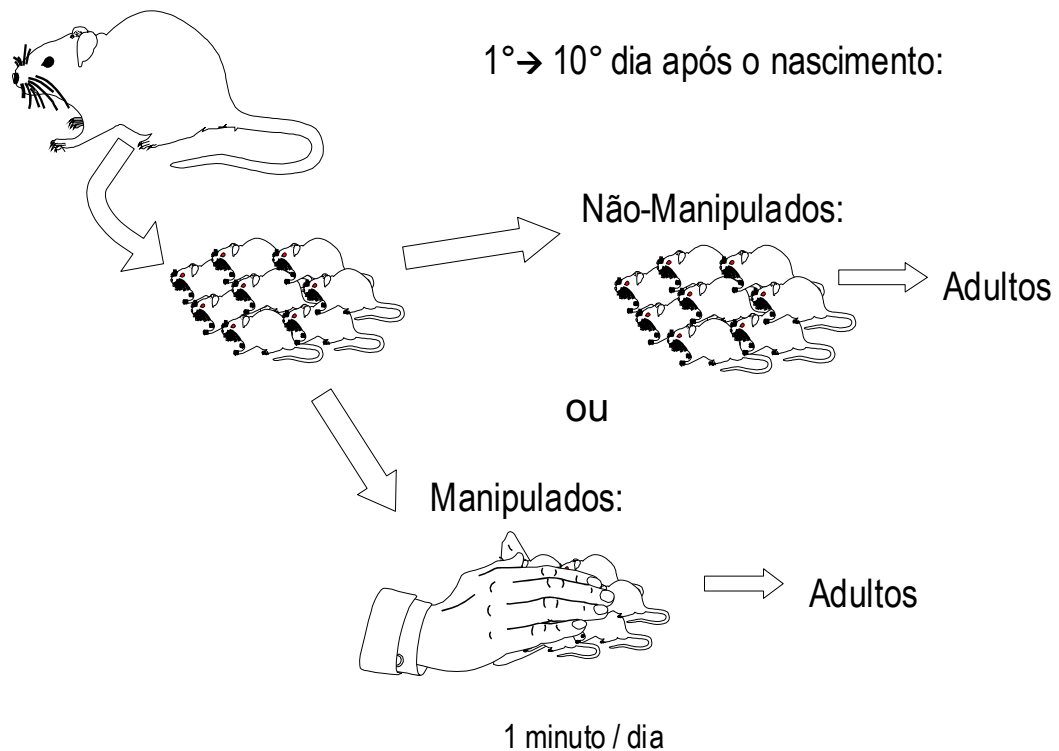


Figura 2. Modelo esquemático de manipulação neonatal.

Protocolo Experimental

Experimento I

Ratas manipuladas e não manipuladas com 3 a 4 ciclos estrais regulares seguidos tiveram a veia jugular externa canulada em cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro). Amostras de 800µL de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas de 3 em 3 horas no metaestro, diestro, estro e proestro, todas iniciando-se às 8 horas da manhã (horário de coletas: 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 2:00, 5:00 horas), perfazendo um total de 8 coletas em cada fase do ciclo estral. O sangue foi centrifugado e estocado para posterior dosagem de estradiol e progesterona por radioimunoensaio. As ratas cuja coleta foi realizada no proestro tiveram o número de óvulos contados na manhã do estro, ou seja, no dia seguinte.

Experimento II

Aos 65 dias de vida as ratas manipuladas e não manipuladas foram ovariectomizadas, 3 semanas após sofrerem reposição hormonal. No dia da injeção de progesterona (ultimo dia da reposição) tiveram a veia jugular externa canulada às 11 horas da manhã. Amostras de 600 µL de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas de hora em hora, iniciando as 13:00 horas do mesmo dia (horário das coletas: 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00 e 18:00 horas), perfazendo um total de 6 coletas. O sangue foi centrifugado e estocado para posterior dosagem de LH e FSH por radioimunoensaio.

Procedimentos Utilizados

Ciclo Estral

A partir de 70 dias de idade, o ciclo estral foi verificado através de esfregaço vaginal, que foi colhido diariamente ao redor das 9 horas da manhã, segundo técnica de LONG & EVANS (1922), e analisado a fresco em microscópio. Utilizaram-se no experimento somente ratas com 3 a 4 ciclos estrais regulares seguidos.

Ovariectomia

Com 65 dias de vida as ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de Xilasina (Ronpum) e Cloridrato de Ketamina (Francotar), ambas na dose de 100 mL/Kg de peso corporal, para a realização da ovariectomia através de incisões laterais de cerca de 1cm, por meio das quais os ovários e as porções superiores uterinas foram expostos. Após ligadura entre essas duas estruturas, os ovários foram retirados. As ratas foram colocadas em caixas coletivas até o dia do experimento, que foi realizado 3 semanas após a castração.

Reposição Hormonal

As ratas ovariectomizadas foram tratadas com injeções subcutâneas de benzoato de estradiol (Benzo-ginestril ap®, SARSA), na dose de 5µg/0,2mL/rata às 9 horas da manhã, por três dias consecutivos, no dia do experimento as ratas receberam injeção subcutânea de progesterona (Progesterone, Sigma), na dose de 25mg/0,2mL/rata às 10 horas.

Canulação da Veia Jugular

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução de tribromoetanol (Aldrich Chem. Comp. Inc.) 2,5% em salina. A dose utilizada foi de 1 mL/100g de peso corporal.

Após a anestesia uma cânula de silicone foi introduzida na veia jugular externa, com o auxílio de uma agulha de implantação, a cânula foi suturada no músculo peitoral maior e a parte livre da cânula foi externalizada no pescoço, um pouco abaixo das orelhas, conforme técnica descrita por HARMS & OJEDA (1974). A cânula foi mantida cheia de solução fisiológica até o momento da coleta de sangue.

Coletas de Sangue

Todas as amostras de sangue foram coletadas em animais acordados numa sala silenciosa e com temperatura de 22±2°C. Amostras de 800µL ou 600µL de sangue foram coletados em seringas plásticas heparinizadas, conforme o experimento. Após a remoção de cada amostra sangüínea um volume igual de NaCl 0,9% estéril foi repostado. As amostras foram colocadas em tubos plásticos e centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos, o plasma foi separado e estocado a -70°C para posterior dosagem hormonal.

Dosagem Hormonal

As concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona foram determinadas por radioimunoensaio utilizando-se *kits* MAIA® da BioChem ImmunoSystems (Bologna, Itália). O limite mínimo para detecção do estradiol é de 7,5 pg/mL, e para

progesterona 0,075 ng/mL. Para as dosagens LH e FSH foram utilizados *kits* específicos fornecidos pela National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore - USA) e o anticorpo para precipitação foi produzido pelo laboratório do Prof. Dr. Celso R. Franci (FMRP - USP) o limite mínimo para a detecção do LH é de 0,04 ng/mL, e para o FSH 0,39 ng/mL.

Contagem do Número de Óvulos

Às 9 horas da manhã do estro, as ratas foram mortas por decapitação, tiveram os ovários removidos, os ovidutos dissecados e colocados entre duas lâminas em um sistema que permite a compressão dos mesmos. A contagem dos óvulos de ambos ovidutos foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (ZEISS).

Análise Estatística

Experimento I

A comparação entre as médias das áreas abaixo da curva das concentrações de estradiol e progesterona em cada uma das quatro fases do ciclo estral dos dois grupos experimentais estudados, foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student*. Os resultados são expressos pela média \pm EPM, e o nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

Para comparação do número de óvulos dos dois grupos experimentais foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, e o nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

Experimento II

Os resultados referentes à concentração plasmática de LH e FSH das ratas castradas e com reposição hormonal dos dois grupos experimentais foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls. Os resultados são expressos pela média \pm EPM, e o nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

Resultados

Experimento I

Estradiol

A figura 3 apresenta as concentrações plasmáticas de estradiol nas quatro fases do ciclo estral em um intervalo de 3 em 3 horas, em ratas manipuladas e não manipuladas.

A figura 6 mostra que no proestro a área abaixo da curva do grupo de ratas manipuladas é menor do que a do grupo de ratas não manipuladas.

No entanto, no metaestro, diestro e estro não houve diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de estradiol das ratas manipuladas com relação às não manipuladas quando se analisa a área abaixo da curva, como pode ser observado nas figuras 4,5 e 7.

Observa-se ainda na figura 3, que no proestro o horário de maior concentração plasmática de estradiol nas ratas manipuladas ocorre às 14 horas, e nas não manipuladas às 17 horas, ou seja, além de uma menor concentração de estradiol durante todo o proestro, os animais manipulados apresentam o mesmo padrão de secreção porém este é adiantado.

Progesterona

A figura 8 apresenta a concentração plasmática de progesterona nas quatro fases do ciclo estral em um intervalo de 3 em 3 horas, em ratas manipuladas e não manipuladas.

Neste experimento, no proestro obteve-se um resultado diferente do esperado tanto no grupo de ratas não manipuladas (controle) como no grupo de ratas manipuladas. Trabalhos prévios mostram que nesta fase a progesterona apresenta um pico (BUTCHER *et al.*, 1974; SMITH *et al.*, 1975; FREEMAN, 1994), que em conjunto com o estradiol são os responsáveis pelo pico pré-ovulatório das gonadotrofinas. No entanto, os dois grupos não apresentaram nenhum pico, pelo contrário, durante esta fase as concentrações plasmáticas de progesterona são as mais baixas. Este experimento foi repetido e os resultados estão expressos nas figuras 13 e 14, novamente os animais não

manipulados e manipulados não apresentaram o pico esperado, no entanto a área sob a curva foi significativamente maior nos animais manipulados.

As figuras 9 e 12 mostram que no metaestro e no estro, respectivamente, a área abaixo da curva do grupo de ratas manipuladas é significativamente menor do que a do grupo de ratas não manipuladas.

Porém, no diestro e no proestro (figuras 10 e 11) não houve diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de progesterona das ratas manipuladas com relação às não manipuladas, quando se analisa a área abaixo da curva. Como dito anteriormente, no proestro ocorreu um problema impossibilitando assim sua análise.

Contagem do Número de Óvulos

Ratas manipuladas no período neonatal apresentaram uma redução estatisticamente significativa do número de óvulos quando comparadas ao grupo de não manipuladas (figura 15).

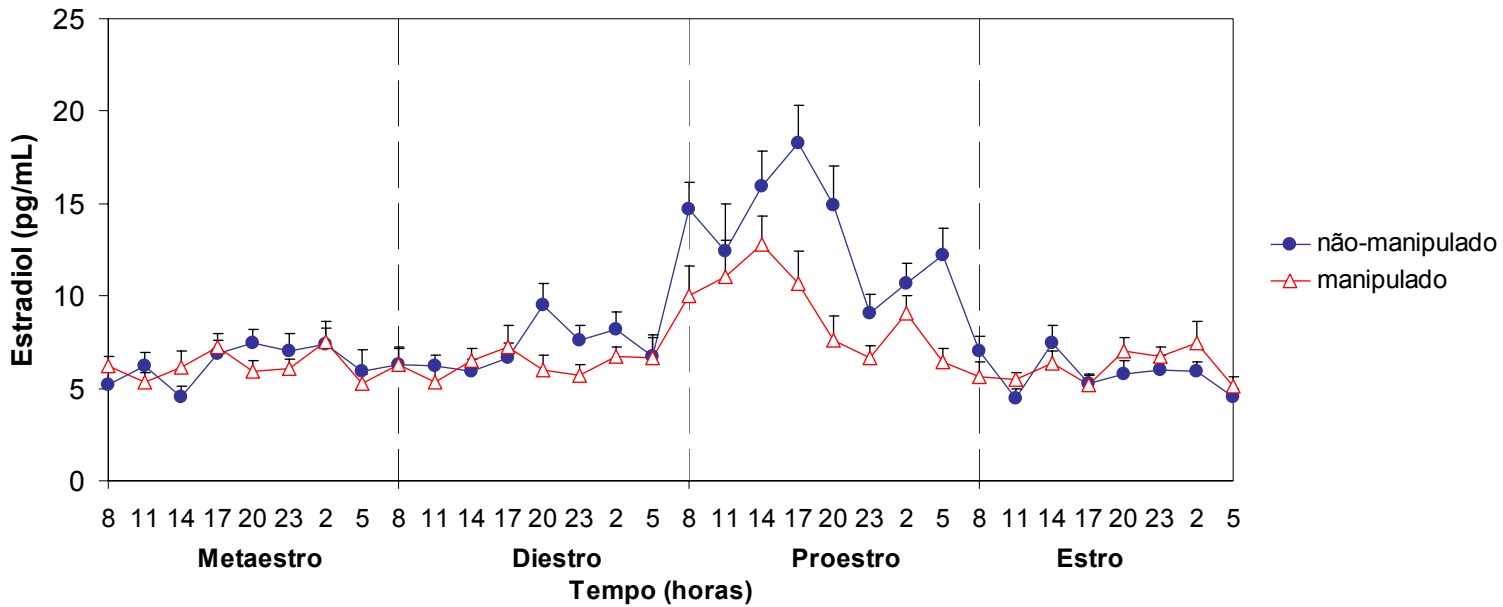


Figura 3. Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) durante o metaestro, diestro, proestro e estro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. Em cada uma das fases do ciclo estral, as ratas tiveram sua veia jugular externa canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos o n = 12 a 15.

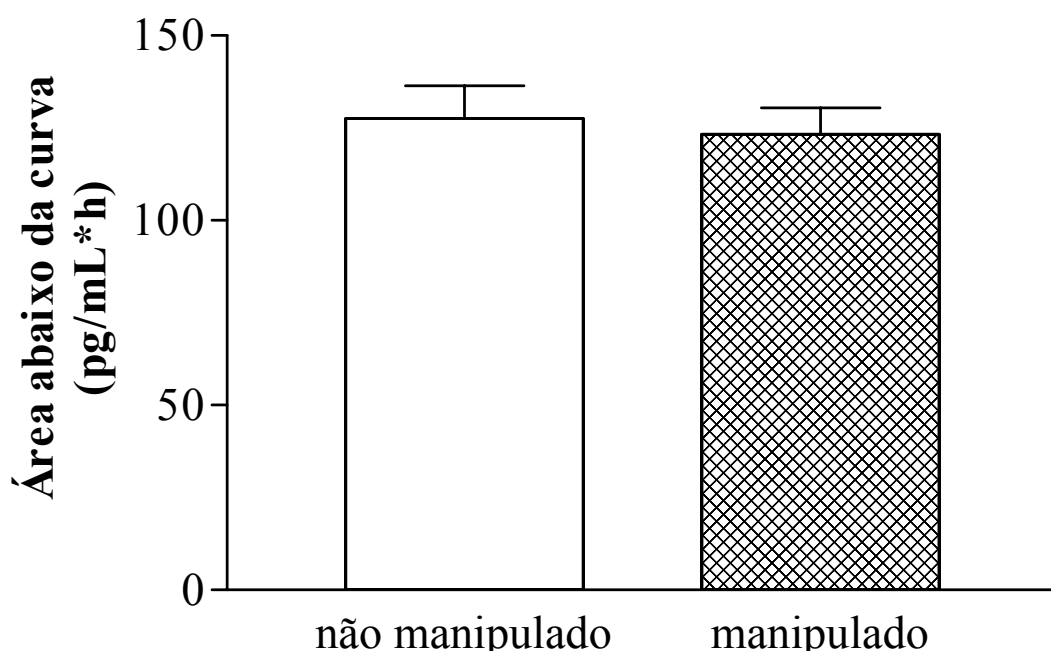


Figura 4. Média das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o metaestro, n = 15 para os dois grupos (teste *t* de *Student*).

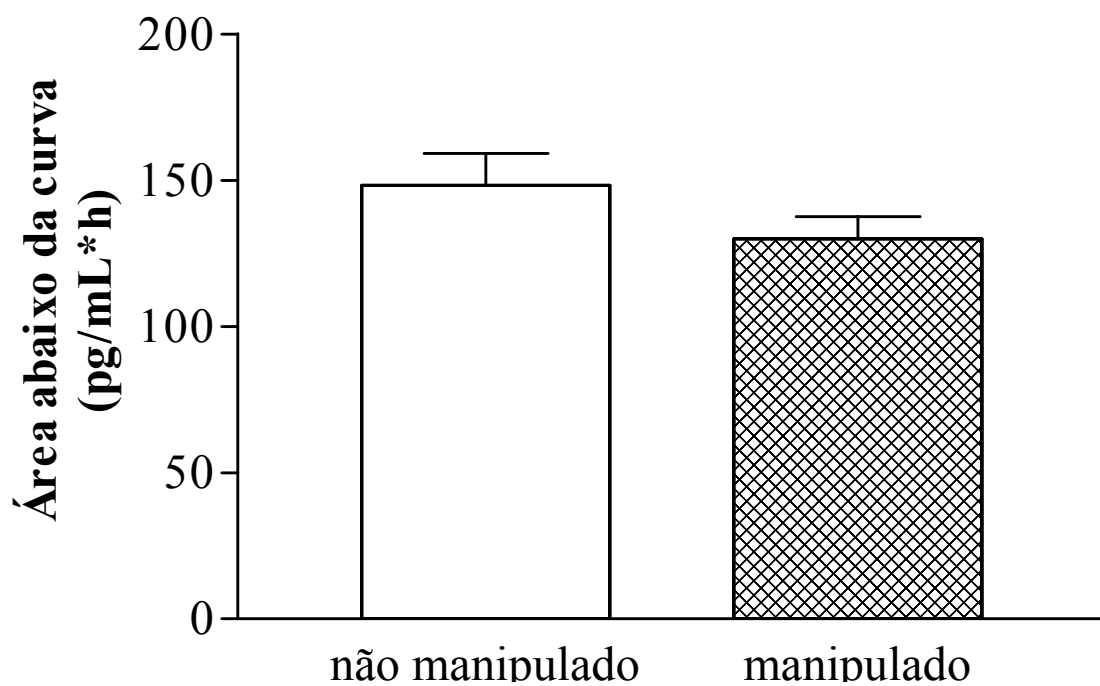


Figura 5. Média \pm EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o diestro, n = 15 para os dois grupos (teste *t* de *Student*).

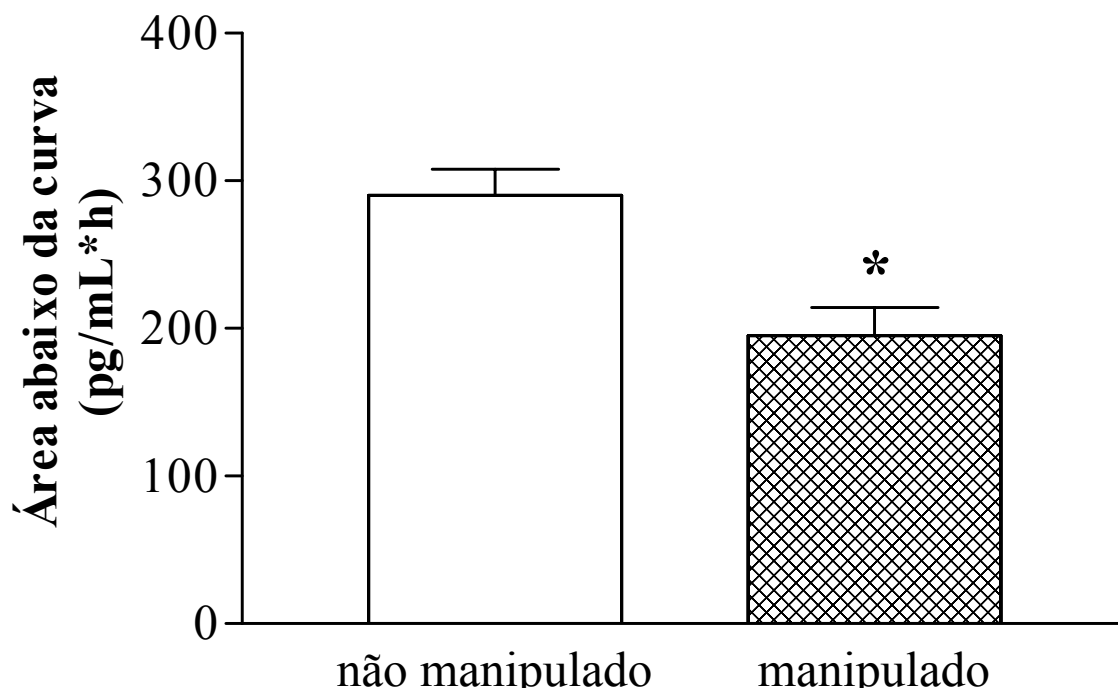


Figura 6. Média \pm EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos, * p < 0,001 quando se compara o grupo de ratas não manipuladas ao grupo manipulada (teste *t* de *Student*).

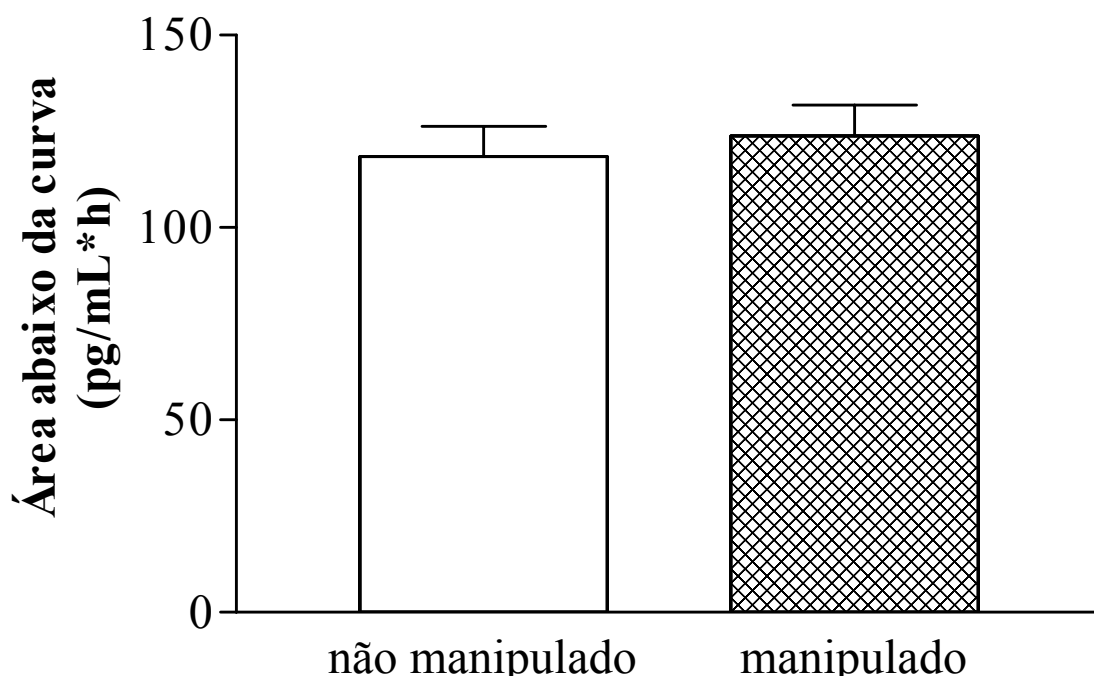


Figura 7. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de estradiol durante todo o estro, n = 15 para os dois grupos (teste *t* de *Student*).

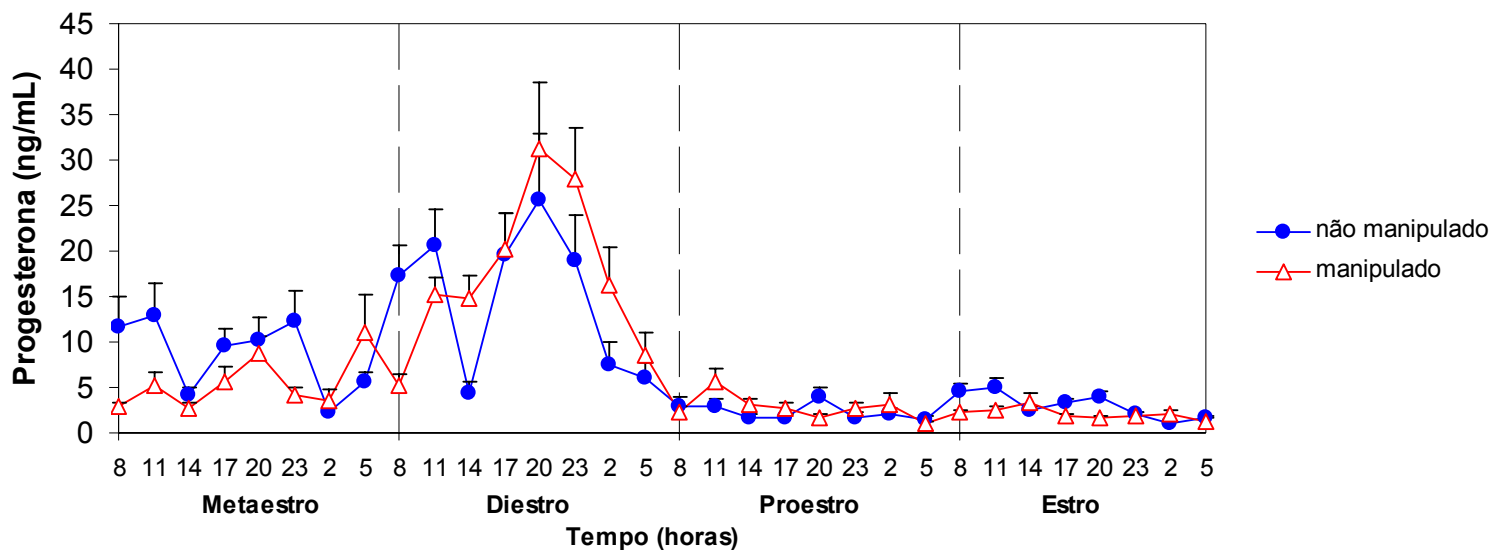


Figura 8. Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) durante o metaestro, diestro, proestro e estro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. Em cada uma das fases do ciclo estral, as ratas tiveram sua veia jugular externa canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos o n = 10 a 15.

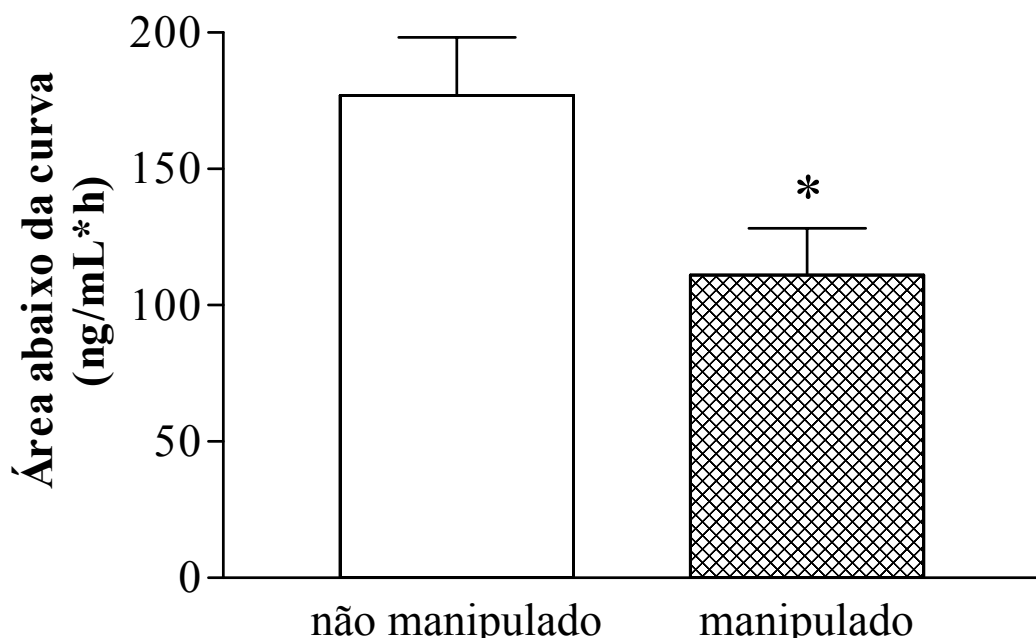


Figura 9. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o metaestro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,05 quando se compara o grupo não manipulada ao manipulada (teste *t* de *Student*).

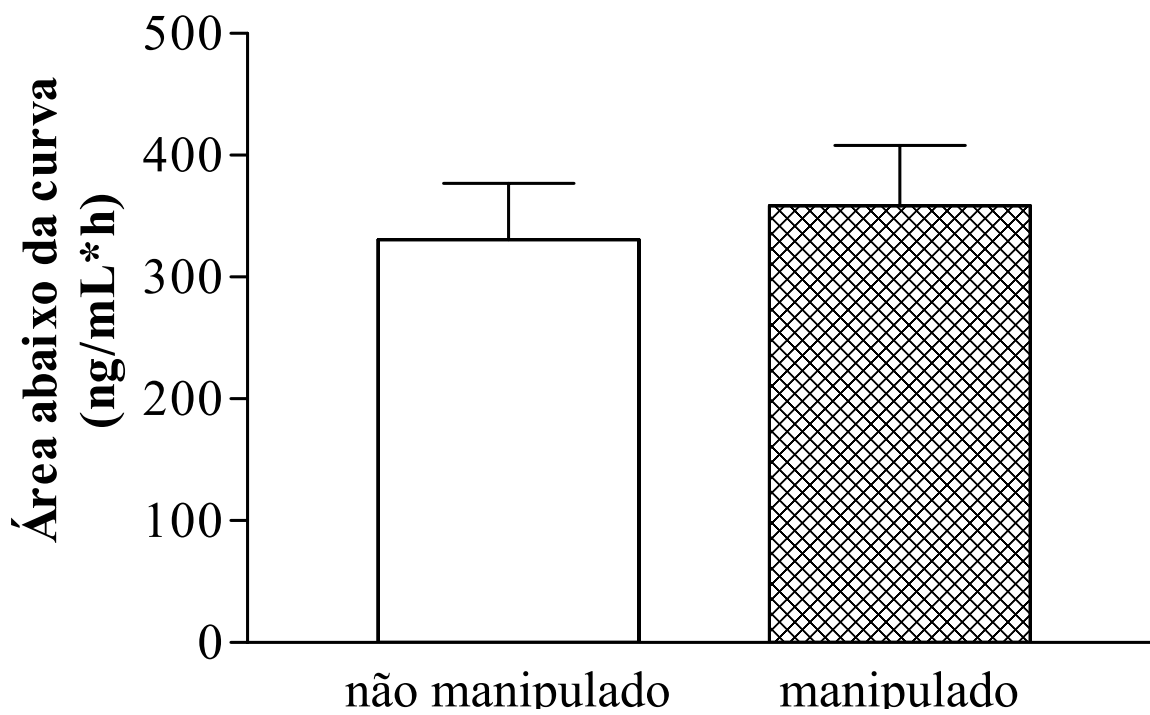


Figura 10. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o diestro, n = 15 para os dois grupos (teste *t* de *Student*).

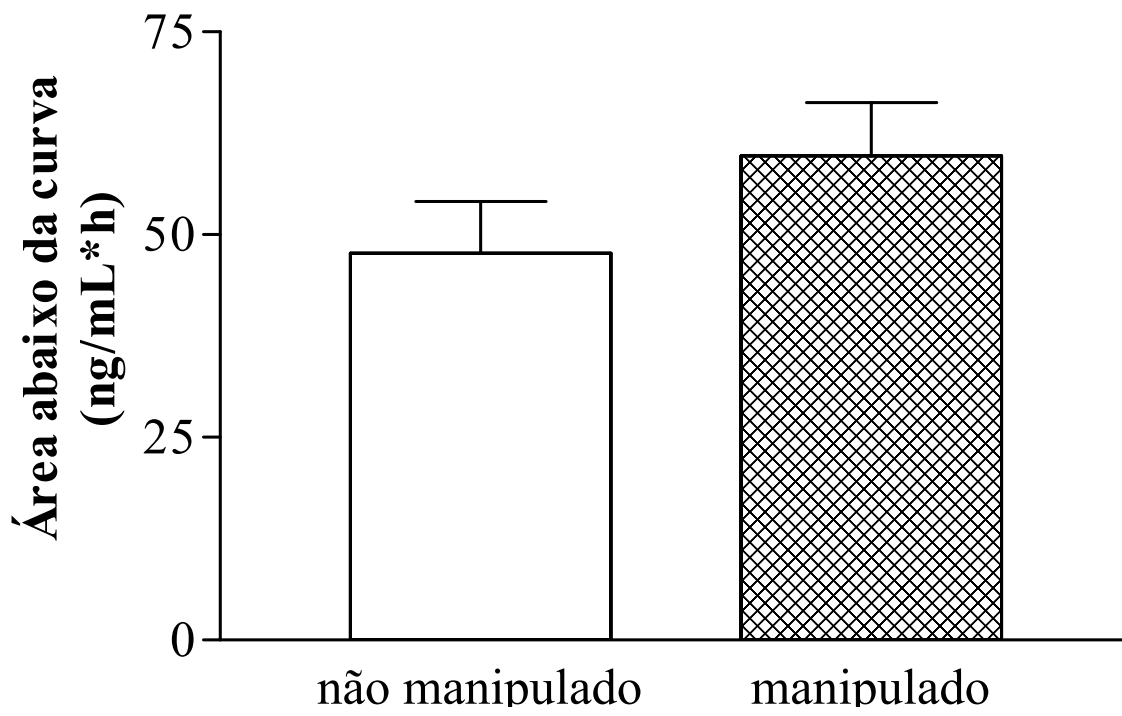


Figura 11. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos (teste *t* de *Student*).

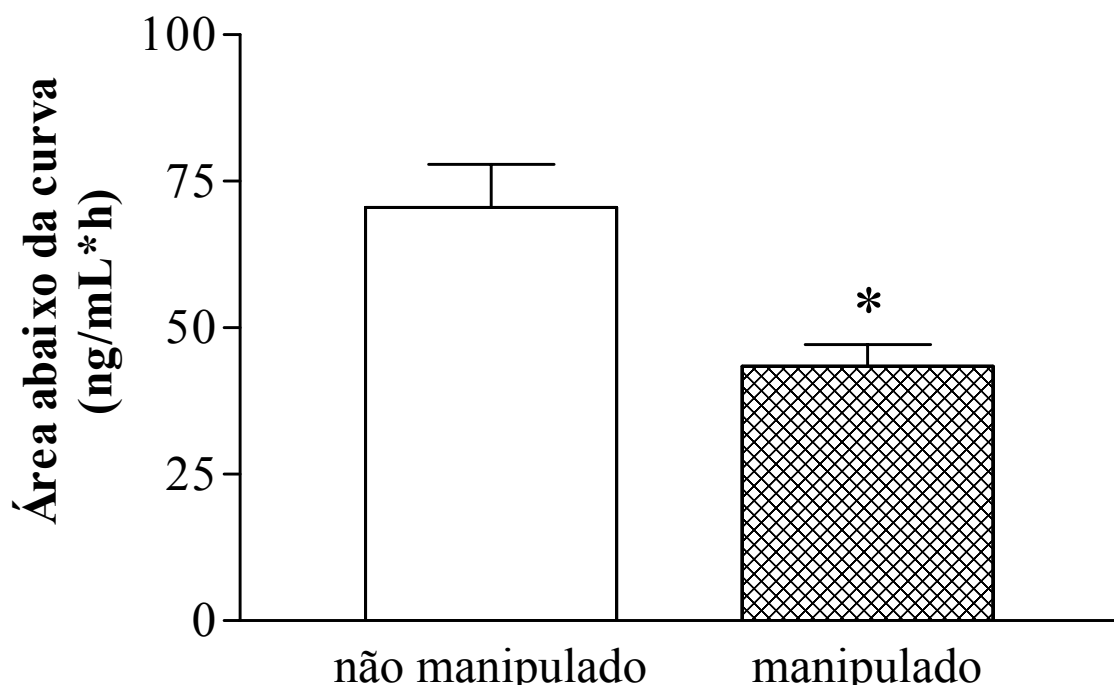


Figura 12. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o estro, n = 15 para os dois grupos, * $p < 0,01$ quando se compara o grupo não manipulada ao manipulada (teste *t* de *Student*).

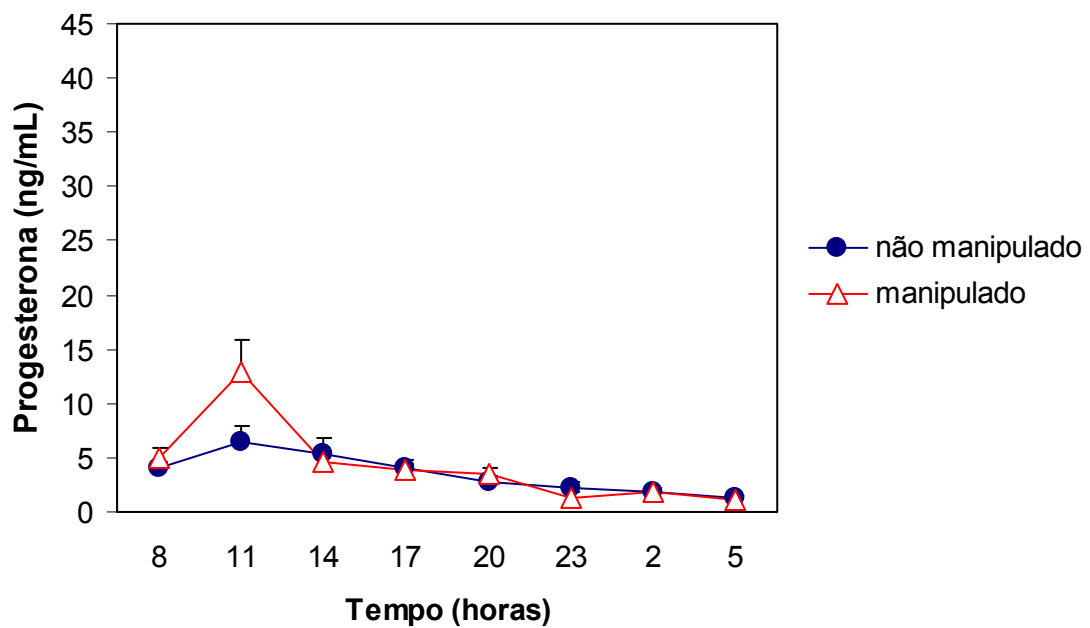


Figura 13. Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) durante proestro em ratas adultas manipuladas no período neonatal. As ratas tiveram sua veia jugular externa canulada, para coleta de sangue de 3 em 3 horas, iniciando-se às 8 horas da manhã. Para cada horário, nos dois grupos, n = 10 a 15.

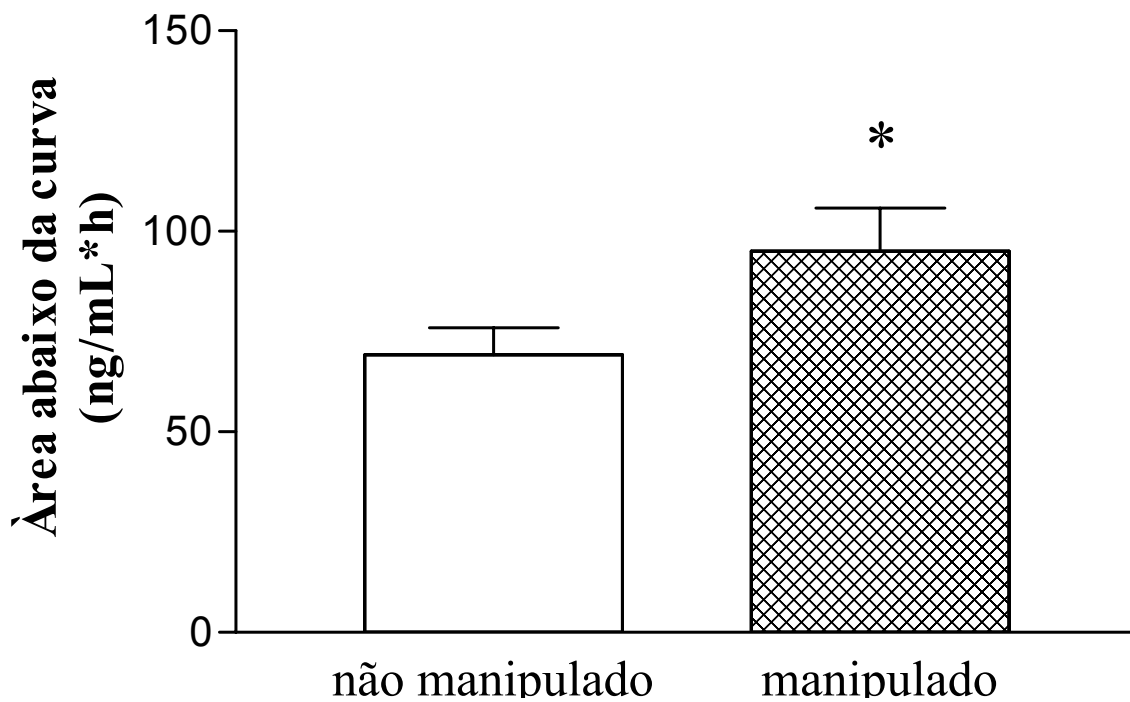


Figura 14. Média±EPM das áreas sob a curva das concentrações de progesterona durante todo o proestro, n = 15 para os dois grupos, * p< 0,05 quando se compara o grupo não manipulada ao manipulada (teste *t* de *Student*).

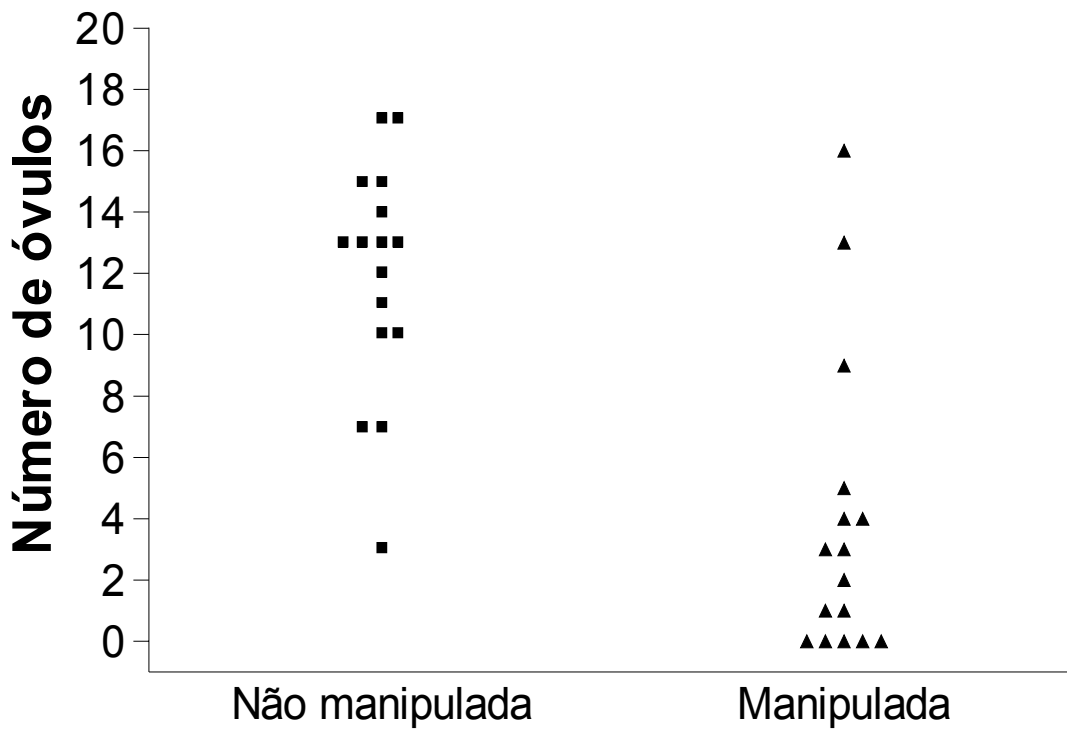


Figura 15. Distribuição das ratas não manipuladas (n = 16) e manipuladas (n = 16) no período neonatal, de acordo com o número de óvulos no dia do estro ($p < 0,0001$; Teste U de Mann-Whitney). Cada símbolo representa uma rata.

Experimento II

LH

O grupo de ratas manipuladas não diferiu do grupo de não manipuladas quanto à concentração plasmática de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona (figura 16).

FSH

O grupo de ratas manipuladas não diferiu do grupo de não manipuladas quanto a concentração plasmática de FSH em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona (figura 17).

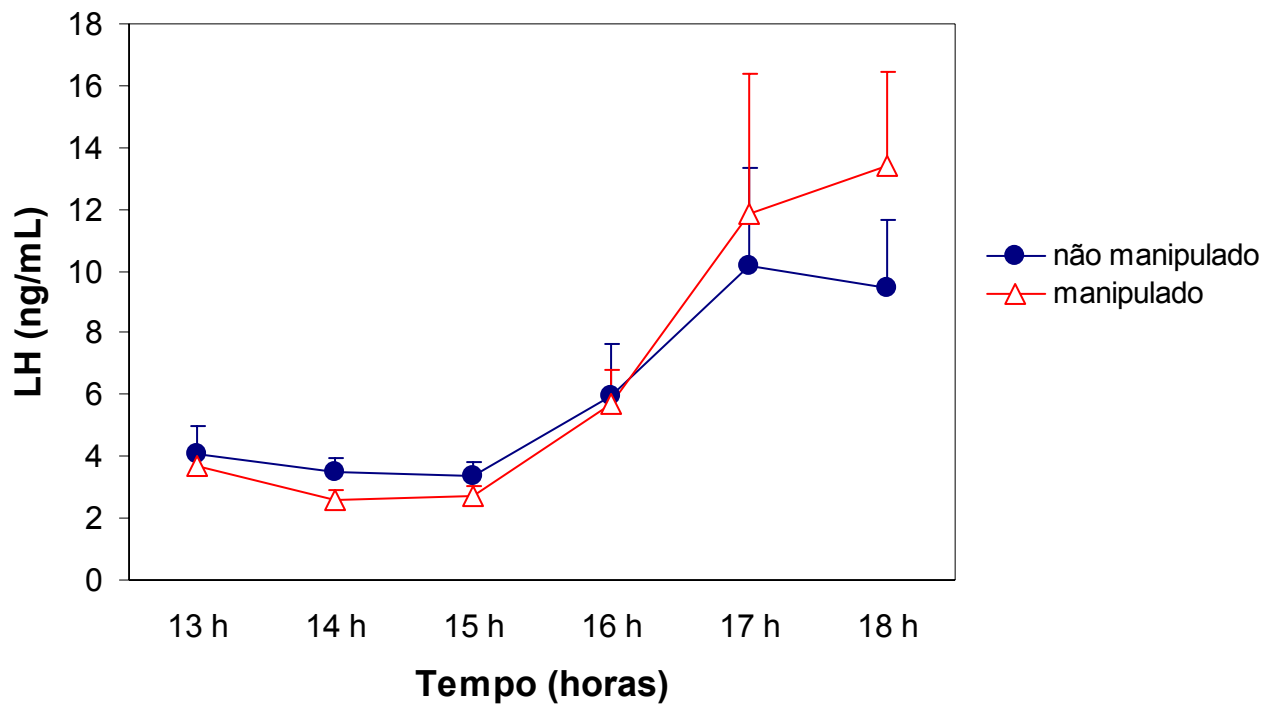


Figura 16. Concentrações plasmáticas de LH (ng/mL) de ratas manipuladas no período neonatal que quando adultas foram ovariectomizadas e repostas com estradiol por 3 dias consecutivos, no quarto dia receberam progesterona, no dia da reposição de progesterona foi coletado sangue de 1 em 1 hora, iniciando-se às 13 horas. Para cada horário, nos dois grupos, n = 13 a 12.

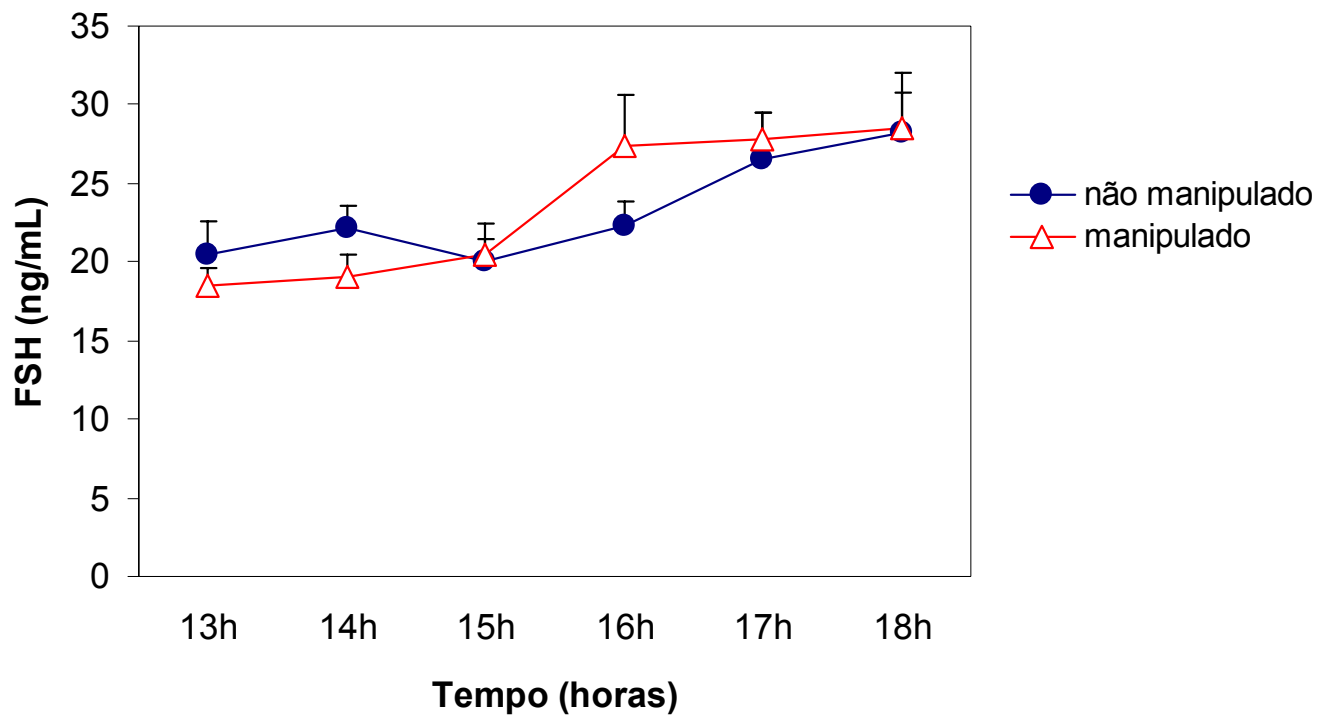


Figura 17. Concentrações plasmáticas de FSH (ng/mL) de ratas manipuladas no período neonatal que quando adultas foram ovariectomizadas e repostas com estradiol por 3 dias consecutivos, no quarto dia receberam progesterona, no dia da reposição de progesterona foi coletado sangue de 1 em 1 hora, iniciando-se às 13 horas. Para cada horário, nos dois grupos, n = 13 a 12.

Discussão

Relação Eixo HPA e HPG

Está bem estabelecido que, em ratos, a resposta neuroendócrina ao estresse físico ou psicológico é quantitativamente maior em fêmeas do que em machos, indicando que existem diferenças sexuais na atividade do eixo HPA (HANDA *et al.*, 1994). Por exemplo, fêmeas em estro ou proestro apresentam concentração de corticosterona plasmática basal mais elevada do que machos (ATKINSON & WADDELL, 1997). Essas diferenças sexuais parecem ser devidas as influências que os esteróides gonadais femininos exercem sobre o eixo HPA, pois as flutuações da atividade do eixo HPA ocorrem em função da fase do ciclo ovariano que o animal se encontra (RAPS *et al.*, 1971; CARREY *et al.*, 1995).

A íntima associação que existe entre os eixos HPA e HPG pode ser evidenciada durante o funcionamento anormal dos eixos. Por exemplo, a ausência de um ritmo circadiano normal da adrenal resulta em um ciclo ovariano irregular (RAMALEY, 1975), situações estressantes inibem a função reprodutiva (RIVIER & VALE, 1984; KAMEL & KUBAJAK, 1987), e uma esteroidogênese ovariana anormal produz uma conseqüente disfunção da regulação do eixo HPA (BILLER *et al.*, 1990).

Manipulação Neonatal, Esteróides Gonadais e Comportamento Sexual

Segundo MATTHEWS & KENYON (1984), ratas que apresentam uma maior exposição aos esteróides gonadais, ou seja, que apresentam um estro mais prolongado em ratas com o ciclo estral de cinco dias, ficam prenhas com maior facilidade. Nossos resultados mostram que os esteróides gonadais, determinando um ciclo estral regular, são essenciais para a ovulação. A manipulação neonatal diminui a concentração plasmática de estradiol comparado ao grupo controle (não manipulada), essa diminuição pode explicar a redução do número de óvulos nessas ratas, demonstrado em outros experimentos.

Algumas características do comportamento sexual são ativadas ou facilitadas pelos hormônios gonadais, entre essas estão a corte, o acasalamento e a defesa do território, incluindo vocalizações (McEWEN, 1981; McEWEN *et al.*, 1997). PADOIN *et al.* (2001) e GOMES (2001), entre outros autores, observaram que a manipulação neonatal reduz o comportamento sexual tanto em machos quanto em fêmeas. Em

fêmeas esta redução se caracteriza por diminuir a receptividade sexual, reduzindo o quociente de lordose (número de lordoses em resposta a monta do macho).

O núcleo ventromedial do hipotálamo e a área pré-óptica são estruturas importantes para a realização do reflexo de lordose; trabalhos utilizando autoradiografia, imunohistoquímica e hibridização *in situ* verificaram a presença de receptores de estradiol ou de seus RNAm nestes locais, indicando assim a importância do estradiol para a realização deste comportamento (BROWN *et al.*, 1988; CINTRA *et al.*, 1988; SIMERLY *et al.*, 1990; PFAFF, 1980). O estradiol age na área pré-óptica e hipotálamo médio basal, geralmente promovendo um aumento no número de receptores de progesterona (ATTARDI, 1984).

Da noite do proestro para a madrugada do estro, a rata apresenta o estro comportamental, portanto a redução da concentração plasmática de estradiol observada no proestro nas ratas manipuladas pode se refletir na redução do número de lordoses nesta fase. No entanto o estradiol sozinho não é capaz de induzir a lordose, tendo a progesterona uma ação facilitatória na instalação deste comportamento (POWERS, 1970), por exemplo, a ovariectomia abole a lordose, que é praticamente restaurada pelo tratamento com estradiol, no entanto o tratamento adicional com progesterona amplifica drasticamente o efeito estimulatório do estradiol sobre o comportamento sexual da rata (FLANAGAN-CATO, 2000; LEVINE *et al.*, 2001). Sendo assim, pode-se inferir que a redução das concentrações dos esteróides gonadais, descrita no presente trabalho, pode ser responsável pela diminuição do comportamento sexual da rata manipulada no período neonatal.

Papel dos Esteróides Gonadais

O estradiol é um dos principais determinantes do funcionamento e da ação dos neurônios GnRH. Durante a maior parte do ciclo o estradiol restringe a secreção de gonadotrofinas através do *feedback* negativo tanto no hipotálamo inibindo GnRH quanto diretamente na hipófise inibindo a secreção de LH e FSH. O *feedback* positivo ocorre no proestro, no qual o estradiol estimula a secreção de GnRH promovendo assim, o pico pré-ovulatório de LH e FSH (HERBISON, 1998; SHUPNIK, 2002; TOBIN *et al.*, 2001).

Em contraste com ovelhas e macacas, nas quais o estradiol é suficiente para gerar o pico de GnRH, a rata requer a presença de progesterona para que a magnitude do pico de LH no proestro seja suficientemente intenso (HERBISON, 1998). O estradiol é o responsável pela indução da expressão do receptor de progesterona, isto pode ser observado em ratas OVX em que o tratamento com estradiol estimula a expressão do receptor de progesterona na hipófise anterior e hipotálamo (LEVINE *et al.*, 2001). Isso é possível, pois o estradiol e a progesterona exercem ação sinérgica nos mesmos componentes de secreção de GnRH no rato. Após o pico de LH, entretanto, a progesterona exerce influência inibitória na secreção de GnRH no rato (HERBISON, 1998), pois a progesterona age diminuindo o número de seus receptores, contribuindo para o término da secreção de LH. Esse papel inibitório da progesterona serve para confinar o pico de LH ao dia do proestro, pois ele diminui a responsividade do gonadotrofo (ATTARDI, 1984; TURGEON & WARING, 2000).

O estradiol, juntamente com as Gn, aumenta o peso dos ovários, a proliferação das células da granulosa e promove o crescimento do folículo pré-antral e a formação do antro (RICHARDS, 1980; TONETTA & DIZEREGA, 1989).

O crescimento do folículo pré-ovulatório é dependente da interação do estradiol, FSH e LH. O FSH liga-se a seus receptores nas células da granulosa dos folículos primários e estimula a produção de estradiol pela indução ou aumento da aromatase, que é a enzima que catalisa a biossíntese do estradiol a partir dos andrógenos. O aumento da produção de andrógenos, pelas células da teca, leva ao aumento da concentração de estradiol folicular, este estradiol passa a exercer o papel regulador, pois ele aumenta a habilidade do FSH em estimular o AMPc, que por sua vez tem uma maior capacidade de se ligar aos seus sítios aumentando a atividade aromatase consecutivamente aumentando o número de receptores de LH e aumentando a responsividade ao LH como também ao FSH (NELSON & BULUN, 2001; RICHARDS, 1980; TONETTA & DIZEREGA, 1989).

Resultados ainda não publicados do nosso laboratório (GOMES, DE PAULA, LUCION e SANVITTO) mostraram que apenas 50% das ratas manipuladas no período neonatal apresentam pico de LH e FSH na tarde do proestro até às 18 horas, enquanto que nas ratas não manipuladas esse número é de 80%. No entanto, todas as ratas manipuladas que fizeram o pico o realizaram com a mesma magnitude, ou seja, a diferença está na porcentagem de ratas que fazem pico e não na intensidade com que o

fazem. Nas ratas que apresentam redução do FSH e LH pode ocorrer diminuição da produção de estradiol pelo ovário, pois, como visto anteriormente é necessário uma interação de Gn e estradiol para promover o crescimento do folículo pré-ovulatório.

O segundo pico de progesterona que começa na manhã do metaestro e dura até à tarde do diestro demonstra a atividade do corpo lúteo (FREEMAN *et al.*, 1976; GOODMAN, 1978). Segundo nossos resultados, as ratas manipuladas apresentam uma redução das concentrações plasmáticas de progesterona no metaestro, indicando uma possível dificuldade do corpo lúteo em iniciar a secreção de progesterona que com o passar do tempo torna-se normal, pois não é observada diferença da concentração plasmática de progesterona entre as ratas manipuladas e não manipuladas no diestro.

O pico de progesterona na tarde do proestro é essencial para que ocorra o pico pré-ovulatório de Gn e conseqüentemente a ovulação, no entanto como visto nos resultados este pico não ocorreu nas ratas manipuladas e nem nas não manipuladas. O experimento foi repetido, reduzindo-se o volume de sangue coletado de 800 μ L para 600 μ L imaginando-se que o volume que estava sendo coletado era excessivamente grande. No entanto, o resultado não se alterou (figuras 13 e 14), ou seja, as ratas não manipuladas continuaram não apresentando o pico de progesterona do proestro. Como esse pico de progesterona é essencial para a ovulação, seria de se esperar que essas ratas não ovulassem. Porém, estas ratas apresentaram um número de óvulos normal no estro (figura 15).

Até o momento não temos uma explicação para a ausência do pico de progesterona no proestro nas ratas controles. Uma hipótese para explicar este resultado poderia ser a anestesia utilizada (tribromoetanol). Porém, teríamos que imaginar que o anestésico afetaria apenas a secreção de progesterona no proestro, visto que o mesmo anestésico não alterou o estradiol em todas as fases estudadas e nem a progesterona nas outras fases. Uma outra possibilidade para a ausência do pico seria algum problema com o radioimunoensaio. No entanto, essa alteração é pouco provável visto que as dosagens de progesterona no metaestro, diestro e estro foram normais.

Ovulação

A concentração plasmática de FSH permanece baixa durante quase todo o ciclo estral, um aumento inicial da secreção de FSH ocorre na tarde do proestro, atingindo seu pico no fim da mesma, em seguida cai momentaneamente, e no início da manhã do estro

ele apresenta um pico secundário (figura 1) (SMITH *et al.*, 1975; BUTCHER *et al.*, 1974). Este pico secundário de FSH é o responsável pela regulação do recrutamento dos folículos ovarianos para se desenvolverem durante os próximos ciclos, que culminará na ovulação (ANZALONE *et al.*, 2001; HIRSHIELD & MIDGRLEY, 1978; HOAK & SCHWARTZ, 1980; LEVINE *et al.*, 2001).

Conforme resultados ainda não publicados em nosso laboratório (FOSSATI, TREVISAN e LUCION) ratas adultas que foram manipuladas no período neonatal apresentam uma redução na concentração plasmática de FSH na manhã do estro, o que poderia explicar nossos resultados nos quais observamos uma drástica redução no número de óvulos em ratas manipuladas no mesmo período, resultado este que confirma outro trabalho do laboratório (GOMES *et al.*, 1999). Provavelmente a menor concentração plasmática de FSH na manhã do estro das ratas manipuladas aliada a uma menor capacidade destes animais em realizar o pico de Gn na tarde anterior (proestro) responsável pela ovulação não seria suficiente para o recrutamento ideal de folículos ovarianos, o que explicaria a diminuição do número de óvulos no estro destas ratas.

KNOX *et al.* (1993) sugerem que a ativação dos receptores de progesterona é importante para a estimulação do pico secundário de FSH na manhã do estro, pois antagonista do receptor de progesterona administrado no proestro atenua o pico secundário deste hormônio no estro. Segundo nossos resultados, a concentração plasmática de progesterona no estro está reduzida na rata manipulada em relação à não manipulada, este efeito da manipulação em diminuir a concentração plasmática de progesterona provavelmente pode resultar em uma menor ativação dos receptores de progesterona refletindo em uma diminuição na intensidade do pico secundário de FSH no estro. No entanto, SZABO *et al.* (1996) demonstraram que a supressão da síntese de progesterona não previne a secreção de FSH no pico secundário, sugerindo que a ativação do receptor de progesterona é independente do ligando, no caso da progesterona.

Manipulação Neonatal e o Sistema Noradrenérgico Central

Está bem estabelecido que, em ratas, a indução da ovulação requer a liberação de Gn e PRL no período pré-ovulatório que depende do *feedback* positivo exercido pelos esteróides gonadais no proestro (FREEMAN, 1994). A NA exerce influência

estimulatória sobre os neurônios GnRH, servindo como um mediador das ações estimulatórias do estradiol (HERBISON, 1998). O pico de LH que ocorre no proestro ou em ratas OVX tratadas com esteróides gonadais pode ser devido a um aumento na liberação de NA em regiões hipotalâmicas que contém neurônios GnRH, como a área pré-óptica medial (RANCE *et al.*, 1981).

O sistema noradrenérgico parece ser o principal mediador do *feedback* dos esteróides gonadais. Em ratas OVX tratadas com estradiol, a progesterona induz ao pico de LH à tarde quando o *turnover* de NA está aumentado, e não pela manhã, quando está baixo (HIENKE *et al.*, 1983). Por outro lado, o *feedback* negativo do estrógeno está associado à diminuição da concentração de NA em amostras dialisadas da área pré-óptica medial de ovelhas em anestro (GOODMAN *et al.*, 1995). A ablação das vias noradrenérgicas ou administração de antagonista do receptor α -adrenérgico bloqueia a ocorrência do pico de GnRH, pois a liberação estrógeno dependente de NA para o área pré-óptica medial e EM no proestro altera a biossíntese e secreção de GnRH (HERBISON, 1998).

A remodelação hormônio-dependente das respostas hipotalâmicas pela NA maximiza o sucesso do processo reprodutivo, associando o pico pré-ovulatório de Gn com o período de receptividade das fêmeas (ETGEN *et al.*, 2001).

Lesão do LC em ratas OVX, onde 60-100% do núcleo é destruído, reduz a frequência e amplitude de secreção bem como a concentração plasmática de LH em comparação com o grupo controle, no entanto, lesões que atingem de 10-50% do LC não alteram nenhum destes itens (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1999). Em contrapartida, lesão do LC na manhã do proestro bloqueia a secreção de LH, FSH e PRL, reduz também a concentração de NA no hipotálamo médio basal e área pré-óptica medial (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997). Resultados obtidos por PEREIRA (2001) indicam que a manipulação diária por 1 minuto nos 10 primeiros dias de idade em ratos machos e fêmeas promove uma diminuição significativa no número de neurônios do LC aos 11, 26, 35 e 90 dias de idade, ou seja, ratos manipulados no período neonatal apresentam um menor número de neurônios no LC que ratos não manipulados. Para LIU *et al.* (2000a) eventos no início da vida do indivíduo podem influenciar a diferenciação dos neurônios noradrenérgicos e alterar suas respostas quando adulto.

Estes resultados indicam que a ação estimulatória do LC sobre os neurônios GnRH está reduzida, o que está de acordo com os resultados ainda não publicados de

GOMES e colaboradores que mostra uma redução de 50% no número de ratas manipuladas que realizam o pico de LH e FSH. Segundo nossos resultados, as ratas manipuladas apresentam uma menor concentração plasmática de estradiol no proestro. Esta redução pode ser consequência da diminuição do número de neurônios no LC, que estaria reduzindo a sua ação estimulatória sobre os neurônios GnRH. Sugere-se que a redução da concentração plasmática de estradiol aliada à diminuição do número de neurônios no LC decorrentes da manipulação neonatal seriam os fatores responsáveis pela depressão do eixo HPG.

Porém, animais não manipulados e manipulados castrados e repostos com estradiol e progesterona apresentam o mesmo padrão de secreção de LH e FSH, indicando que a responsividade do eixo hipotálamo-hipófise aos esteróides gonadais parece não ter sido alterada pela manipulação neonatal, mesmo com a redução no número de neurônios do LC provocados por esta manipulação (PEREIRA, 2001). Porém a reposição hormonal que foi realizada pode estar suprimindo os efeitos da manipulação neonatal, que são sutis e apenas em algumas fases do ciclo estral.

Considerando que as concentrações plasmáticas dos esteróides gonadais, Gn e PRL, presentes durante o ciclo estral, e principalmente na tarde do proestro são essenciais para uma função reprodutiva normal, qualquer mudança nos processos fisiológicos que as determinam pode prejudicar a função reprodutiva do indivíduo. Assim, os resultados presentes indicam que a manipulação neonatal, além de alterar o funcionamento do eixo HPA, como visto por vários autores (LEVINE *et al.*, 1993; MEANEY *et al.*, 1994; SAPOLSKY, 1994), também modifica o eixo HPG. Isso ocorre devido às alterações em estruturas neuroendócrinas promovidas pela manipulação no início da vida pós-natal do animal.

Estes experimentos ressaltam a importância do período neonatal no desenvolvimento do comportamento emocional, reatividade a estímulos ambientais e desenvolvimento neural nos indivíduos, e como estímulos ambientais neste período podem ter efeitos estáveis e duradouros sobre o estabelecimento destas características.

Conclusões

◆ A manipulação no período neonatal diminuiu a concentração plasmática de estradiol no proestro. A alteração deste esteróide gonadal pode explicar a redução do número de óvulos das fêmeas manipuladas.

◆ As ratas manipuladas no período neonatal apresentam o mesmo padrão de secreção de LH e FSH que as ratas não manipuladas quando as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona são iguais, indicado que a manipulação neonatal parece não afetar a responsividade do eixo hipotálamo-hipófise aos esteróides gonadais. No entanto, é necessária a realização de mais experimentos para que afirmações possam ser feitas a respeito da responsividade do eixo.

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, C. E.; CADORE, L. P.; PADOIN, M. J.; BARBOSA-COUTINHO, L. M.; LUCION, A. B. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.1463-1466, 1997.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S. M. *Locus Coeruleus* lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. **Brain Research**, v. 767, p.289-296, 1997.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; OLIVEIRA, M. Control of prolactin secretion by the locus coeruleus in cycling female and male rats. ICE 96. **10th International Congress of Endocrinology**, July 12-15, San Francisco, CA, USA, 308 (Abstract), 1996.
- ANSELMO-FRANCI, J. A., ROCHA-BARROS, V. M.; FRANCI, C. R.; McCANN, S. M. Locus coeruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. **Brain Research**, v.833, p.86-92, 1999.
- ANZALONE, C. R.; HONG, L.; LU, J. K. H.; LAPOLT, P. S. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1056-1062, 2001.
- 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, p.3842-3848, 1997.
- ATTARDI, B. Progesterone modulation of the luteinizing hormone surge: regulation of hypothalamic and pituitary progestin receptors. **Endocrinology**, v.115, p.2113-2122, 1984.
- BIAGINI, G.; PICH, E. M.; CARANI, G.; MARRAMA, P.; AGNATI, L. F. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **Int. Journal Dev. Neuroscience**, v.16, p.187-197, 1998.
- BILLER, B. M. K.; FEDEROFF, H. J.; KOENIG, J. I.; KLIBANSKI, A. Abnormal cortisol secretion and responses to corticotropin-releasing hormone in women with hypothalamic amenorrhea. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.70, p.311-317, 1990.
- BOHN, M. C.; Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. **Neuroscience**, v.5, p.2003-2012, 1980.
- BROWN, T. J.; HOCHBERG, R. B.; ZEILINSKI, J. E.; MacLUSKY, N. J. Regional sex differences in cell nuclear estrogen-binding capacity in the rat hypothalamus and preoptic area. **Endocrinology**, v.123, p.1761-1770, 1988.

- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v.94, p.1704-1708, 1974.
- CAREY, M. P.; DETERD, C. H.; DE KONING, J.; HELMERHORST, F.; DE KLOET, E. R. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. **Journal of Endocrinology**, v.144, p.311-321, 1995.
- CECCATELLI, S.; VILLAR, M. J.; GOLDSTEIN, M.; KÖKFELT, T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter characterized neurons after stress. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA**, v. 86, p. 9569-9573, 1989.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders - Overview of physical and behavioral homeostasis. **Jama**, v.267, p.1244-1252, 1992.
- CHROUSOS, G. P.; TORPY, D. J.; GOLD, P. W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. **Ann. Interm. Med.**, v.129(3), p.229-240,1998.
- CINTRA, L.; DIAZ-CINTRA, S.; GALVAN, A.; MORAGE, P. J. Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. **Biol. Estud. Med. Biol.**, v.36, p.3-17, 1988.
- CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKOL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 111(2), p. 477-505, 1995.
- DENENBERG, V. H. Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effects in infancy? **Developmental Psychobiology**, v.34, p.1-3, 1999.
- DENENBERG, V. H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation. **Psychological Review**, v.71(5), p. 335-351, 1964.
- DENT, G. W.; SMITH, M. A.; LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology**, v.141, p.1593-1598, 2000.
- ERKINE, M. S.; GELLER, E.; YUWILER, A. Effects of neonatal hydrocortisone treatment on pituitary and adrenocortical responses to stress in young rats. **Neuroendocrinology**, v.29, p.191-199, 1979.
- ETGEN, A. M.; ANSONOFF, M. A.; QUESADA, A. Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. **Hormones and Behavior**, v.40, p.169-177, 2001.

- FERIN, M. Stress and the reproductive cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, p.1768-1774, 1999.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; DRISCOLL, P.; TOBEÑA, A.; BÄTTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in Young roman high- and low-avoidance rats. **Physiology & Behavior**, v. 50, p.563-565, 1991.
- FLANAGAN-CATO, L. M. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, p.309-329, 2000.
- FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. **Annual New York Academy of Sciences**, v.745, p.136-152, 1994.
- FRANTZ, P. J., GOMES, C. M., SANVITTO, G. L., LUCION, A. B. Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento sexual de ratas. **X Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Outubro, 19-23, Porto Alegre, RS, Brasil, 225 (Abstract), 1998.
- FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E. & Neill, j. (Editors), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994.
- FREEMAN, M. C.; DUPKE, K. C.; CROTEAU, C. M. Extinction of the estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. **Endocrinology**, v.99, p.223-229, 1976.
- GOMES, C. M. Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. **Dissertação** (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- GOMES, C. M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1239-1242, 1999.
- GONZÁLEZ, A. S.; RODRÍGUEZ ECHANDÍA, E. L.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M. R. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females. **Physiology and Behavior**, v. 56(3), p. 581-595, 1994.
- GOODMAN, R. L. A quantitative analysis of the physiological role of estradiol and progesterone in the control of tonic and surge secretion of luteinizing hormone in the rat. **Endocrinology**, v.102, p.142-150, 1978.
- GOODMAN, R. L.; ROBINSON, J. E.; KENDRICK, K. M.; DYER, R. G. Is the inhibitory action of estradiol on luteinizing hormone pulse frequency in anestrus ewes mediated by noradrenergic neurons in the preoptic area? **Neuroendocrinology**, v.61, p.284-292, 1995.

- HANDA, R. J.; BURGESS, L. H.; KERR, J. E.; O'KEEFE, J. A. Gonadal steroid hormone receptor and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Hormones and Behavior**, v.28, p.464-476, 1994.
- HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J. Appl. Physiol.**, v. 36, p. 391-392, 1974.
- HERBISON, A. E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrine Reviews**, v.19, p.302-330, 1998.
- HERBISON, A., HORVATH, T. L.; NAFTOLIN, F.; LERANTH, C. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. **Neuroendocrinology**, v. 61, p. 1-10, 1995.
- HERITAGE, A. S.; STUMPF, W. E.; SAR, M.; GRANT, L. D. Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. **Science**, v.207, p.1377-1379, 1980.
- HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v.20, p.78-84, 1997.
- HERMEL, E. E. S.; SEVERINO, G. S.; CECCONELLO, A. L.; PEREIRA, F. M.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. L. Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.1191-1195, 2001.
- HESS, J. L.; DENENBERG, V. H.; ZARROW, M. X.; PFEIFER, W. D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology & Behavior**, v.4, p.109-111, 1969.
- HIENKE, C.; FROHNE, D.; BRUDER, D.; GHRAF, R. Effects of oestradiol benzoate and progesterone on luteinizing hormone release and catecholamine turnover. **Journal of Endocrinology**, v.97, p.437-445, 1983.
- HIRSHFIELD, A. N.; MIDGLEY, A. R. The role of the FSH surge in the selection of preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v.19, p.597-605, 1978.
- HOAK, D.C.; SCHWARTZ, N. B. Blockade of recruitment of ovarian follicles by suppression of the secondary surge of follicle-stimulating hormone with porcine follicular fluid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.4943-4956, 1980.
- HRABOVSKY, E.; SHUGHRUE, P. J.; MERCHENTHALER, I.; HAJSZÁN, T.; CARPENTER, C. D.; LIPOSITIS, Z.; PETERSEN, S. L. Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and ^{125}I -estrogen binding sites in

luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. **Endocrinology**, v.141, p.3506-3509, 2000.

JENNES, L.; JENNES, M. E.; PURVIS, C.; NEES, M. c-fos expression in noradrenergic A₂ neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. **Brain Research**, v.586, p.171-175, 1992.

JONES, B. E.; MOORE, R. Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. Autoradiographic study. **Brain Research**, v. 127, p. 289-296, 1977.

KALRA, S. P.; KALRA, P. S. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. **Endocrine Reviews**, v.4(4), p.311-351, 1983.

KAMEL, F.; KUBAJAK, C. L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroid and mechanism of action. **Endocrinology**, v.121, p.561-568, 1987

KNOX, K. L.; RINGSTRON, S. J.; SCHWARTZ, N. B. RU486 blocks the effects of inhibin antiserum or luteinizing hormone on secondary follicle-stimulating hormone surge. **Endocrinology**, v.133, p.277-283, 1993.

KONSTANDI, M.; JOHNASON, E.; LANG, M. A.; MALAMAS, M.; MARSELOS, M. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. **Pharmacological Research**, v.41, p.341-346, 2000.

KOPIN, I. L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses **Annual New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 19-30, 1995.

KUHM, C. M.; SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v.16, p.261-270, 1998.

LEVINE, J. E.; CHAPPELL, P. E.; SCHNEIDER, J. S.; SLEITER, N. C.; SZOBO, M. Progesterone receptors as neuroendocrine integrators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.22, p.69-106, 2001.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**, v.73, p.255-260, 2001.

LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. **Science**, v.135, p. 795-799, 1962.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. **Annual New York Academy of Sciences**, v.746, p.275-293, 1994.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. **Annual New York Academy of Sciences**, v.697, p.61-69, 1993.

- LEVINE, S.; HALTMEYER, G. C.; KARAS, G. G.; DENENBERG, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology & Behavior**, v.2, p.55-59, 1967.
- LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine response release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v.12, p.5-12, 2000a.
- LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats, **Nature Neuroscience**, v.3(8), p.799-806, 2000b.
- LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARDON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v.277, p.1659-1662, 1997.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrus cycle in the rat and its related- phenomena. **Mem. Univer. Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1922.
- LÓPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Neural circuits mediating stress, **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1461-1471, 1999.
- LUCION, A. B.; CADORE, L. P.; CHARCHAT, H.; BARROS, H. M. T.; PADOIN, M. J. Effects of noxious stimulation during the stress-hyporesponsive period on behaviors of pre-puberal and adult male and female rat. **27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**. p.1081, 1997 (Abstract).
- LUCION, A. B., PADOIN, M. J.; PEREIRA, F. M.; MANDARIM-LACERDA, C. A.; SCHNEIDER, F. L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex of rats submitted to neonatal stimulation. **29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**. p.617, 1999 (Abstract).
- MATTHEWS, M. K.; KENYON, R. Four-versus five-day estrous cycle in rats: vaginal cycling and pregnancy. **Physiology & Behavior**, v.33, p.65-67, 1984.
- MARTIN, C. A.; CAKE, M. H.; HOLBROOK, N. J. Relationship between fetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. **Acta Endocrinol**, v.84, p.167-176, 1977.
- McEWEN, B. S. Neural gonadal steroid actions. **Science**, v.211, p.1303-1311, 1981.
- McEWEN, B. S.; ALVES, S. E.; BULLOCH, K.; WEILAND, N. G. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. **Neurology**, v.48, p.8-15, 1997.

- MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations temporal parameters. **Developmental Brain Research**, v.22, p.301-304, 1985.
- MEANEY, M. J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, M.; SHARAMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.; Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annual New York Academy of Sciences**, v.697, p.70-85, 1993.
- MELIA, K. R.; DUMAN, R. S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.88, p.8382-8386, 1991.
- NEILL, J. D. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. **Endocrinology**, v.90, p. 1154-1159, 1972.
- NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.45, p.S116-S124, 2001.
- OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K. J.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, p. 961-967, 1994.
- PADOIN, M. J.; CADORE, L. P.; GOMES, C. M.; BARROS, H. M. T.; LUCION, A. B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience**, v.115, p.1332-1340, 2001.
- PEREIRA, F. M. Efeitos da manipulação neonatal sobre o número de neurônios do *Locus coeruleus* em ratos. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- PEREIRA, G. A. M. Expressão da imunoreatividade à somatostatina no hipotálamo de ratos de 11 dias de vida pós-natal submetidos à estimulação neonatal. **Dissertação** (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- PETRAGLIA, F.; SUTTON, S.; VALE, W.; PLOTSKY, P. Corticotropin-releasing factor decrease plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone releasing into hypophysial-portal circulation. **Endocrinology**, v. 120, p. 1083-1088, 1987.
- PFAFF, D. W. Estrogen and brain function: neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior. New York: Springer, 1980.
- PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v.18, p.195-200,

1993.

- POWERS, B. J. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. **Physiology and Behavior**, v.5, p.831-835, 1970.
- RANCE, N.; WISE, P. M.; SELMANOFF, M. K.; BARRACLOUGH, C. A. Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in the median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. **Endocrinology**, v.108, p.1795-1902, 1981.
- RAPS, D.; BARTHE, P. L.; DESAULLES, P. A. Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in normal female rats. **Experimentia**, v.27, p.339-340, 1971.
- RHEES, R. W.; LEPHART, E. D.; ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal developmental on male sexual behavior and female reproductive function. **Behavioural Brain Research**, v.123, p.1-10, 2001.
- RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v.60, p.51-89, 1980.
- RIVIER, C.; VALE, W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. **Endocrinology**, v.114, p.914-921, 1984.
- RIVEST, S.; RIVIER, C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 177-199, 1995.
- ROY, B. N.; REID, R. L.; VAN VUGT, D. A. The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the Rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 140, p. 2191-2198, 1999.
- SAPOLSKY, R. M. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of hippocampus. **Annual New York Academy of Sciences**, v.746, p.294-307, 1994.
- SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Rev.**, v.11, p.65-76, 1986.
- SHIVERS, B. O.; HARLAN, R. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH immunoreactive neurons. **Nature**, v.304, p.345-347, 1983.
- SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and $-\beta$ mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v.388, p.507-525, 1997.

- SHUPNIK, M. A. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v.14, p.85-94, 2002.
- SIECK, G.; RAMALEY, J. A. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. **Physiology & Behavior**, v.15, p.487-489, 1975.
- SIMERLY, R. B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANSON, L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA – containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.**, v.294, p.76-95, 1990.
- SZABO, M.; KNOX, K. L.; RINGSTRON, S. J.; PERLYN, C. A.; SUTANDI, S.; SCHWARTZ, N. B. Mechanism of the inhibitory action of RU486 on the secondary follicle-stimulating hormone surge. **Endocrinology**, v.137, p.85-89, 1996.
- TOBIN, V. A.; POMPOLO, S.; CLARKE, I. J. The percentage of pituitary gonadotropes with immunoreactive oestradiol receptors increases in the follicular phase of the ovine oestrous cycle. **Journal of Neuroendocrinology**, v.13, p.846-854, 2001.
- TOHEI, A.; TOMABECHI, T.; MAMADA, M.; AKAI, M.; WATANABE, G.; TAYA, K. Effects of repeated ether on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 59(5), p. 329-351, 1997.
- TONETTA, S. A.; DIZEREGA, G. S. Intra-gonadal regulation of follicular maturation. **Endocrine Reviews**, v.10, p.205-229, 1989.
- TURGEON, J. L.; WARING, D. W. Progesterone regulation of the progesterone receptor in the gonadotropes. **Endocrinology**, v.141, p.3422-3429, 2000.
- TSEN, L. C.; NATALE, M.; DATTA, S.; ESPPEN, S. Can estrogen influence the response to noxious stimuli? **Journal of Clinical Anesthesia**, v.13, p.118-121, 2001.
- VAN OERS, H. J. J.; DE KLOET, E. R.; LEVINE, S. Persistent effects of maternal deprivation of HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. **Journal of Neuroendocrinology**, v.11, p.581-588, 1999.
- VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, v. 129, p. 2305-2311, 1991.
- WARD, I. L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. **Science**, v.175, p.82-84, 1972.

- WALKER, C. D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVER, C. Ontogeny of the stress response in the rat:: Role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v.118, p.1445-1451, 1986.
- WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Pituitary corticotroph function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats, **Neuroendocrinology**, v.57, p.1003-1010, 1993.
- WEAVER, S. A.; AHERNE, F. X.; MEANEY, M. J.; SCHAEFER, A. L.; DIXON, W. T. Neonatal handling permanently alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, behaviour, and body weight in boars. **Journal of Endocrinology**, v.164, p.349-359, 2000.
- WIGGER, A.; NEUMANN, I. D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. **Physiology & Behavior**, v.66(2), p. 293-302, 1999.