

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

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE O SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO**

Cármem Marilei Gomes

Orientador

Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-Orientador

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

PORTO ALEGRE

2001

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

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE O SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO

Cármem Marilei Gomes

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neurociências
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito para a obtenção
do grau de Mestre em Neurociências.

PORTO ALEGRE

2001

**Se as coisas são inatingíveis- Ora,
Não é motivo para não querê-las-
Que tristes os caminhos se não fora
a mágica presença das estrelas!**

Mário Quintana

Agradecimento Especial

Ao orientador Gilberto Luiz Sanvitto pela confiança, incentivo e, sobretudo, compreensão.

Ao professor Aldo Bolten Lucion pela oportunidade e confiança.

À minha família pela ajuda constante que possibilitou chegar até este momento.

Agradecimentos

Aos colegas Charlis Raineiki e Sara Sagae pela ajuda e cuidado com os animais durante parte do trabalho.

Erica do Espírito Santo Hermel por toda ajuda e companheirismo durante este período.

Francine Martins Pereira pela amizade e constante incentivo.

Gabriela Severino pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Gabriela Pereira pela determinação, amizade e paciência.

Isabel Fossati pela pronta ajuda, alegria e amizade que coloriram este período.

Márcia Koja pelo exemplo de dedicação e zelo ao trabalho.

À Patrícia Ramos de Paula pela ajuda durante a coleta de dados e, sobretudo, pela amizade construída neste período.

Ao Vanderlom Fabiano pelo cuidado com os animais.

Aos amigos e amigas Ana Raquel, Anelise Todeschini, Elisa, Márcia Giovenardi, Luciene Rodrigues, Márcio Donadio, Luciano Trevisan, Renato Moreira Rosa pelo alegre convívio.

Às secretárias Maria, Uira e Miriam pela colaboração.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	VII
Lista de Abreviaturas.....	IX
Resumo	X
Introdução	
Respostas ao Estresse.....	1
Estimulação neonatal e o desenvolvimento neural.....	3
Período hiporresponsivo ao estresse	5
A relação mãe-filho e o desenvolvimento neural.....	6
Função reprodutiva e sistema nervoso.....	8
O ciclo ovariano da rata.....	10
A função reprodutiva da rata	14
Estresse e a função reprodutiva	16
Objetivo	19
Material e Métodos	
Experimentos.....	20
Animais.....	20
Grupos.....	20
Comportamento Sexual.....	23
Contagem do número de óvulos.....	25

Instalação da puberdade	26
Análise do ciclo estral	26
Análise estatística	29
Resultados	31
Discussão	
A relação os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal	39
Esteróides gonadais e a fase neonatal.....	40
Comportamento sexual da rata: lordose.....	42
Estimulação neonatal e o sistema naradrenégico central	44
Conclusões	47
Referências Bibliográficas	48

Lista de Figuras

Figura 1: Concentrações plasmáticas (médias \pm EPM) de PRL, progesterona (P), LH e FSH obtidas em intervalos de 2 horas nos quatro dias de ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (em Smith *et al*, 1975).

Figura 2: Modelo de manipulação neonatal

Figura 3: Modelo de estresse neonatal

Figura 4: Coleta de secreção vaginal

Figura 5: Fases do ciclo estral observadas no microscópio

Figura 6: Número de lordoses em 10 minutos (média \pm EPM frequência), apresentado por ratas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro, quando testadas com machos sexualmente ativos. "a" comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 7: Número de montas do macho em 10 minutos (média \pm EPM frequência) quando testados com fêmeas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro. "a" quando comparado ao grupo de não-estimuladas e "b" quando comparado ao grupo de manipuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Figura 8: Quociente de lordose (média \pm EPM) de ratas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro, quando testadas com machos sexualmente ativos. "a" quando comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 9: Distribuição das ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal, de acordo com o número de óvulos (mediana) na fase estro ($p < 0,05$; Teste U de Mann-Whitney). Cada símbolo representa um animal.

Figura 10: Idade (dias) em que ocorre a abertura vaginal de ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal. * comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$, Teste t de Student).

Figura 11: Número de fases (frequência) do ciclo estral em 29 dias em ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal ($p < 0,05$, Teste t de Student).

Lista de Abreviaturas

ACTH	Corticotrofina
AMPc	Adenosina 3,5 Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
AVP	Arginina Vasopressina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
E	Estradiol
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IP	Intraperitonal
LC	Locus Coeruleus
LH	Hormônio Luteinizante
MPOA	Área Pré-Óptica Medial
NA	Noradrenalina
NPY	Neuropeptídeo Y
ODC	Ornitina Decarboxilase
P	Progesterona
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferase
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo Paraventricular
RNA	Ácido Ribonucléico
TH	Tirosina Hidroxilase
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central

Resumo

A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis. Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste da manipulação dos animais por alguns minutos, em geral durante as duas primeiras semanas de vida. Esse procedimento, aparentemente não nocivo ao indivíduo, tem como consequência na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas. Por exemplo, eles têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando expostos a estímulos estressores. Outros tipos de estimulação consistem em expor os filhotes ao frio (0°), à luz (60 Watts) e ao som (90 dB). Então, o período imediatamente após o nascimento é um período crítico no qual o sistema nervoso imaturo é alterado pelos hormônios esteróides adrenais e, também, conforme alguns autores por hormônios gonadais.

Trabalhos prévios mostraram que o estresse pré-natal e a manipulação neonatal diminuem o comportamento sexual em ratos machos e em fêmeas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da estimulação na fase neonatal sobre alguns parâmetros reprodutivos de ratas. Animais com cerca de três meses de idade e com três ciclos regulares tiveram, na fase estro do próximo ciclo, o comportamento sexual registrado e o número de óvulos contados. A regularidade do ciclo estral também foi acompanhada, assim como, o momento de instalação da puberdade.

Em conjunto nossos resultados demonstraram que a estimulação neonatal reduziu a capacidade reprodutiva de fêmeas como observado através da diminuição do comportamento sexual, ciclo estral anovulatório e retardo da instalação da puberdade.

Há indícios que os efeitos centrais dos estrógenos foram aparentemente alterados como demonstrado pela ausência de ovulação. Mas, os esteróides gonadais produzidos durante o período pré-ovulatório foram efetivos em relação aos seus efeitos periféricos, pois os animais apresentaram mudanças regulares na mucosa vaginal.

1. Introdução

1.1 Respostas ao estresse

Os seres vivos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, que é ameaçado quando os organismos são expostos a situações de perigo (CHROUSOS e GOLD, 1992). Nestas situações ocorre uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes, na tentativa de restabelecer a homeostasia. As respostas ao estresse classicamente conhecidas incluem a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular (PVN), de corticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal. A resposta do eixo HPA ao estresse é basicamente um mecanismo adaptativo em mamíferos (FRANCIS *et al.*, 1996).

Durante o estresse, o aumento da secreção de CRH e de peptídeos liberados em conjunto como a arginina vasopressina (AVP) e a ocitocina promovem o aumento da síntese e liberação de ACTH e β -endorfina pela adenohipófise (ANTONI, 1986). Já os elevados níveis de ACTH aumentam a síntese e a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal que em conjunto com as catecolaminas da medula da adrenal produzem lipólise, glicogenólise e catabolismo de proteínas. Dessa forma, estas catecolaminas induzem alterações em inúmeras funções vegetativas que dão o suporte necessário ao organismo para restabelecer o equilíbrio, e também mobilizam a produção e distribuição de substratos energéticos durante o estresse (KOPIN, 1995). Essas ações asseguram a manutenção do organismo durante situações adversas, por disponibilizar tais substratos.

A responsividade do eixo HPA ao estresse é, em parte, determinada pela habilidade dos glicocorticóides em regular a liberação de ACTH através de um sistema de retroalimentação negativa. Isto é, glicocorticóides circulantes atuam

sobre receptores de corticosteróides no sistema nervoso central (SNC) e inibem a responsividade do eixo HPA (FRANCIS *et al.*, 1996). Além da hipófise e de sítios hipotalâmicos, há evidências consideráveis sobre a importância do sistema límbico, do hipocampo, e do córtex frontal na regulação da atividade do eixo HPA (JACOBSON e SAPOLSKY, 1991). De fato, o hipocampo contém a maior densidade de receptores de corticosteróides no sistema nervoso (SN) (McEWEN *et al.*, 1986).

Durante o estresse, há também ativação do sistema nervoso simpático que libera adrenalina e noradrenalina (NA) nos terminais simpáticos e, pela medula da adrenal, na corrente sangüínea. Então, além da descarga periférica de NA, ocorre secreção difusa deste neurotransmissor em todo o sistema nervoso, sendo que grande parte da NA central secretada em resposta ao estresse origina-se no *locus coeruleus* (LC).

A ampla distribuição do CRH no Sistema Nervoso Central (SNC) sugere que esse peptídeo atue não só estimulando o eixo HPA, mas também como um neurotransmissor em regiões extra-hipotalâmicas, as quais estão envolvidas nas respostas do organismo a estímulos estressantes, como o núcleo central da amígdala, hipocampo, córtex cerebelar e LC (BLOOM *et al.*, 1982; KAWATA *et al.*, 1982; BUGON *et al.*, 1982). O envolvimento do LC nas respostas ao estresse é reforçado por dados que demonstram que nestas situações ocorre um aumento da expressão da proteína FOS, usada como marcador da atividade neuronal (CECATELLI *et al.*, 1989; CULLINAM *et al.*, 1995), bem como um aumento da expressão do RNA mensageiro (RNAm) para a tirosina hidroxilase (MELIA & DUMAN, 1991; MELIA *et al.*, 1990) neste núcleo. Através de suas vias, o LC emite ramificações difusas que inervam a maioria dos núcleos hipotalâmicos incluindo a região da eminência mediana, regiões septais e área pré-óptica (PALKOVITS, 1981; UNERSTALL *et al.*, 1984). Neurônios CRH no PVN além de controlar a atividade do eixo HPA, e de possibilitar ao CRH atuar em núcleos envolvidos com o estresse, como o LC, recebem entradas de muitas áreas do sistema nervoso, incluindo aferentes serotoninérgicos do núcleo da rafe, fibras peptidérgicas a partir do trato solitário, sistema límbico e estruturas prosencefálicas.

Além da ativação do eixo HPA com inúmeras conseqüências ao organismo, uma variedade de estressores causa mudanças na atividade de enzimas que sintetizam catecolaminas e nas concentrações de noradrenalina e adrenalina no tecido nervoso. Por exemplo, o estresse prolongado promove mudanças na atividade de enzimas como tirosina hidroxilase (TH), dopamina β -hidroxilase e feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT). Essas mudanças na atividade das enzimas são reguladas por vários glicocorticóides, ACTH e atividade neural. Por exemplo, quando ratos são submetidos a estressores psicossociais como competição por comida e espaço, além de apresentarem alterações em atividades enzimáticas, há mudanças na pressão sangüínea, no peso da adrenal e na concentração de catecolaminas na medula da adrenal. Neste caso, as enzimas TH e PNMT estão aumentadas no rato (AXEROLD e RESINE, 1984).

Então, torna-se importante salientar que a exposição continuada a altos níveis de glicocorticóides pode apresentar sérios riscos ao organismo, pois somada a uma supressão geral dos processos anabólicos, pode haver o desenvolvimento de várias patologias periféricas, como atrofia muscular, perda de sensibilidade à insulina (com risco de diabetes induzida por esteróide), hipertensão, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, amenorréia, imunossupressão e disfunção sexual (BRINDLEY e ROLLAND, 1989; MUNK *et al.*, 1984).

1.2 Estimulação neonatal e o desenvolvimento neural

Os mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento de determinados comportamentos são regulados por interações genéticas e ambientais. Portanto, uma experiência sensorial no início da vida pós-natal pode afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Dentre as influências ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural estão os vários tipos de estímulos estressantes que atuam sobre o organismo em desenvolvimento (GONZÁLES, *et al.*, 1990).

A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal (consideradas estressantes) afetam o desenvolvimento de sistemas neurais dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (LEVINE, 1962; DENEMBERG, 1964). Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste da "manipulação" dos filhotes por alguns minutos, em geral, durante as primeiras duas semanas de vida. Esse procedimento aparentemente não nocivo ao indivíduo tem como consequência na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo a ambientes novos. Além disso, sabe-se que esses animais quando adultos têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando expostos a estímulos estressores. Ou seja, ratos estimulados na infância apresentam uma secreção de corticosterona menor frente a novos estímulos estressantes (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do SNC ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (LEVINE, 1994).

As duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte de células ocorrem no sistema nervoso neste período (MISTRETTA e BRADLEY, 1978). Conseqüentemente, a estimulação precoce atua sobre o desenvolvimento deste sistema e induz uma variedade de mudanças neuroquímicas e comportamentais no adulto (GONZÁLES *et al.*, 1990). PFEIFER *et al.* (1976) demonstrou que a estimulação neonatal provoca uma diminuição na resposta da corticosterona quando os animais adultos são expostos a situações estressantes, como o choque nas patas. Portanto, a manipulação logo depois do nascimento pode causar efeitos tardios sobre a sensibilidade e adaptação ao estresse crônico. Além disso, a estimulação neonatal pode aumentar algumas características fisiológicas em ratos, como o ganho de peso corporal, tanto em machos como em fêmeas (GONZÁLES *et al.*, 1990).

Outros tipos de estimulação no período de amamentação incluem, por exemplo, expor os filhotes ao frio (0°C). Este tipo de estímulo pode evocar, em animais adultos, respostas típicas àquelas apresentadas por um organismo exposto a um estímulo estressante. Mas, no animal neonatal provoca apenas discreta ou nenhuma alteração dos hormônios clássicos do estresse como o ACTH e a corticosterona (WALKER *et al.*, 1986). Nessa fase as reações a estímulos ambientais são acompanhadas apenas por discreta elevação dos hormônios da adrenal, diferentemente do que acontece com os animais adultos (GOULD, 1994; LEVINE, 1994).

1.3 Período hiporresponsivo ao estresse

Estudos ontogênicos do eixo HPA em ratos, no período neonatal, mostram a existência nas duas primeiras semanas de vida de uma fase denominada período não responsivo ao estresse. Durante essa fase a resposta do HPA a estímulos nocivos é reduzida (HALTMEYER *et al.*, 1966; BARTOVA, 1968). Entretanto, a duração exata desse período é controversa, pois alguns pesquisadores mostram a partir do nascimento até a idade de dois dias (ZARROW *et al.*, 1967) medidas de corticosterona observadas após vários tipos de estresses.

Através de estudos *in vivo* e *in vitro* (GUILLET *et al.*, 1978) foi verificado que a hipófise e a adrenal são capazes de liberar ACTH e corticosterona, respectivamente, na fase tardia da vida fetal e no início do período neonatal. ACTH imunoreativo na hipófise e CRH na eminência mediana (BUGON *et al.*, 1982) foram detectados tanto no início, como no 17° e 18° dia de vida fetal, respectivamente. Essas evidências levaram alguns pesquisadores a estudar a responsividade do eixo HPA no rato durante parte do período neonatal (2-21 dias de idade) usando medidas diretas do ACTH presente na hipófise e CRH hipotalâmico. Durante esses estudos, eles concluíram que a exposição de ratos jovens a vários tipos de estresses não induziu um aumento significativo na secreção do ACTH durante as primeiras semanas de vida. Entretanto, todos os tipos de estressores testados foram capazes de disparar um

grau mensurável de liberação de corticosterona em todas as idades. Dentre os diferentes tipos testados, o estresse com éter foi o mais efetivo na produção de uma resposta de ACTH mensurável antes de 14 dias de idade. Essa observação sugere que em idades precoces a resposta para um estímulo pode ser específica ao estressor.

Os resultados indicaram que preferivelmente do que período não responsivo ao estresse, o período entre os dias 2 e 14 deveria ser chamado de hiporresponsivo, pois ratos jovens exibem aumentos modestos nos níveis de corticosterona plasmático (WALKER *et al.*, 1986). A imaturidade do eixo HPA durante as duas semanas de vida resulta de um embotamento da secreção de ACTH após a exposição a vários estressores. Contudo, foi observado que o CRH pode ser liberado em estágios iniciais da vida, ligando-se em seus receptores na hipófise e promovendo a liberação de ACTH. Então, sugere-se que o período hiporresponsivo ao estresse, no rato, seria devido a uma falta de habilidade da maioria dos estressores a induzir a liberação de CRH na circulação porta, de maneira suficiente para superar o aumento da sensibilidade da hipófise ao sistema de retroalimentação negativa de glicocorticóides (WALKER *et al.*, 1986).

Durante a fase na qual as respostas ao estresse estão diminuídas, tanto as estimulações aparentemente "inofensivas" como a manipulação quanto estímulos estressores como frio e choque elétrico induzem, praticamente, as mesmas alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (para revisão ver LEVINE, 1994). Dessa forma, os grupos de pesquisa que trabalham nessa área consideram os estímulos a que os animais são submetidos no período neonatal apenas como estimulação sensorial, não os caracterizando como estressores, mesmo que assim o sejam considerados num animal adulto (LEVINE, 1994). Argumenta-se que seria muito difícil caracterizar a percepção de um estímulo por dois organismos tão diferentes.

1.4 A relação mãe – filho e o desenvolvimento neural

Há uma considerável quantidade de trabalhos (para uma revisão ver LEVINE, 1994) mostrando que a manipulação ou qualquer outro tipo de estimulação do

animal no período neonatal provoca um distúrbio da relação mãe-filho. As mães de filhotes manipulados lambem mais sua prole do que mães de filhotes não manipulados. Sabe-se, por outro lado, que o comportamento da mãe em relação ao filhote (lamber o corpo do filhote, por exemplo) afeta o desenvolvimento do SN deste (LEVINE, 1994). Assim, postula-se que seria a perturbação dessa relação que induziria o padrão comportamental e endócrino observado na vida adulta do rato manipulado no período neonatal.

O relacionamento entre a mãe e o filhote é crítico para o crescimento e desenvolvimento comportamental em muitas espécies de mamíferos, incluindo ratos, gatos, cachorros, macacos e humanos. O distúrbio dessa interação promove uma série de respostas comportamentais e fisiológicas que incluem mudanças na temperatura corporal, na locomoção, na frequência cardíaca e na "reação emocional" (HINDE e SPENCER-BOOTH, 1971; HOFER, 1970). Também há um retardamento do crescimento físico e do desenvolvimento comportamental quando comparados com animais cuja relação com indivíduos adultos da mesma espécie ocorreu de forma normal na infância. Por exemplo, o comportamento de macacos é extremamente anormal se eles são impedidos de manter o contato físico com a mãe, mesmo quando as interações visual, auditiva e olfatória são mantidas (HARLOW e ZIMMERMAN, 1959).

SCHANBERG e KUHN (1985) demonstram que além de mudanças fisiológicas há alterações bioquímicas em animais que sofreram privação maternal. O índice bioquímico de maturação do tecido está diminuído durante a separação da mãe e mesmo quando os filhotes são mantidos com a mãe anestesiada, indicando que a estimulação tátil pela mãe é necessária para manter a atividade de determinadas enzimas relacionadas com o crescimento. Foi observado que ratos separados da mãe apresentam uma diminuição da atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) e de seus produtos no sistema nervoso, coração e fígado. A ODC é uma enzima limitante na síntese de poliaminas que estão envolvidas na regulação da síntese de ácido nucléico e de proteínas. Sua atividade e a concentração de seus produtos são altas em tecidos com uma elevada taxa de crescimento e síntese de proteína. Conseqüentemente a atividade da ODC é vital para o crescimento e

desenvolvimento normal (KUHN e SCHANBERG, 1998), por isso sua atividade serve como um índice acurado e sensível ao crescimento e desenvolvimento celular. SCHANBERG e KUHN (1985) sugerem que também há mudanças em concentrações hormonais correlacionadas com essas respostas.

A resposta endócrina de ratos à separação materna é similar àquela observada em humanos, com exceção da secreção do hormônio de crescimento (GH) que é geralmente aumentada em resposta ao estresse agudo nos seres humanos adultos, mas que nos ratos é diminuída. Observa-se que a regulação neural da secreção de hormônios a partir da hipófise anterior em mamíferos neonatos é consideravelmente diferente daquelas observadas em animais adultos (DOHLER e WUTTKE, 1974).

Conforme FRANCIS *et al.* (1996) a estimulação pós-natal aumenta a expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal, ou seja, duas regiões que estão envolvidas na regulação, através de um sistema de retroalimentação, da atividade do eixo HPA. Mas, em períodos de separação materna mais prolongada, por cerca de 180 minutos, produzem uma diminuição da concentração dos receptores de glicocorticóides no hipotálamo, córtex frontal, e hipocampo (LIU *et al.*, 1997). Isto sugere que a diferenciação dos sistemas de receptores para glicocorticóides em determinadas regiões do SN são sensíveis a uma variedade de sinais ambientais durante o período pós-natal. Esses sinais podem atuar aumentando ou diminuindo a expressão de receptores para glicocorticóides em estruturas neurais específicas que regulam a síntese de CRH e AVP em neurônios do PVN.

Então, o ambiente na fase neonatal pode determinar a responsividade do eixo HPA ao estresse por toda a vida do animal, refletindo a plasticidade neural desse sistema no início do período pós-natal.

1.5 Função reprodutiva e sistema nervoso

A função endócrina das gônadas concerne primariamente à manutenção da vida, e ao bem estar da espécie. Durante a evolução da reprodução sexuada foi

necessário o desenvolvimento de padrões complexos da função gonádica. Esses padrões dizem respeito ao desenvolvimento, à maturação e à nutrição das células germinativas individuais masculinas e femininas, à sua união bem sucedida e ao crescimento e desenvolvimento subsequente do novo indivíduo. O processo da diferenciação sexual, isto é, o padrão do desenvolvimento das gônadas, ductos genitais e da genitália externa, produz diferenças fundamentais entre os gêneros (GENUTH, 1996).

Em organismos simples, a reprodução pode ocorrer na presença de um indivíduo apenas, mas em sistemas biológicos mais complexos, este processo necessita da interação de dois organismos que diferem um do outro em relação ao que chamamos de sexo (NAFTOLIN, 1981). Durante a concepção é estabelecido o sexo cromossômico através do gameta masculino, o espermatozóide, que contribui com um cromossoma X ou Y (GORSKI, 2000). As diferentes características reprodutivas que incluem o comportamento e fenótipo sexual, o padrão de secreção hormonal e produção de gametas férteis, refletem a diversidade de adaptações biológicas as quais todos os seres vivos estão expostos. Essa diversidade abrange desde a ovulação reflexa à espontânea, assim como, a fertilização externa e interna.

Os dois sexos interagem de tal modo para manter a eficiência reprodutiva que ambos possuem uma sincronização biológica durante o desprendimento dos gametas que, possivelmente, poderão unir-se e formar um novo indivíduo. A fêmea, periodicamente, desprende um ou mais gametas de um número finito e essas ovulações são produtos de eventos integrados que ocorrem no ovário (gônada feminina) e estão de acordo com o seu processo sexual. Já o macho contribui estando constantemente disposto para o sexo, assim como produzindo gametas férteis (NAFTOLIN, 1981).

O padrão intrínseco do desenvolvimento do SNC é organizado ao longo de linhas que são apropriadas para o sexo homogamético. No sexo heterogamético, a via de diferenciação a partir desse padrão ocorre como resultado dos hormônios produzidos pelas gônadas. Então, nos mamíferos o padrão intrínseco é o feminino, no qual o ovário secreta estrogênio; já a diferenciação do padrão masculino de

secreção das gonadotrofinas resulta de uma exposição aos hormônios do testículo (gônada masculina), principalmente a testosterona, durante o desenvolvimento (MACLUSKY e NAFTOLIN, 1981).

No adulto, os esteróides gonadais atuam primariamente nas respostas sexuais. Mas, no tecido nervoso em desenvolvimento no qual tanto o genótipo masculino quanto o feminino são compatíveis com o genótipo do sistema nervoso, o que reflete o seu estado indiferenciado e bipotencial, os esteróides gonadais criam um determinado roteiro que na idade adulta leva à expressão de comportamentos sexuais específicos à estimulação hormonal (GORSKI, 2000).

1.6 O ciclo ovariano da rata

Animais de ambos os sexos secretam dois hormônios estimulantes das gônadas (gonadotrofinas) a partir da hipófise anterior: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Nos machos, estes hormônios são secretados em nível constante. Nas fêmeas, há picos que estão subjacentes às atividades cíclicas do ovário (FREEMAN, 1994). A secreção cíclica de gonadotrofinas pela hipófise não depende diretamente do sexo genético, mas principalmente da ausência de androgênio durante o período perinatal (GORSKI, 2000).

Muito do conhecimento que possuímos sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o controle do ciclo estral da rata. 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 (MATTHEWS e KENYON, 1984) em cada período, exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas. Também, associada a essas mudanças cíclicas é possível observar alterações comportamentais. Por exemplo, no estro comportamental a fêmea apresenta um "desejo sexual", isto é, ela está pronta para o coito. É durante essa fase, mais precisamente na manhã do estro que ocorre a ovulação, esse período dura de 25 a 27 horas. Os períodos entre estros são

denominados proestro, metaestro e diestro. A fase proestro dura 12 a 14 horas e precede o estro. Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro (ou diestro I) cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro (ou diestro II) que dura 55 a 57 horas, quando começa a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo; segue-se a esta fase um novo proestro (FREEMAN, 1994).

Devido as dificuldades inerentes à complexidade dos mecanismos que controlam as variações hormonais cíclicas em fêmeas, a maioria dos estudos sobre mecanismos fisiológicos em geral é realizada em animais machos. O modo tônico de liberação da testosterona facilita o entendimento dos mecanismos fisiológicos em machos. Ao contrário, para se estudar o organismo feminino é necessário o acompanhamento das fases do ciclo estral. Essa complexidade e conseqüentes dificuldades contribuem para o pouco esclarecimento sobre os eventos fisiológicos que controlam a reprodução nas fêmeas (ANSELMO-FRANCI, *et al.*, 1999b).

Apesar de toda a complexidade fisiológica relacionada ao ciclo estral, é necessário compreendermos tal evento para que possamos evoluir no estudo sobre os processos fisiológicos envolvidos com a reprodução feminina. Com isso, o conhecimento atual sobre o ciclo ovariano de mamíferos que ovulam espontaneamente baseia-se principalmente em estudos realizados em ratas por ser o rato um animal que possui uma fácil adaptação ao ambiente de biotério e cujo tamanho pequeno facilita o manuseio. Dessa forma, o presente trabalho utilizou a rata como um modelo de estudo para verificar o efeito da estimulação no período neonatal sobre os processos reprodutivos de fêmeas.

Durante o ciclo ovariano da rata ocorre a secreção de um hormônio considerado um dos maiores estímulos luteotróficos que inicia e mantém a secreção de progesterona (P) pelo corpo lúteo, a prolactina (PRL) (SMITH *et al.*, 1975). Embora FREEMAN *et al.* (1974) tenham verificado concentrações elevadas desse hormônio em ratas no início e durante a pseudoprenhez, estabelecida através da estimulação cervical, e esses aumentos estavam associados com a elevação na secreção de progesterona indicando um resgate do corpo lúteo na pseudoprenhez, MADHWA e MOUDGAL (1970) já tinham definido o LH como o principal hormônio

luteotrópico, enquanto a PRL foi considerada de menor importância. Esses dois pesquisadores basearam suas conclusões no fato de que o anticorpo para o LH induziu aborto quando administrado do dia 07 ao dia 11 de prenhez da rata.

A secreção de progesterona pelo corpo lúteo no ciclo inicia na tarde do diestro I e alcança valores elevados de 25-30 ng/ml no início da manhã do diestro II. Após, os valores caem para 5-10 ng/ml, permanecendo assim até a tarde do proestro quando ocorre o pico do LH (FREEMAN *et al.*, 1994). Sabe-se que esse esteróide pode inibir ou facilitar o pico de LH induzido pelo estrógeno durante o ciclo estral da rata (ATTARDI, 1984). O efeito inibitório é identificado pelo fato de confinar o pico de LH ao dia do proestro (FREEMAN *et al.*, 1976; GOODMAN, 1978), enquanto o efeito estimulatório aumenta a magnitude do pico e sincroniza seu horário (Goodman, 1978; CALIGARIS *et al.*, 1971). Estudos fisiológicos indicam que a progesterona pode atuar no hipotálamo e hipófise para facilitar a liberação de LH, já que ela produz um aumento nas concentrações do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) na eminência mediana e no núcleo arqueado do hipotálamo cerca de 01-04 horas após a sua administração em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (SIMPKINS *et al.*, 1980). Já no macaco *rhesus*, a progesterona parece atuar exclusivamente na hipófise para facilitar a liberação de gonadotrofina (WILDT *et al.*, 1981).

Conforme SMITH *et al.* (1975) padrões de secreção de PRL, LH e FSH são similares, durante a maior parte do ciclo estral. As concentrações permanecem baixas e não mudam até à tarde e início da noite do proestro (**figura 1**). A PRL inicia um aumento a partir de seus valores basais de 10 ng/ml às 11 horas do proestro e alcança valores elevados de 70 ng/ml às 17 horas do proestro. Esses níveis declinam aos valores basais às 07 horas do estro. O pico de LH no proestro é similar ao da PRL exceto pelo fato de que o primeiro aumento no LH é observado às 15 horas. Valores máximos de 35-40 ng/ml ocorrem às 17 horas do proestro, com a concentração de LH retornando ao basal (0,5 ng/ml) às 7 horas do estro. O aumento inicial na secreção de FSH na tarde do proestro é coincidente com o do LH (**figura 1**).

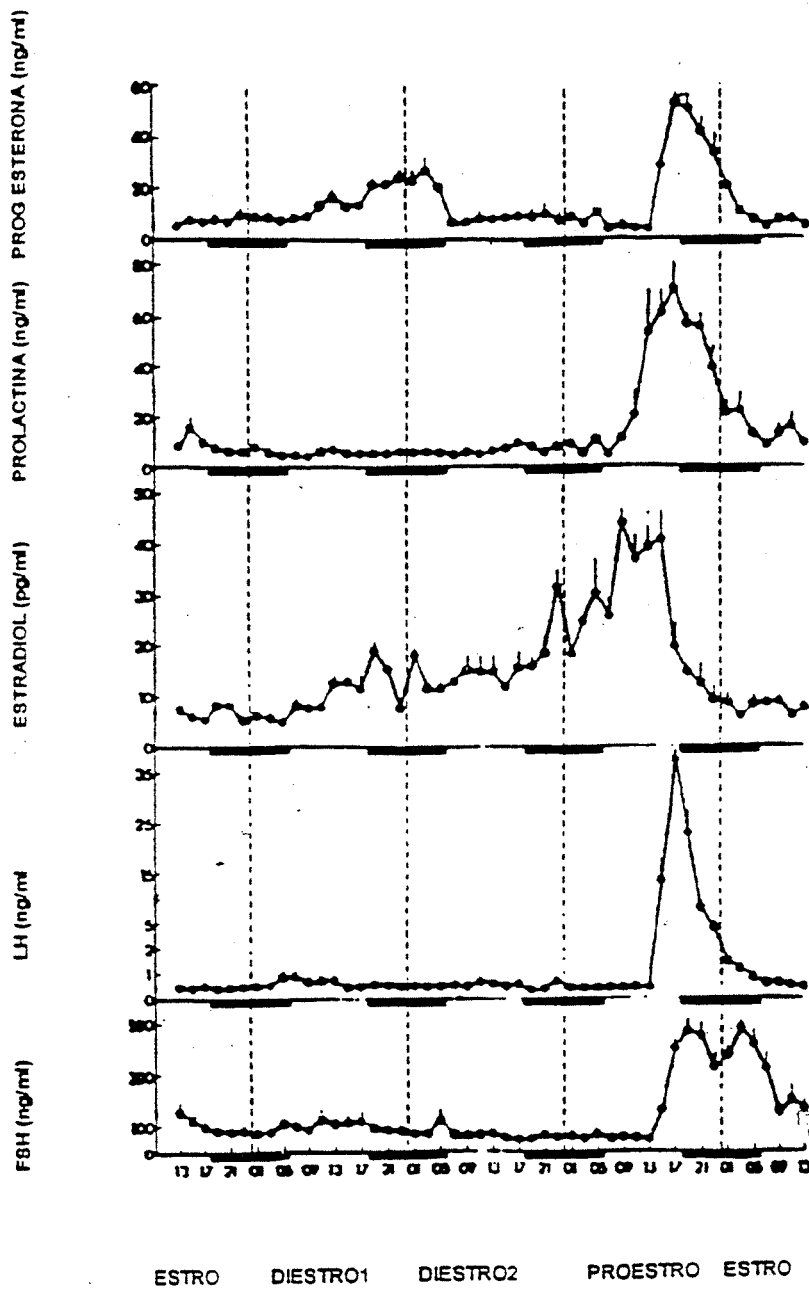


Figura1: Concentrações plasmáticas (médias \pm erro padrão) de PRL, progesterona (P), estradiol (E), LH e FSH obtidas em intervalos de 2 horas nos quatro dias de ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (em: SMITH *et al.*, 1975).

1.7 A função reprodutiva na rata

Sendo a procriação um processo complexo no qual eventos fisiológicos e comportamentais devem ocorrer de modo sincrônico para haver a produção e liberação de gametas, torna-se necessário a presença de mecanismos neurais e endócrinos íntegros participando deste fenômeno. Se tais mecanismos estiverem abalados, possivelmente aqueles comportamentos relacionados com a preservação da espécie estarão comprometidos. Conforme McEWEN 1981, dentre os comportamentos dependentes dos hormônios gonadais podemos citar a corte, o acasalamento e a defesa de território, incluindo a vocalização.

Dentre os hormônios, o estrógeno é fundamental para coordenar e regular muitos aspectos da reprodução por alterar a função de certas populações neuronais em regiões anatomicamente diferentes no sistema nervoso de ambos os sexos (SHUGHRUE *et al.*, 1992) e conforme RASIA-FILHO *et al.* (1999), hormônios gonadais podem afetar a morfologia de neurônios em ratos machos adultos, por exemplo, no núcleo amigdalóide medial que possui receptores para estes hormônios e é uma área sexualmente dimórfica em ratos. Através de estudos neuroanatômicos foi possível detectar grupamentos celulares no sistema nervoso de machos e fêmeas que diferem no tamanho, indicando ações distintas dos esteróides gonadais sobre a morfologia e a função dos sistemas neurais em ambos os sexos. Baseados nessas descobertas foram intensificadas as pesquisas sobre a localização de receptores para esteróides gonadais, no tecido nervoso, através da técnica de autoradiografia (STUMPF, 1968). Neurônios sensíveis ao estrógeno foram encontrados predominantemente na área pré-óptica medial do hipotálamo, no hipotálamo tuberal, em regiões límbicas como a amígdala e parte do mesencéfalo e córtex cerebral (KATO e VILLE, 1967). SHUGHRUE e colaboradores (1992) demonstraram que a concentração do RNA mensageiro para o receptor de estrógeno muda durante o ciclo estral, assim como ocorre expressão diferencial no sistema nervoso. Essa expressão diferencial e as mudanças ao longo do ciclo estral poderiam determinar a instalação do comportamento reprodutivo e o período da ovulação.

Durante o ciclo estral a concentração de estrógeno permanece nos valores basais de 07 pg/ml apenas no estro. No metaestro (diestro I), mais precisamente às 13 horas, os níveis de estrógeno aumentam para aproximadamente 15-20 pg/ml. Essas concentrações são mantidas até à tarde do diestro, quando os níveis aumentam para chegar aos maiores valores de 40-50 pg/ml no proestro. A concentração de estrógeno então declina em relação à secreção de LH, PRL e progesterona alcançando os valores basais no estro (**figura 1**)(SMITH *et al.*, 1975).

Como citado anteriormente, o estro comportamental é o período em que a rata está pronta para o coito. A característica mais proeminente do comportamento verificado nesta fase é a postura para a cópula assumida pela fêmea que é denominada de lordose e refere-se à curvatura espinhal. Quando estimulada sobre ou perto dos flancos, a rata em estro exibe tal comportamento, ou seja, arqueia o dorso e fica completamente imóvel para auxiliar a inserção peniana do macho. Na ausência da lordose a intromissão e ejaculação são impossíveis (PFAFF *et al.*, 1980). Há receptores sensoriais nos flancos e no períneo da fêmea que, quando estimulados, levam a informação através de neurônios sensoriais responsivos à pressão até a parte dorsal da medula espinhal. A partir daí ela é enviada para a formação reticular e mesencéfalo. A conexão do tronco encefálico com fibras descendentes da região cinzenta central do mesencéfalo permitirá a lordose apenas quando os hormônios esteróides sexuais (como o estradiol) estão disponíveis aos neurônios do mesencéfalo ou à células do núcleo ventromedial do hipotálamo (PFAFF *et al.*, 1994).

Os efeitos facilitatórios sobre o comportamento sexual na rata e na cobaia ocorrem por ação da progesterona, e isto está relacionado com a distribuição dinâmica de seus receptores no hipotálamo. Conforme MOGUILLEWSKY e RAYNAUD (1979), em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, a indução de receptores citoplasmáticos de progesterona ocorre junto com a indução da lordose.

1.8 Estresse e a função reprodutiva

MEANEY *et al.*, (1993) e SAPOLSKY (1994) observaram que ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores para glicocorticóides no hipocampo. Postula-se que essa seria a causa das diferenças entre animais estimulados e não estimulados na infância quando submetidos ao estímulo estressor na vida adulta (MEANEY *et al.*, 1994; BHATNAGAR e MEANEY, 1995).

Além de alterações na expressão gênica do receptor para glicocorticóide, em animais adultos, a exposição crônica ao estresse ou a elevados níveis de glicocorticóides interrompem o padrão normal da secreção de gonadotrofinas, desincroniza o ciclo estral e diminui a receptividade sexual na rata (RIVER e VALE, 1984; KAMEL e KUBAJAK, 1987; PLAS-ROSER e ARON, 1981, ARMSTRONG, 1986). Sendo assim, o estresse pode inibir a função reprodutiva e esse efeito tem sido observado através da diminuição da secreção de gonadotrofinas. Por exemplo, a exposição ao éter promove um aumento na secreção de ACTH e corticosterona, mas diminui a concentração do LH e FSH em ratas (TOHEI *et al.*, 1997). Assim também a exposição à natação forçada e ao ruído intenso também levam à diminuição das concentrações plasmáticas de hormônios hipofisiários como o GH, LH e o FSH, e a um aumento das concentrações de PRL e TSH. Essas modificações nas concentrações plasmáticas indicam que os hormônios hipofisiários podem alterar-se em resposta ao estresse (ARMÁRIO *et al.*, 1986; ONO *et al.*, 1985).

GONZÁLES *et al.* (1994), sugerem que a manipulação neonatal afetaria não apenas o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (LIU *et al.*, 1997; PLOTSKY e MEANEY, 1993), mas também o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Também foi demonstrado que tanto o estresse pré-natal (WARD, 1994) quanto à estimulação neonatal (FRANTZ *et al.*, 1998; LUCION *et al.*, 1997) pode diminuir o comportamento sexual em machos e em fêmeas.

O CRH tem sido proposto como um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse através de uma ação no hipotálamo, inibindo a secreção do GnRH (CARATY *et al.*, 1997). O GnRH é um peptídeo chave que controla a

secreção de gonadotrofinas, principalmente do LH e portanto a função gonadal. Esse hormônio hipotalâmico é liberado de modo pulsátil e, na fêmea, a sua frequência e amplitude variam durante os estágios reprodutivos nas diferentes espécies. Sinais centrais e periféricos modulam a atividade dos neurônios GnRH. Alguns desses sinais são estimulatórios para a sua liberação como a norepinefrina e o neuropeptídeo Y (NPY); e alguns são inibitórios, como a beta-endorfina e a interleucina-1.

Portanto, o eixo HPA e o reprodutivo são controlados por aferentes noradrenérgicos. Alguns trabalhos sugerem que os estrógenos não podem atuar diretamente sobre neurônios GnRH, mas podem aumentar a atividade de neurônios noradrenérgicos (ANSELMO-FRANCI e OLIVEIRA, 1996; JENNES, MOORE *et al.*, 1992). De fato, a ativação dos núcleos noradrenérgicos A1, A2 e A6 do LC tem estado relacionado ao estrógeno e à secreção de GnRH. Também, a concentração de estradiol durante o ciclo estral está associada com a expressão da proteína FOS no núcleo A1 (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 na hipófise anterior (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997; JONES e MOORE, 1977). PLOTSKY (1987) demonstrou que lesões eletrolíticas do LC na manhã do proestro reduzem o conteúdo de noradrenalina na área pré-óptica-medial do hipotálamo e hipotálamo médio basal bloqueando o pico de gonadotrofinas e, portanto a ovulação. Sabe-se que durante o período pré-ovulatório, em espécies com ovulação espontânea ou, no coito em animais com ovulação induzida, o GnRH é liberado como uma onda devido ao aumento nos níveis de esteróides circulantes (estrógeno e progesterona) (PAU e SPIES, 1997). Por outro lado, experimentos que utilizam a técnica de microdiálise têm demonstrado que a estimulação dos núcleos A1 e A2 aumenta a concentração de noradrenalina na área pré-óptica, que é o sítio de síntese do GnRH (GAILLET *et al.*, 1993).

Ratas mostram uma maior liberação de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse (GAILLET *et al.*, 1993; GUILLET e MICHAELSON, 1978). Essas diferenças sexuais não permanecem após a ovariectomia e são restabelecidas após a administração

de estradiol (JOANNY *et al.*, 1989) sendo que esses níveis são ainda mais altos durante a fase proestro do ciclo estral da rata (VIAU e MEANEY, 1991).

Foi verificado que ratos submetidos à gonadectomia na fase neonatal, quando adultos apresentam níveis elevados de corticosterona em resposta ao estresse se comparados com animais intactos. Isso sugere que os hormônios sexuais presentes no período neonatal influenciariam a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) de animais adultos (MACCORMICK *et al.*, 1998). A ação dos esteróides gonadais no animal neonato modifica o padrão e, provavelmente, a quantidade de secreção hormonal no adulto. Alterações no estado hormonal nessa fase tem efeitos profundos e tardios sobre o funcionamento biológico subsequente (LEVINE e MULLINS, 1966).

Por exemplo, a maturação sexual de ratas é observada através da época em que ocorre a abertura vaginal (SWANSON *et al.*, 1984). Esse momento de instalação da puberdade varia entre as diferentes espécies de ratos e é controlado por fatores genéticos (MANDL e ZUCKERMAN, 1952) e pode ser drasticamente alterado quando os animais são expostos ao frio, como em situações de separação maternal (SWANSON *et al.*, 1984). Conforme MANDL e ZUCKERMAN (1952) ratas albinas expostas ao frio e a uma "forte" manipulação durante o período considerado adequado para a ocorrência da abertura vaginal, apresentam uma instalação prematura da puberdade.

Então, conforme SIECK e RAMALEY (1975) a manipulação no início da vida pós-natal pode interferir também em processos relativos ao desenvolvimento sexual, como a instalação da puberdade. Isso ocorre devido a um impacto significativo sobre o sistema endócrino provocado pela manipulação e/ou por um estímulo como a mudança do material que compõe o ninho. MORTON *et al.* (1962) mostram que essa estimulação neonatal pode atrasar, adiantar ou não ter efeito sobre o momento de início da puberdade dependendo da frequência na qual os ratos são manipulados, da intensidade dessa manipulação e do tempo gasto no procedimento.

Com isso, os mecanismos endócrinos envolvidos com os processos reprodutivos femininos desde a instalação da puberdade até a execução do comportamento

sexual, que é observado através do índice de lordose executada pela fêmea sobre o comportamento de monta apresentado pelo macho, são influenciados pela estimulação neonatal ou pela separação maternal. Mas, independente da origem precisa (manipulação neonatal ou separação maternal), a presença de alterações comportamentais e neuroendócrinas induzidas por estimulação sensorial neonatal que se manifestam durante a puberdade (SIEK e RAMALEY, 1975) e vida adulta, também podem influenciar a preservação da espécie através de mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito da estimulação neonatal sobre alguns processos reprodutivos de rata.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1) Verificar o efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento sexual de ratas.

2.2.2) Verificar o efeito da estimulação neonatal sobre a ovulação.

2.2.3) Verificar o efeito da estimulação neonatal sobre a instalação da puberdade.

2.2.4) Verificar o efeito da estimulação neonatal sobre a regularidade do ciclo estral.

3. Material e Métodos

3.1 Experimentos

Este trabalho está dividido nos seguintes experimentos:

Experimento 1: Comportamento sexual

Experimento 2: Contagem do número de óvulos

Experimento 3: Instalação da puberdade

Experimento 4: Análise do ciclo estral

3.2. Animais

Foram utilizadas ratas da variedade Wistar, que na maioria dos experimentos tinham cerca de três meses de idade e peso corporal entre 200 e 250g, com exceção do experimento da instalação da puberdade, em que foram utilizados animais com idade a partir de 25 dias. Todos os animais tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos num ciclo claro-escuro de 12:12 horas. No experimento do comportamento sexual o início do ciclo escuro era às 14:30 horas e nos outros experimentos às 18 horas.

No experimento de comportamento sexual também foram utilizados ratos machos com cerca de três meses de idade, peso corporal entre 250 e 300g e fêmeas com cerca de dois meses de idade, peso corporal entre 250 e 270g.

Independente do grupo ao qual pertenciam, as ratas permaneceram com a mãe até a idade de 21 dias, período no qual eram separadas dos machos e colocadas em caixas 31x 34x 17 cm com grupo de 2-4 animais. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

3.3 Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos:

Não estimulados (controle): Animais que não receberam nenhum estímulo estressante por parte do pesquisador durante o período neonatal.

Estimulados: São os animais que passaram por processos de estimulação no período neonatal. Essa estimulação era realizada nos dez primeiros dias de vida pós-natal, sendo que o dia do nascimento era considerado como dia zero. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes, e antes da realização da estimulação, a caixa residência com os filhotes e a mãe era retirada do biotério e levada a uma sala anexa a este, com o mesmo fotoperíodo e temperatura, onde eram realizados os procedimentos de estimulação. Após, os filhotes eram devolvidos ao ninho e a caixa levada ao biotério.

Tipos de estimulação:

Manipulação: Os filhotes eram separados da mãe, que permanecia em uma caixa ao lado, para serem gentilmente manipulados pelo pesquisador que utilizava luvas de látex, todos juntos, acima do ninho, logo sendo recolocados com a mãe. O tempo total de separação da ninhada da mãe e a devolução dela aos filhotes levava em torno de dois minutos. A manipulação era realizada por um minuto, diariamente e em horários alternados.

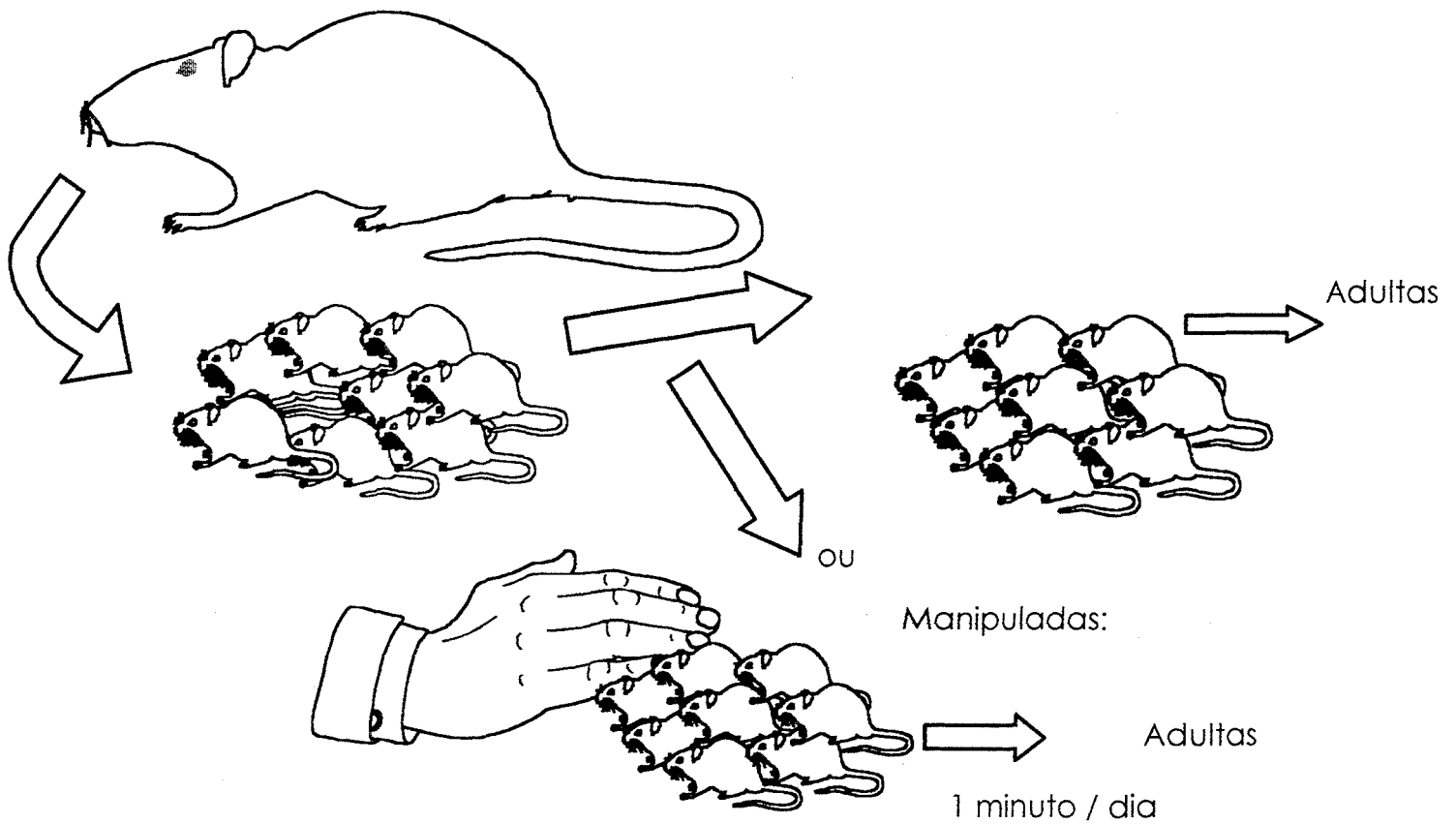


Figura 2: Modelo de manipulação neonatal

O procedimento de manipulação neonatal foi definido do modo como descrito em trabalhos clássicos sobre estimulação por manipulação (DENENBERG, 1964; ARDER *et al.*, 1968; HESS *et al.*, 1969).

Estimulação Aversiva: Estresse

Os estímulos descritos a seguir eram realizados na mesma ninhada, durante dez minutos, em dias alternados e consistiram de:

Luz: Os filhotes eram retirados do ninho e colocados em uma caixa sob a luz de uma lâmpada de 60 Watts.

Som: Os filhotes eram retirados do ninho e colocados em uma caixa para serem levados a uma sala com mesmo fotoperíodo e temperatura do biotério onde eram expostos a um som de 90 decibéis.

Frio: Os filhotes eram retirados do ninho e colocados em um recipiente e expostos ao frio de 0°C.

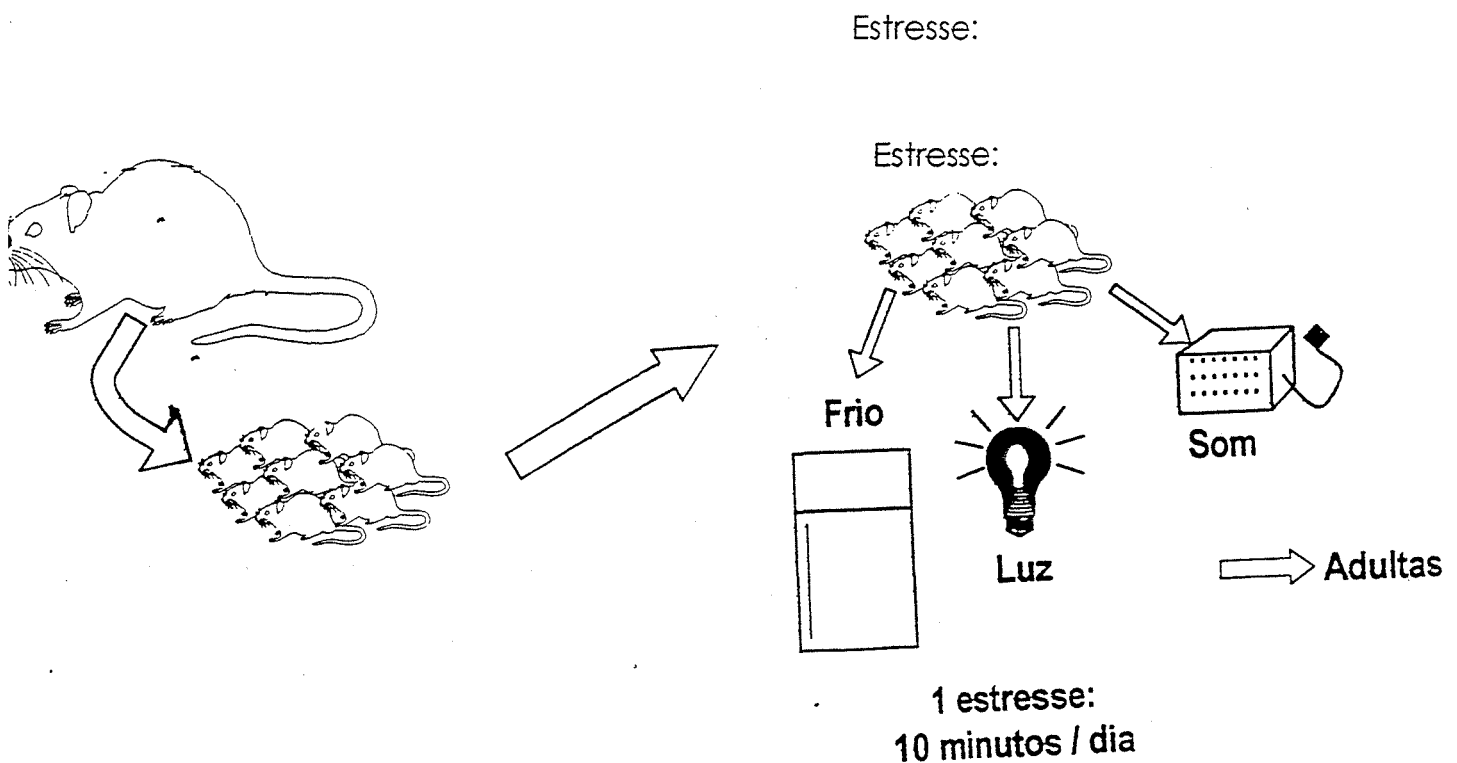


Figura 3: Modelo de estresse neonatal

3.4 Experimento 1: Comportamento sexual

Este experimento teve como objetivo verificar o comportamento sexual através da medida do quociente de lordose (índice de lordose/monta) exibido pela fêmea em estro quando colocada com um macho sexualmente ativo. Foram utilizadas 70 ratas divididas em três grupos:

Não estimuladas (N=24)

Manipuladas (N=24)

Estressadas (N=22)

3.4.1) Seleção de ratos machos sexualmente ativos:

Ratos machos foram colocados em caixas de ambientação com 20 x 50cm, com fêmeas (duas/macho) e foram mantidos assim durante quinze dias a fim de adquirirem experiência sexual. Após este período, as fêmeas foram retiradas das caixas e os ratos permaneceram sozinhos por mais sete dias (período de abstinência sexual). Passado o período de três semanas, estes ratos foram testados em seu desempenho sexual.

O teste do desempenho sexual consistiu em avaliar durante dez minutos o comportamento do macho perante uma fêmea. As fêmeas utilizadas para este teste apresentavam as mesmas características das anteriores quanto à variedade, peso e idade, e foram submetidas à retirada dos ovários. Dez dias após a ovariectomia, foram induzidas à receptividade sexual por injeções intramusculares de benzoato de estradiol (benzo-ginoestril ap® 5mg - SARSA, RJ) na dose de 2 µg/rata, 48 horas antes do teste, e progesterona-butilacetato de estradiol (ginecoside® 53mg - Darrow, RJ) na dose de 500 µg/rata, 6 horas antes do teste (Mas e col., 1987). Os machos que, ao serem colocados com as fêmeas, apresentavam mais de seis intromissões penianas no período de dez minutos foram considerados como sexualmente ativos e separados para serem submetidos ao experimento de verificação do quociente de lordose exibido por ratas em estro estimuladas e não estimuladas no período neonatal.

3.4.2) Seleção de fêmeas em estro

Fêmeas com cerca de 70 dias de idade tiveram o acompanhamento do ciclo estral através de esfregaço vaginal realizado diariamente às 9 horas da manhã para posterior análise através de um microscópio. Aquelas que apresentavam três ciclos regulares e que no próximo ciclo estavam na fase estro eram selecionadas para o experimento.

3.4.3) Registro Comportamental:

Para o registro do comportamento sexual, os ratos foram colocados em caixas de observação com dimensões de 70 x 70 x 35 cm cujas paredes eram de aço com exceção da parede frontal que era de vidro, o que permitia ampla visualização dos animais. O chão das caixas de observação, assim como o das caixas de ambientação, era coberto com maravalha.

Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 14:30 horas. A temperatura foi mantida constante em torno de 22-24°C. Os animais tinham livre acesso à água e comida durante todo o experimento, menos na fase de registro do comportamento. A sala era mantida com sonoridade controlada.

Em todo o experimento, o registro foi realizado de uma a seis horas após início da fase escura. Inicialmente, a fêmea era retirada da caixa onde estava ambientada para ser colocada na caixa de observação por um período de dez minutos para adaptação ao novo ambiente. Após este intervalo, o macho era colocado com a fêmea na caixa de observação iniciando-se, imediatamente a seguir, a sessão de registro do comportamento sexual que durava dez minutos para os comportamentos de monta exibidos pelo macho e de lordose pela fêmea.

O registro consistiu em filmar os animais com uma filmadora de vídeo. Ao término do registro, este era visualizado com o auxílio de um aparelho de vídeo por um observador treinado que digitava, num microcomputador com programa especialmente elaborado, uma tecla selecionada para cada comportamento à medida que este ocorria. O programa computava a frequência, a latência e a

duração de cada comportamento. A frequência era o número de vezes que cada comportamento ocorria durante o registro. A latência era o tempo em segundos transcorridos desde o início da sessão até a primeira vez que o comportamento ocorria. A duração foi caracterizada como o tempo total de ocorrência de um comportamento específico.

3.4.4) Parâmetros comportamentais analisados:

Frequência de lordose: número de vezes que a fêmea eleva a parte traseira do dorso para o macho montar.

Frequência de monta: número de vezes que o macho usa as patas dianteiras para agarrar a fêmea pelos flancos.

3.5 Experimento 2: Contagem do número de óvulos

Este experimento consistiu em contar o número de óvulos presentes nos ovários de fêmeas durante a manhã da fase de estro do ciclo estral. Foram utilizadas 21 ratas divididas em dois grupos:

Não-estimuladas (N=10)

Manipuladas (N=11)

3.5.1) Seleção de animais para o experimento:

Fêmeas com cerca de 70 dias de idade tiveram o acompanhamento do ciclo estral através da coleta de secreção vaginal realizada diariamente às 9 horas da manhã para posterior análise através de um microscópio. Aquelas que apresentavam três ciclos regulares e que no próximo ciclo estavam na fase estro eram selecionadas para o experimento.

3.5.2) Procedimento cirúrgico:

Às 9 horas da manhã do estro, os animais foram anestesiados com tiopental (40mg/Kg) intraperitoneal (ip) e tiveram os ovários removidos. Os ovidutos foram dissecados e colocados entre duas lâminas.

3.5.3) Contagem do número de óvulos

A contagem dos óvulos de ambos ovidutos foi realizada com o auxílio de um microscópio utilizando um sistema de duas lâminas colocadas paralelamente que permitia comprimir os ovidutos.

3.6 Experimento 3: Instalação da puberdade

Este experimento teve como objetivo registrar o dia em que ocorre o início da puberdade em fêmeas. O parâmetro utilizado para determinar a instalação da puberdade foi o dia da abertura vaginal, já que este é um indicativo de maturação sexual (SWANSON *et al.*, 1984; MANDL e ZUCKERMAN, 1952). Foram utilizados 58 animais com idade a partir de 25 dias, divididos em dois grupos:

Não-estimuladas (N=30)

Manipuladas (N=28)

3.6.1) Observação da instalação da puberdade:

Ratas tiveram sua abertura vaginal observada diariamente às 9 horas da manhã pelo pesquisador.

3.7 Experimento 4: Análise do ciclo estral

Este experimento teve por objetivo verificar a frequência de cada fase do ciclo estral. Foram utilizados 21 animais divididos em dois grupos:

Não-estimuladas (N=10)

Manipuladas (N=11)

3.7.1 Coleta de secreção vaginal:

Esfregaço vaginal foi coletado diariamente por 29 dias às 9 horas da manhã, segundo técnica de LONG & EVANS (1922) (Figura 4).

3.7.2 Análise do esfregaço vaginal:

Após a coleta, o esfregaço vaginal foi analisado a fresco em um microscópio (Figura 5).



Figura 4: Coleta de secreção vaginal

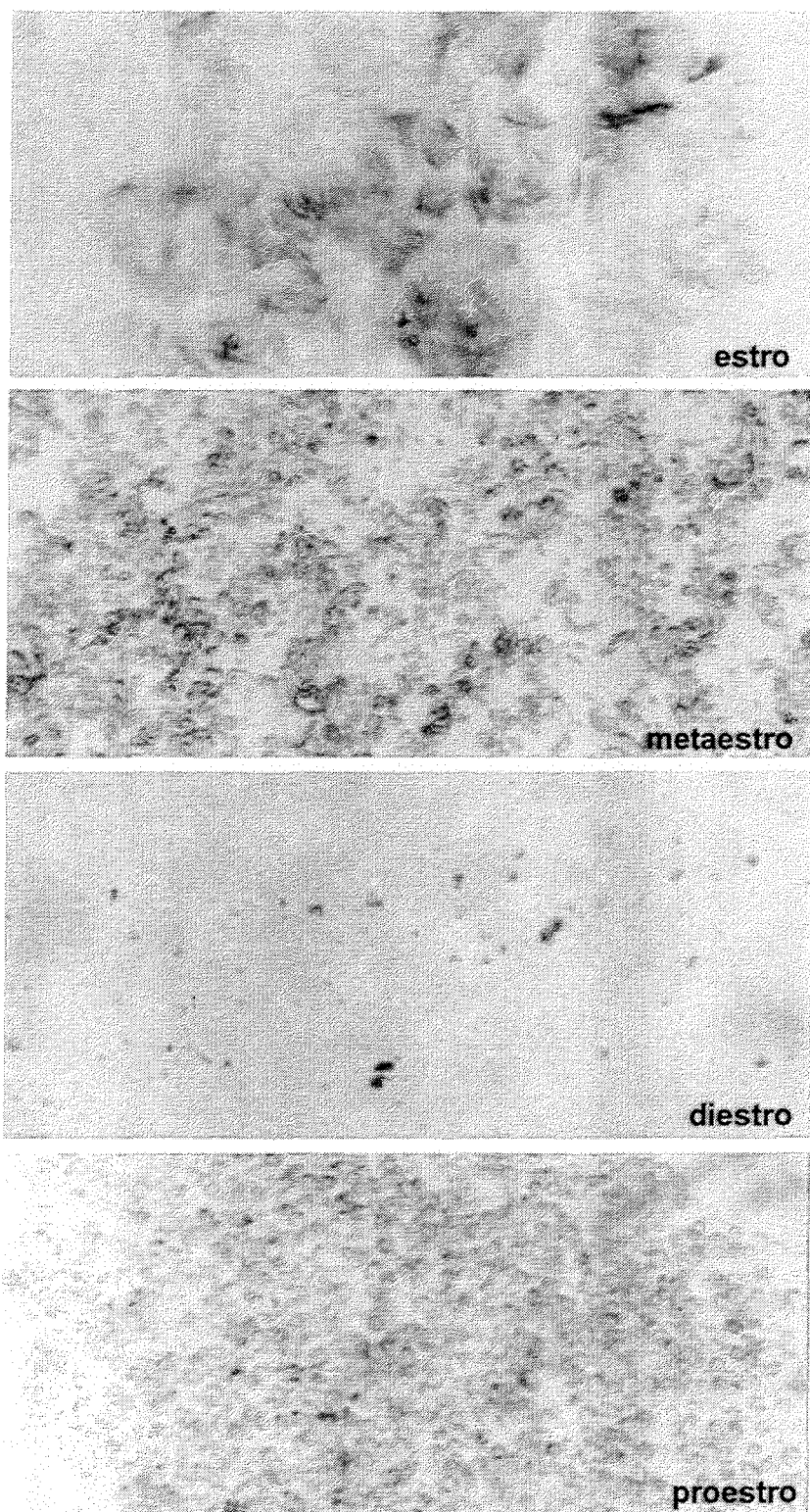


Figura 5: Fases do ciclo estral observadas no microscópio.

3.8 Análise Estatística

3.8.1) Experimento 1: Comportamento sexual

Lordose e Monta:

Os resultados foram comparados entre os três grupos (não-estimuladas, manipuladas e estressadas) pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de Newman-Keuls e expressos como média (\pm EPM) da frequência de lordose das fêmeas dos três grupos e média (\pm EPM) da frequência de montas do macho em fêmeas dos três grupos. O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$), para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

Quociente de lordose(lordose/monta):

Os resultados foram comparados entre os três grupos (não-estimuladas, manipuladas, estressadas) pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de Newman-Keuls e expressos como média (\pm EPM) do quociente de lordose das fêmeas dos três grupos. O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$), para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

3.8.2) Experimento 2: Contagem do número de óvulos

Os resultados foram expressos através de medianas (intervalo interquartil) do número de óvulos de ambos os grupos. O teste estatístico utilizado foi o de Mann-Whitney e o nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

3.8.3) Experimento 3: Instalação da puberdade

Os resultados foram comparados entre dois grupos (não-estimuladas e manipuladas) através do Teste *t* de Student e expressos pela média da idade de instalação da puberdade em ambos os grupos. O nível crítico fixado foi de 5%

($p < 0,05$), para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

3.8.4) Experimento 4: Análise do ciclo estral

Os resultados (freqüência de cada fase em 29 dias) foram comparados entre dois grupos (não-estimuladas e manipuladas) pela análise de variância (ANOVA) de uma via e expressos através das médias (\pm EPM) das fases do ciclo estral das fêmeas de ambos os grupos. O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$), para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

4. Resultados

4.1 Experimento 1) Comportamento Sexual

4.1.1) Lordose:

Ratas que foram manipuladas e estressadas no período neonatal apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo das não-estimuladas na média da frequência de lordoses em 10 minutos, quando testadas na fase estro com machos sexualmente ativos (Figura 6).

4.1.2) Monta:

Machos sexualmente ativos colocados com fêmeas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, na fase estro apresentaram um aumento estatisticamente significativo na média da frequência de montas, em 10 minutos, sobre as fêmeas estressadas quando comparadas aos grupos de manipuladas e não-estimuladas (Figura 7).

4.1.3) Quociente de lordose:

O quociente de lordose apresentado por ratas na fase estro, manipuladas e estressadas no período neonatal quando testadas com ratos machos sexualmente ativos, apresentou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparada ao grupo de não-estimuladas (Figura 8).

4.2 Experimento 2) Contagem do número de óvulos:

Ratas manipuladas no período neonatal mostraram uma redução estatisticamente significativa do número de óvulos quando comparadas ao grupo de não-estimuladas (Figura 9).

4.3 Experimento 3) Instalação da puberdade:

Ratas manipuladas no período neonatal apresentaram um retardo estatisticamente significativo da instalação da puberdade quando comparadas ao grupo de não-estimuladas (Figura 10).

4.4 Experimento 4) Análise do ciclo estral:

Fêmeas manipuladas e não-estimuladas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à frequência das fases do ciclo estral em 29 dias (figura 11).

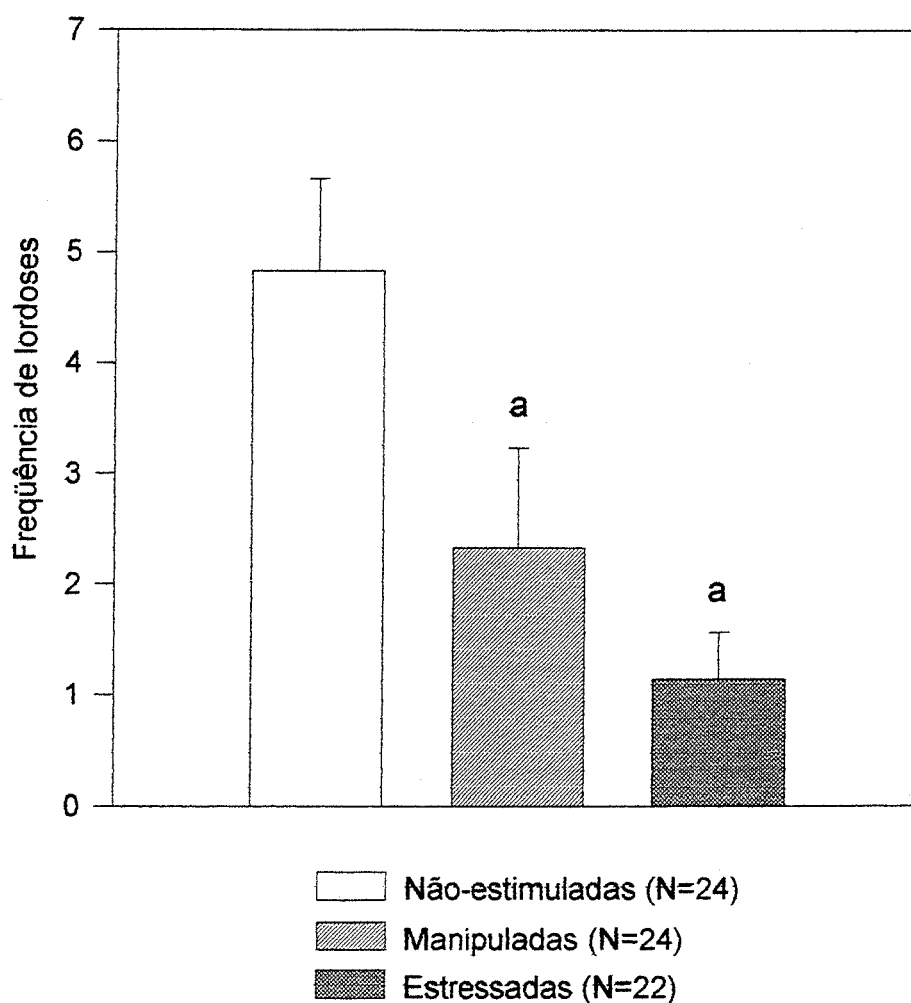


Figura 6: Número de lordoses em 10 minutos (média \pm EPM frequência), apresentado por ratas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro, quando testadas com machos sexualmente ativos. "a" comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguida de Newman-Keuls).

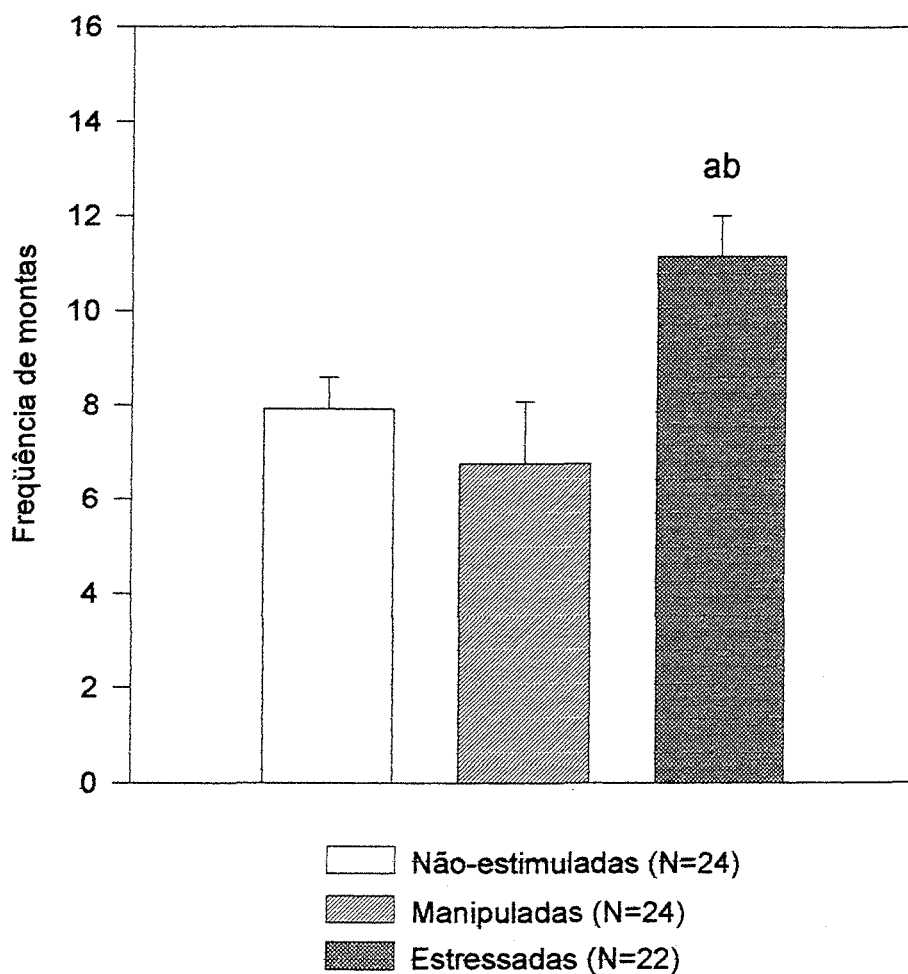


Figura 7: Número de montas do macho em 10 minutos (média \pm EPM frequência) quando testados com fêmeas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro. "a" quando comparado ao grupo de não-estimuladas e "b" quando comparado ao grupo de manipuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguido de Newman-Keuls).

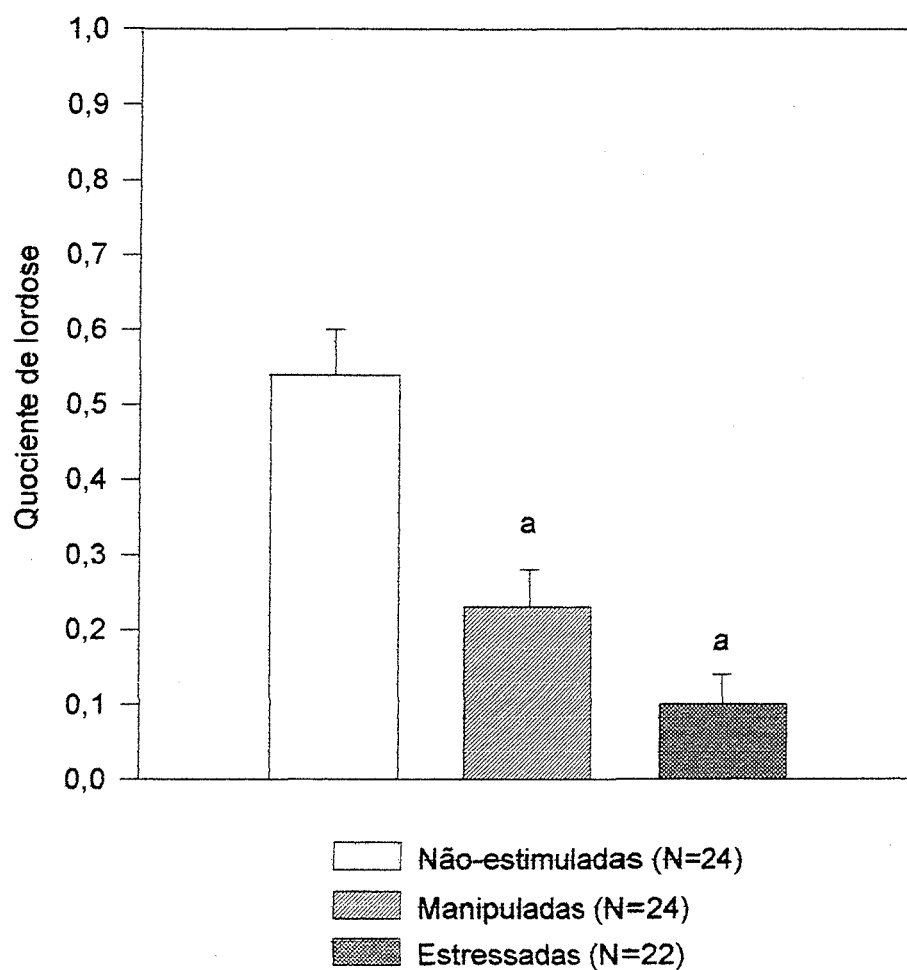


Figura 8: Quociente de lordose (média \pm EPM) de ratas não-estimuladas, manipuladas e estressadas no período neonatal, em estro, quando testadas com machos sexualmente ativos. "a" quando comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$; ANOVA seguida de Newman-Keuls).

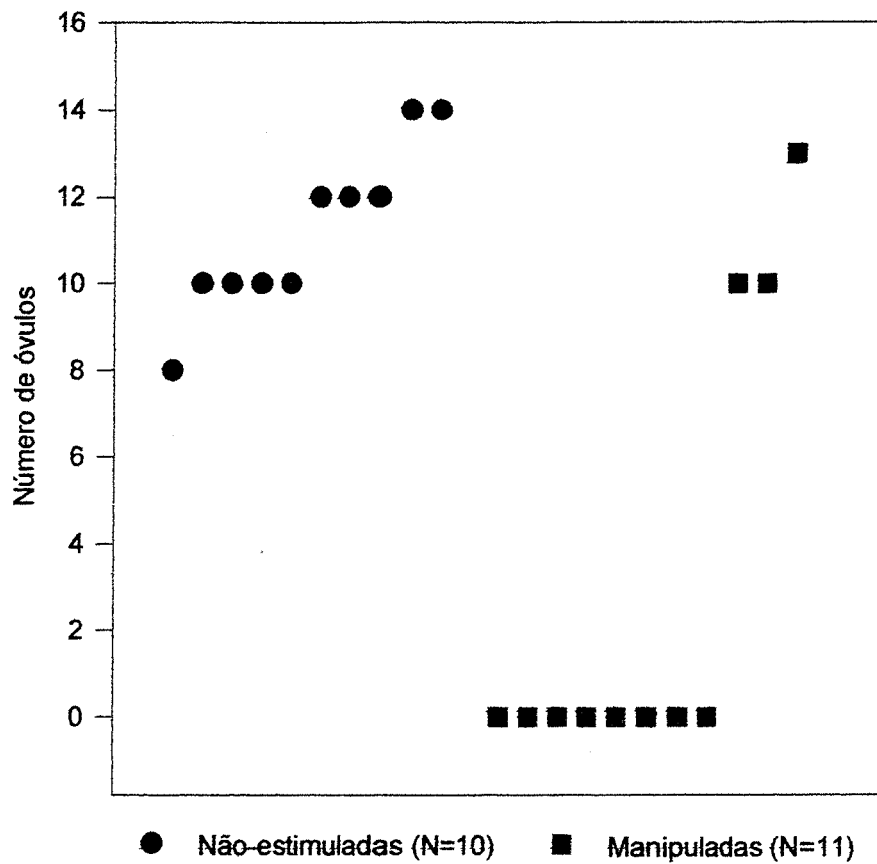


Figura 9: Distribuição das ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal, de acordo com o número de óvulos (mediana) na fase estro ($p < 0,05$; Teste U de Mann-Whitney). Cada símbolo representa um animal.

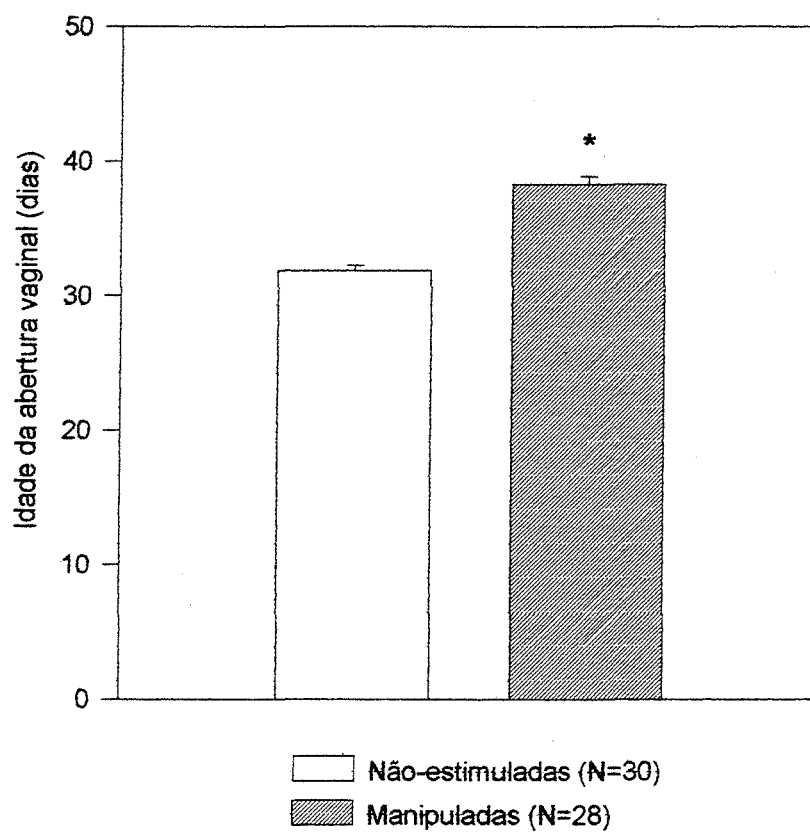


Figura 10: Idade (dias) em que ocorre a abertura vaginal de ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal. * comparado ao grupo de não-estimuladas ($p < 0,05$, Teste t de Student).

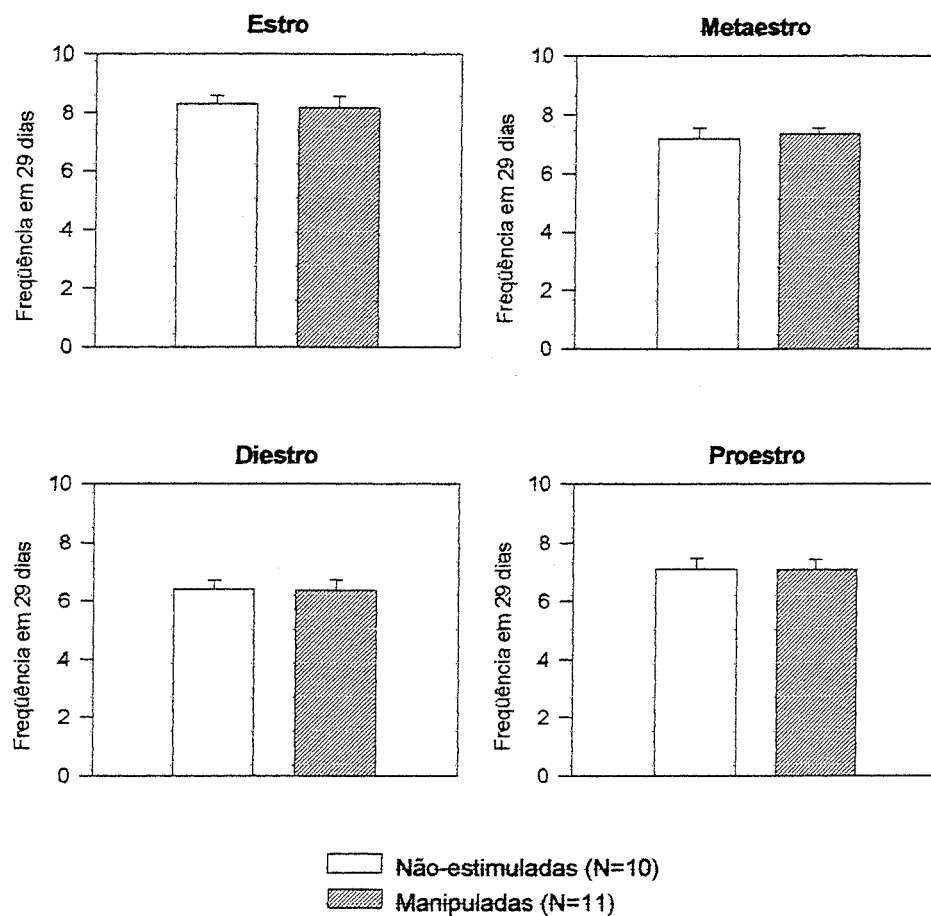


Figura 11: Número de fases (frequência) do ciclo estral em 29 dias em ratas não-estimuladas e manipuladas no período neonatal ($p < 0,05$ Teste t de Student).

5. Discussão

5.1 A relação entre os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal

Considerando nossos resultados, a estimulação neonatal reduziu a capacidade reprodutiva de fêmeas através de uma diminuição do comportamento sexual, do bloqueio da ovulação na maioria dos animais, embora o ciclo estral tenha permanecido regular; e através do retardo na instalação da puberdade. Conforme HANDA *et al.* (1994) a rápida ativação de sistemas neuroendócrinos responsivos ao estresse é uma reação básica dos animais às perturbações em seu ambiente. As conseqüências, na maioria dos casos, são alterações nas concentrações de hormônios hipofisiários, sendo que algumas dessas modificações hormonais têm sido bastante estudadas. Assim, muitas vias que possibilitam uma série de processos adaptativos são ativadas em respostas às influências ambientais. Mas, as importâncias fisiológica e comportamental de tais alterações, muitas vezes, não são totalmente compreendidas (TURPEN *et al.*, 1976). GONZÁLES e colaboradores (1994) sugerem que a ativação induzida pelo estresse do eixo HPA pode estar relacionada com as alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o que é confirmado por nossos dados. Essas modificações sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal podem ter o CRH como o hormônio que poderia estar promovendo tais resultados, já que ele tem sido apresentado como um inibidor da secreção de gonadotrofinas em roedores (GINDOFF *et al.*, 1987). Por outro lado, o estresse pode promover alterações em outros sistemas neurais que estão correlacionados com o mecanismo reprodutivo.

Está bem estabelecida a existência de diferenças sexuais na atividade eixo HPA com um aumento nessa atividade em fêmeas. Essas diferenças parecem ser devidas à influência dos esteróides sexuais femininos, sendo que flutuações na função do eixo HPA ocorrem em função da fase do ciclo ovariano (CAREY *et al.*, 1995). Por exemplo, fêmeas apresentam concentrações mais elevadas de corticosterona plasmática do que àquelas encontradas em machos (ATKINSON e

WADDELL, 1997). Conforme alguns autores (CAREY *et al.* 1995, BUCKINGHAM *et al.* 1978, PHILLIPS e POOLSANGUAN, 1978) essas mudanças identificadas na corticosterona plasmática estão associadas à fase do ciclo estral, com o pico desse hormônio ocorrendo no proestro, fase no qual há secreção máxima de estrógenos na rata (FREEMAN, 1994) e, na fase folicular, em humanos.

Considerando que as concentrações de esteróides gonadais, gonadotrofinas e PRL presentes na tarde do proestro são essenciais para que ocorra a função reprodutiva normal, qualquer mudança nos processos fisiológicos neste período pode ser deletéria ao indivíduo e à espécie. Assim, os resultados presentes indicam que a estimulação neonatal além de afetar o funcionamento do eixo HPA, também pode modificar o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Isso ocorre devido às alterações promovidas, pela estimulação no início da vida pós-natal do animal, em estruturas neuroendócrinas.

A relação entre os esteróides sexuais femininos e o eixo HPA também é demonstrada por alguns trabalhos que indicam o estrógeno como o hormônio sexual envolvido na redução da sensibilidade de retroalimentação para a corticosterona e no aumento na secreção de ACTH pela hipófise, em condições de estresse (ATKINSON e WANDDELL, 1997). Esses dados são reforçados por BURGESS e HANDA (1992) que mostraram, em ratas ovariectomizadas com reposição de estrógeno, um aumento nas concentrações plasmáticas de ACTH imunorreativo, após o estresse.

5.2 Esteróides gonadais e a fase neonatal

Sistemas biológicos são unificados e interdependentes. O meio interno e externo são igualmente sistemas importantes nos quais a função do organismo nos níveis celular ou comportamental é dependente. Há muitas informações que enfatizam a importância de eventos ambientais, durante períodos sensíveis na ontogenia, como determinantes de processos fisiológico e comportamental, no adulto. Tem sido sugerido que os hormônios gonadais exercem uma influência dual

sobre o SNC: indutivo ou organizacional durante o desenvolvimento e excitatório no animal maduro (LEVINE e MULLINS, 1966). Baseado em nossos dados, essa hipótese nos leva a acreditar que a estimulação neonatal afeta a organização neural no desenvolvimento, modificando a expressão dos parâmetros reprodutivos considerados normais, na rata, durante a puberdade e fase adulta.

A influência dos esteróides gonadais, durante o período neonatal, sobre a diferenciação sexual do SNC, mais precisamente do hipotálamo e conseqüentemente sobre a função reprodutiva é bastante estudada (BEACH, 1975; BOOTH, 1979). No entanto, muitos dos mecanismos bioquímicos através dos quais esses esteróides exercem seus efeitos sobre o SNC ainda permanecem pouco compreendidos. Assim, ainda é prematuro afirmarmos quais sistemas neuromoduladores são alvos da estimulação neonatal. De fato, uma das principais dificuldades no estudo dos mecanismos celulares envolvidos na diferenciação sexual do SNC é a extrema complexidade das interações celulares no tecido neural (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1995).

Os esteróides gonadais influenciam a organização neuronal em estruturas sexualmente dimórficas dependentes de esteróides em áreas hipotalâmicas específicas e em áreas do complexo amigdalóide (NISHIZUKA, *et al.*, 1981). A neurotransmissão também pode ser diferente entre os sexos e estar relacionada com a diferenciação sexual. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a administração de agentes farmacológicos conhecidos por alterarem a atividade neurotransmissora pode afetar comportamentos sexualmente dimórficos no adulto (HULL *et al.*, 1984; RAMIREZ *et al.*, 1979). Por exemplo, LADOSKY e GAZIRI (1970) foram os primeiros a demonstrar que as concentrações de serotonina em todo o sistema nervoso são maiores em fêmeas do que em ratos machos. Possivelmente, isso decorra devido às diferenças na atividade da enzima monoamina oxidase (GAZIRI e LADOSKY, 1973) que pode depender dos esteróides gonadais presentes na fase neonatal do animal. Então, a manipulação das concentrações de 5-HT no sistema nervoso logo após o nascimento pode afetar o comportamento sexual no animal adulto em ambos os sexos (WILSON *et al.*, 1986). Esses resultados, bem como os obtidos neste estudo mostram que os esteróides gonadais são essenciais durante o início da vida para

que determinados comportamentos sejam observados no animal em uma fase mais tardia de sua vida.

5.3 Comportamento sexual da rata: lordose

Os dados presentes são consistentes com o conceito que o estresse tem efeito pronunciado não apenas sobre o ACTH, mas também sobre as concentrações de gonadotrofinas (TURPEN *et al.*, 1976). KRULICH e colaboradores (1974) demonstraram que o LH, FSH e também a PRL exibem diferentes respostas à exposição aguda ao éter, sendo que tanto os machos quanto as fêmeas apresentam mudanças na concentração plasmática de FSH após o início do estresse, e níveis de LH em ambos os grupos mostram aumentos transitórios. Por outro lado, a PRL mostra um aumento mais prolongado de sua concentração. Sabe-se que a PRL é um membro dos hormônios adeno-hipofisiários cuja secreção pode ser influenciada pelo estresse (NEILL, 1970). JAHN e DEIS (1986) mostraram que o estresse por éter induz um aumento de 100% na concentração de prolactina em ratas intactas. Além do LH, FSH e PRL este grupo de hormônios afetados pelo estresse também inclui o ACTH (GANONG, 1963), GH e TSH.

Além das conexões com o estresse, os hormônios relacionados com a reprodução, principalmente os esteróides gonadais, têm muitos efeitos sobre o sistema nervoso com ações importantes na regulação de secreção gonadotrofinas e prolactina, assim como na modulação do comportamento sexual (McEWEN *et al.*, 1997). Estudos que utilizaram técnicas de autorradiografia (STUMFF, 1968; BROWN *et al.*, 1988), imuno-histoquímica (CINTRA *et al.*, 1988) e hibridização *in situ* (SIMERLY *et al.*, 1990) verificaram a presença de receptores de estrógenos ou de seus RNA mensageiros no hipotálamo com uma maior abundância na área pré-óptica e núcleo ventromedial que é muito importante para a realização da lordose, ou seja, do comportamento reprodutivo feminino (PFAFF, 1980).

Já foram observadas mudanças na expressão do RNA mensageiro para o receptor de estrógeno durante as fases do ciclo estral, sendo que a magnitude e a

direção dessas modificações são regiões específicas (SHUGHRUE *et al.*, 1992). Na área pré-óptica medial, sinais de hibridização foram aumentados durante o estro e metaestro, e atenuados no diestro. Já durante proestro, período no qual as concentrações de estrógenos circulantes são conhecidas por aumentarem (BROWN-GRANT *et al.*, 1970), houve diminuição. Então, as elevações dos níveis de estrógenos circulantes podem reduzir as concentrações do RNA mensageiro para receptores de estrógenos e talvez a expressão gênica em certas regiões do hipotálamo feminino (SHUGHRUE *et al.*, 1982).

Em ratas ciclando, a exposição ao estrógeno seguida por progesterona é necessária para a indução da lordose (BOLING *et al.*, 1939), sendo assim a ação da progesterona é dependente da presença de estrógeno (MOGUILEWSKY e RAYNAUD, 1979). Mas, o estrogênio sozinho não é suficiente para induzir a lordose, neste caso a progesterona possui uma ação facilitatória na instalação do comportamento sexual, embora a duração do estro comportamental seja controlada primariamente pela concentração de estrógeno (POWERS, 1970). Com isso, o término do comportamento verificado no estro é resultado de uma rápida dissipação do estrógeno condicionando o processo.

EVERITT e FUXE (1977ab) sugerem o envolvimento de vias noradrenérgicas na facilitação e serotoninérgica ou dopaminérgicas na inibição do comportamento sexual feminino. Através de alguns estudos ETGEN *et al* (1999) mostraram evidências indicando que os hormônios ovarianos atuam periféricamente e centralmente para determinar a liberação de NE no hipotálamo em resposta ao estímulo copulatório. Também é sugerido que o meio hormonal determina as respostas celulares de neurônios hipotalâmicos à liberação de NE favorecendo a ativação de vias implicadas na facilitação da lordose e àquelas relacionadas ao pico de gonadotrofinas. É conhecido que o estrógeno e a progesterona têm ações similares em outros sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores, maximizando, portanto, a probabilidade para que fêmeas estejam sexualmente receptivas durante o período periovulatório.

DOHANICH (1985) considera a acetilcolina como o neurotransmissor envolvido diretamente com a regulação do comportamento sexual feminino. A capacidade

dos mecanismos colinérgicos para afetar o comportamento sexual de roedores sugere a existência de uma interface entre a atividade endócrina e função colinérgica. Segundo este autor os esteróides ovarianos regulam a função do sistema nervoso, e conseqüentemente o comportamento, por alterar a atividade de sistemas colinérgicos dentro de estruturas alvo.

Considerando apenas o resultado relativo ao comportamento sexual, podemos deduzir que a estimulação neonatal comprometeu a execução da lordose possivelmente por alterar a disponibilidade de neurotransmissores, e/ou de esteróides gonadais em nível central. Sabe-se que o estresse pré-natal também pode afetar uma variedade de respostas fisiológicas e comportamentais, e esses efeitos podem ser pouco acentuados ou mais pronunciados. Em roedores machos, esse tipo de estresse afeta os comportamentos copulatório e agressivo com outros machos (WARD, 1972). Já em fêmeas, o estresse pré-natal induz à agressão durante a prenhez e no período pós-parto. Comportamentos como o sexual e o parental também são fortemente influenciados nessas situações, na fêmea (FRIDE *et al.*, 1985; POLITCH e HERRENKOHL, 1979).

5.4 Estimulação neonatal e o sistema noradrenérgico central

Alterações na liberação de GnRH pelo hipotálamo têm sido implicadas como uma fonte primária de declínio reprodutivo (SMITH *et al.*, 1992). Possivelmente, a estimulação neonatal promova indiretamente alterações na secreção deste hormônio e conseqüentemente um déficit na liberação de gonadotrofinas causando um ciclo anovulatório.

Evidências sugerem que o pico de liberação de LH que ocorre no proestro ou em ratas ovariectomizadas tratadas com esteróides gonadais é devido a um aumento significativo na liberação de NE em regiões hipotalâmicas específicas que contém neurônios GnRH, como a área pré-óptica medial (MPOA) (RANSE *et al.*, 1981 e WISE *et al.*, 1979). O efeito estimulatório da NE alcança as mais altas concentrações na tarde do proestro e chega a concentrações muito baixas no

estros e diestros (RANCE *et al.*, 1981). De fato, abordagens experimentais que bloqueiam esse aumento na tarde do proestro também inibem o pico de LH (AKABARI e BARRACLOUGH, 1986). Isso indica uma relação estreita entre os esteróides gonadais e a liberação de norepinefrina com conseqüente secreção de GnRH e gonadotrofinas.

Conforme já citado neste trabalho, os esteróides gonadais têm importante função na regulação do eixo neuroendócrino reprodutivo e suas ações culminam na liberação de GnRH pelo hipotálamo e de LH e FSH pela hipófise (HOFFMAN *et al.*, 1985). Segundo FOX *et al.* (1990) e HEBIRSON *et al.* (1993) como não há receptores para estrógeno e progesterona em neurônios GnRH, os efeitos dos esteróides gonadais sobre este sistema são, presumivelmente, indiretos. No entanto, esteróides sexuais foram encontrados nos neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral, incluindo o LC (HERITAGE *et al.*, 1980) sugerindo que há receptores para estradiol neste núcleo. Assim, o sistema noradrenérgico pode ser o principal mediador no "feedback" dos esteróides gonadais (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1999a). Em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno e progesterona, essa última induz o pico de LH à tarde, quando o "turnover" de NA está aumentado, e não pela manhã, quando está baixo (HIEMKE *et al.*, 1983). Por outro lado, o "feedback" negativo do estrógeno está associado à diminuição da concentração de NA em amostras dialisadas da MPOA de ovelhas em anestro (GOODMAN *et al.*, 1995). Baseado nas informações apresentadas até o momento, é coerente acreditarmos que a manipulação na fase neonatal modifique estruturas responsáveis pela secreção de NE. Segundo GITLER e BARRACLOUGH (1987) a NE pode ser o neurotransmissor responsável pelo pico de GnRH.

O LC mais do que qualquer outra estrutura do SNC contém neurônios que contribuem para a maior entrada de NE em direção a vários locais do sistema nervoso (GITLER e BARRACLOUGH, 1987). DOTI e TALEISNIK (1984) observaram que a estimulação nesta região afeta a liberação de LH, sugerindo que axônios provenientes do LC fazem projeções para regiões hipotalâmicas que contém neurônios GnRH. Então, é possível que neurônios noradrenérgicos localizados no LC sejam as estruturas neurais afetadas pela estimulação neonatal.

Conforme ETGEN e PETITTI (1986) a ação estimulatória da NE sobre a liberação de LH e FSH no SNC é mediada, ao menos em parte, pela formação de adenosina 3,5 monofosfato cíclico (AMPC) em sítios hipotalâmicos. Há evidências de que o AMPC possa participar de mecanismos hipotalâmicos que controlam a liberação cíclica de gonadotrofinas no rato. De fato, injeção de agentes farmacológicos que bloqueiam a ação da NE e impedem a liberação de LH também previnem o acúmulo de AMPC no hipotálamo ETGEN e PETITTI (1986).

Analisando os nossos dados em conjunto além da estimulação neonatal alterar o eixo HPA como mostrado por LIU *et al.* (1997), MEANEY e AITKEN (1985), MEANEY *et al.* (1994), que focaram os eventos relacionados ao estresse, os resultados levaram a conclusão que a estimulação poderia afetar sistemas neurais que modulam o eixo HPA, como observado através do aumento da população de receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal. Igualmente, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal poderia ser alterado pela estimulação neonatal. Esse evento no início da vida pós - natal poderia afetar sistemas neuromoduladores que estão associados funcionalmente às ações dos esteróides gonadais em nível central, já que periféricamente parece não ocorrerem alterações, como verificado através da presença de um ciclo estral regular. Um dos prováveis sistemas modificados pela estimulação logo após o nascimento seria o noradrenérgico, no qual possivelmente ocorre uma redução nas concentrações de receptores para estrógenos prejudicando a função reprodutiva como observado pelo atraso na instalação da puberdade, diminuição no quociente de lordose e presença de ciclo anovulatório.

Além da possível diminuição na concentração de receptores centrais de estrógeno, convém investigar estruturalmente (forma, tamanho) e o numericamente células nervosas presentes no LC, assim como as concentrações plasmáticas de gonadotrofinas e PRL e a concentração do GnRH na MPOA, para termos uma maior compreensão dos efeitos dessa estimulação neonatal sobre os parâmetros reprodutivos femininos e conseqüentemente sobre a preservação da espécie.

6. Conclusões

Nossos resultados indicam:

- . que a estimulação neonatal reduz a capacidade reprodutiva de fêmeas através da diminuição do comportamento sexual e do bloqueio da ovulação;
- . que não há alterações nos efeitos periféricos produzidos pelos esteróides gonadais como observado através das mudanças regulares na mucosa vaginal, entretanto, efeitos centrais dos estrógenos foram aparentemente alterados pela estimulação neonatal;
- . que há um atraso na instalação da puberdade em fêmeas produzido pela estimulação neonatal;
- . que a estimulação neonatal produz mudanças neuroendócrinas estáveis no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal;
- . que o sistema noradrenérgico central pode ser um dos sistemas neurais alterados pela estimulação no período neonatal.

7. Referências Bibliográficas

- ADER, R.; FRIEDMAN, S.B.; GROTA, L. J; SHAEFER, A. Attenuation of the plasma corticosterone response to handling and electric shock stimulation in the infant rat. *Physiology & Behavior* 3: 327-331, 1968.
- AKABORI, A.; BARRACLOUGH, C.A. Effects of morphine on luteinizing hormone secretion and catecholamine turnover in the hypothalamus of estrogen-treated rats. *Brain Research* 362: 221-226, 1986.
- ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MACCANN, S. M. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research* 767: 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. 10 th International Congress of Endocrinology, July 12-15, San Francisco, CA, USA, 308 (Abstrat)*, 1996.
- ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROCHA-BARROS, V.M.; FRANCI, C.R., McCANN, S.M. Locus ceruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Brain Res.* 833 (1): 86-92, 1999a.
- ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; LUCION, A.B.; SANVITTO, G. Projeto Temático - FAPESP - Sistema reprodutor feminino: Controle neuroendócrino e efeitos do estresse. p.1-28, 1999b.
- ANTONI, F.A. Hypothalamic control of ACTH secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin factor. *Endocr. Rev.* 7: 351-370, 1986.
- ARMARIO, A.; LOPES-CALDERON, A.; JOLIN, T. BALASCH, J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav Rev* 103: 245-250, 1986.
- ARMARIO, A.; GAVALDA, A.; MARTI, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strain of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20(8): 879-890, 1995.

- ARMSTRONG, D.T. Environmental stress and ovarian function. *Biol Reprod* 34: 29-39, 1986.
- ATKINSON, H.C.; WANDDELL, B.J. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 138 (9): 3842-3848, 1997.
- ATTARDI, B. Progesterone modulation of the luteinizing hormone surge: regulation of hypothalamic and pituitary progestin receptors. *Endocrinology* 115 (6): 2113-2122, 1984.
- AXELROLD, J.V.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459, 1984.
- BARTOVA, A. Functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal system during postnatal development in rats. *Gen Comp Endocrinol* 10 (2): 235-239, 1968.
- BEACH, F.A. Hormonal modification of sexually dimorphic behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 1: 3-13, 1975.
- BHATNAGAR, S.; MEANEY, M.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non-handled rats. *Journal of Neuroendocrinology* 7: 97-108, 1995.
- BLOOM, F.E.; BATTENBERG, E.L.; RIVIER, J.; VALE, W. Corticotropin releasing factor (CRF) immunoreactive neurons and fibres in rat hypothalamus. *Regl. Peptides* 4:43-48, 1982.
- BRINDLEY, D.N.; ROLLAND, Y. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin Sci*, 77 (5): 453-461, 1989.
- BROWN, T.J.; HOCHBERG, R.B.; ZIELINSKI, J.E.; MACLUSKY, N.J. Regional sex differences in cell nuclear estrogen - binding capacity in the rat hypothalamus and preoptic area. *Endocrinology* 123: 1761-1770, 1988.
- BOLING, J.L.; BLANDAU, R.J. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 25: 359, 1939.
- BOOTH, J. E. Sexual differentiation of the brain. In: *Oxford reviews of*

- reproductive biology*. Vol 1, C. A. Finn. Oxford: Oxford university press, p. 58-158, 1979.
- BROWN-GRANT, K.; EXLEY, D.; NAFTOLIN, F.; Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.* 48 (2): 295-296, 1970.
- BUCKINGHAM, J.C. DOHLER, K.D.; WILSON, C.A. Activity of the pituitary – adenocortical system and thyroid gland during the oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.* 27: 359-366, 1978.
- BUGON,C.; FELLAMAN, D.; GOUGE, A.; CARDOT, J. Corticoliberin in rat brain: Immunocytochemical identification and localization of a novel neuroglandular system. *Neuroscience Letters* 30: 25-30, 1982.
- BURGESS, L.H.; HANDA, R.J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131: 1261-1269, 1992.
- CALIGARIS, L.; ASTRADA, J.J.; TALEISNIK, S. Biphasic effect of progesterone on the release of gonadotropin rats. *Endocrinology* 89 : 331-337, 1971.
- CARATY, A.; MILLER, D.W.; DELALEU, B.;MARTIN, G.B. Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing hormone. *J. Reprod. Fertil.* 111(2): 249-257, 1997.
- CAREY ,M.P.; DETERD, C.H.; DEKONING, J.; HELMERHORST, F.; DEKLOET, R.R. The influence of ovarian steroids on hypothalamic – pituitary – adrenal regulation in the female rat. *J. Endocrinol.* 144: 311-321, 1995.
- CECCATELLI, S.; VILLAR, M. J.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 86: 9569-9573, 1989.
- CHROUSUS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders – Overview of physical and behavior homeostasis. *Jama* 267: 1244-1252, 1992.
- CINTRA, L.; DIAZ-CINTRA, S.; GALVAN, A.; MORAGE, P.J. Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. *Bol. Estud. Med. Biol.* 36 (1-4): 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* 111(2): 477-505, 1995.
- DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review* 71: 335-351, 1964.
- DOHANICH, G. Cholinergic regulation of female sexual behavior. In: Paul E. Micevych e Ronald P. Hammer Jr. *Neurobiological effects of steroid hormones*. Cambridge University Press, 1ª edição, 1985. p. 184-205.
- DOHLER, K.D.; WUTTKE, W. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 94: 1003-1008, 1974.
- DOTTI, C.; TALEISNIK, S. Beta – adrenergic receptors in the premammillary nucleus mediate the inhibition of LH release evoked by locus coeruleus stimulation. *Neuroendocrinology* 38: 6-11, 1984.
- ETGEN, A.M.; PETITTI, N. Norepinephrine – stimulated cyclic AMP accumulation in rat hypothalamic slices: effects of estrous cycle and ovarian steroids. *Brain Research* 375: 385-390, 1986.
- ETGEN, A.M.; CHU, H.P.; FIBER, J.M.; KARKANIAS, G.B.; MORALES, J.M. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. *Brain Res* 105(1): 93-103, 1999.
- EVERITT, B.J., FUXE, K. Dopamine and sexual behaviour in female rats. Effects of dopamine receptor agonist and sulpiride. *Neurosci. Lett.* 4: 209, 1977a.
- EVERITT, B.J., FUXE, K. Serotonin and sexual behavior in female rats. Effects of hallucinogenic indolealkylamines and phenylethylamines. *Neurosci. Lett.* 4: 215, 1977b.
- FOX, S.; HARLAN, R.; SHIVERS, B.; PFAFF, D. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 51: 276-283, 1990.
- FRANCIS, D.; DIODORO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J.R.; MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine

- development. *Annals New York Academy of Sciences* 20 (794):136-152, 1996.
- FRANTZ, P.J.; GOMES, C.M.; 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), 1988.
- FREEMAN, M.C.; DUPKE, K.C.; CROTEAU, C.M. Extinction of estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 99 (91): 223-229, 1976.
- FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil et al. Raven Presss, NY.,45: 613-657, 1994.
- FREEMAN, M.E.; SMITH, M.S.; NAZIAN, S.J.; NEILL, J.D. *Endocrinology* 94: 875, 1974.
- FREIDIN, M.; PFAFF, D. Molecular actions of steroid hormones and their possible relations to reproductive behaviors. In: Paul E. Micevych e Ronald P. Hammer Jr. *Neurobiological effects of steroid hormones*. Cambridge University Press, 1º edição, 1985. p. 350-362.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; GAVISH, M.; WEINSTOCK, M. Prenatal stress impairs maternal behavior in a conflict situation and reduces hippocampal benzodiazepine receptors. *Life Sci.* 36: 2103-2109, 1985.
- GAILLET, S.; ALONSO, G.; Le BORGNE, R.; BARBANEL,G.; MALAVAL, F.; ASSENMACHER,I.; SZAFARCZYK,A. Effects of discrete lesions in the ventral noradrenergic ascending bundle on the corticotropic stress response depend on the site of the lesion and on plasma levels of adrenal steroids. *Neuroendocrinology* 58: 408-419, 1993.
- GANONG, W.F. In: Nalbandov, A.V. (ed.). *Advances in neuroendocrinology*. University of illinois press. Evanston, 1963, p. 82.
- GARCIA-SEGURA, L.M.; DUCÑAS, M.; BUSIGUINA, S.; NAFTOLIN, F. Gonadal hormone regulation of neuronal – glial interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53: (1-6): 293-298, 1995.

- GAZIRI, L.C.J.; LADOSKY, W. Monoamine oxidase variation during sexual differentiation. *Neuroendocrinology* 12: 249-256, 1973.
- GENUTH, S.M. Sistema Endócrino: reprodução. In: BERNE, R.M. e LEVY, M.N. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 765-920.
- GINDOFF, P. R.; XIAO, E.; LUCKHAUS, J.; FERIN, M. Dexamethasone treatment prevents the inhibitory effect of corticotropin-releasing hormone on gonadotrophin release in the primate. *Neuroendocrinology* 49: 33-38, 1987.
- GITLER, M.S.; BARRACLOUGH, C.A. Stimulation of the medullary A1 noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptic nucleus stimulation. Evaluation of A1 projections to the hypothalamus and drugs which affect norepinephrine synthesis and adrenoreceptors. *Neuroendocrinology* 48: 351-359, 1988.
- GITLER, M.S.; BARRACLOUGH, C.A. Locus coeruleus (LC) stimulation augments LHRH release induced by medial preoptic stimulation. Evidence that the major LC stimulatory component enters contralaterally into the hypothalamus. *Brain Research* 422: 1-10, 1987.
- GONZÁLEZ, A.S.; RODRÍGUEZ ECHANDIA, E.L.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M.R.; FRANCCCHIA, L. N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology & Behavior* 47: 735-74, 1990.
- GONZÁLES, A.S.; ECHANDÍA, E.L.R.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M.R. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females. *Physiology & Behavior* 86 (3): 591-595, 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* 102 (1): 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* 61: 284-292, 1995.

- GORSKI, R.A. Sexual Differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. *Principles of neural Science*. New York, MacGraw-Hill, 2000, p. 1131-1146.
- GOULD, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 14 (743): 73-92, 1994.
- GUILLET, R.; MICHAELSON, S.M. Corticotropin responsiveness in the neonatal rat. *Neuroendocrinology* 27 (3-4): 119-125, 1978.
- HALTMEYER, G.C.; DENENBERG, V.H.; THATCHER, J.; ZARROW, M.X. Response of adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress. *Nature* 212 (68): 1371-1373, 1966.
- HARLOW, H.F.; ZIMMERMAN, R.R. Affectional responses in the infant monkey. *Science* 130: 421-432, 1959.
- HANDA, R.J.; BURGESS, I.H.; KERR, J.E.; OKEEFE, J.A. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo – pituitary – adrenal axis. *Hormones and Behavior* 28: 464-476, 1994.
- HERBISON, A.E.; ROBINSON, J.E.; SKINNER, D.C. Distribution of estrogen receptor – immunoreactive cells in the preoptic of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone – releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57: 751-759, 1993.
- HERITAGE, A.S.; STUMPF, W. E.; GRANT, L.D. Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. *Sciences* 207 (4437): 1377-1379, 1980.
- HESS, J.L.; DENENBERG, V.H.; ZARROW, M.X.; PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling of infancy. *Physiology & Behavior* 4: 109-111, 1969.
- HIEMKE, C.; FROHNE, D.; BRUDER, D.; GHRAF, R. Effects of oestradiol benzoate and progesterone on luteinizing hormone release and catecholamine turnover. *J. Endocrinol.* 97: 437-445, 1983.
- HINDE, R.A.; SPENCER-BOOTH, Y. Effects of brief separation from mother on rhesus monkeys. *Science* 173: 111-118, 1971.
- HOFER, M.A. Physiological responses of infant rats to separation from

mothers. *Science* 168: 871-873, 1970.

HOFFMAN, G.E.; ABBUD, R.; WEI-WEI, L.E.; ATTARDI, B.; BERGHORN, K.; SMITH, M.S. Effects of sex steroids on the central nervous system detected by the study of Fos protein expression. In: Paul E. Micevych e Ronald P. Hammer Jr. *Neurobiological effects of steroid hormones*. Cambridge University Press, 1ª edição, 1985. p.363-389.

HULL, E. M., NISHITA, J.K.; BITRAN, D.; DALTERIO, S. Perinatal dopamine - related drugs demasculinize rats. *Science* 224: 1011-1013, 1984.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R.M.; The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.* 12: 118-134, 1991.

JAHN, G.A.; DEIS, R.P. Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. *J. Endocr.* 110: 423-428, 1986.

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* 586: 171-175, 1992.

JOANNY, P.; STEINBERG, J.; ZAMORRA, A.J.; CONTE-DEVOLX, B., MILLET, Y.; OLIVER, C. Corticotropin-releasing factor release from in vitro superfused and incubated rat hypothalamus. Effects of potassium, norepinephrine, and dopamine. *Peptides*: 10, 903-911, 1989.

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

KALRA, S.P.; McCANN, S.M. Effects of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15: 79-81, 1974.

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

KATO, J. e VILLEE, A.C. Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 80(4): 567-575, 1967.

- KAWATA, M.; HASHIMOTO, K.; TAKAHARA, J.; SANI, Y. Immunohistochemical demonstration of corticotropin-releasing factor containing neurons in the hypothalamus of mammals including primates. *Anat. Embryol* 165: 303-313, 1982.
- KINSLEY, C.H.; BRIDGES, R. S. Prenatal stress and maternal behavior in virgin rats: Response latencies are decreased in males and increased in females. *Horm. Behav.* 22: 76-89; 1988.
- KINSLEY, C.H.; MANN, P.E.; BRIDGES, R. S. Alterations in stress – induced prolactin release in adult female and male rats exposed to stress, in utero. *Physiology & Behavior* 45: 1073-1076, 1989.
- KRULICH, L.; HEFCO, E.; ILLNER, P.; READ, C.B. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* 16: 292-311, 1974.
- KOPIN, I.L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann N Y Acad Sci* 771:19-30, 1995.
- KUHN, C.M.; SCHANBERG, S.M. Responses to maternal separation: Mechanisms and mediators. *Int. J. Devl. Neuroscience* 16 (3/4): 261-270, 1998.
- LADOSKY, W.; GAZIRI, L.C.J. Brain serotonin and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroendocrinology* 6: 168-174, 1970.
- LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 135: 795-799, 1962.
- LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697: 61-69, 1993.
- LEVINE, S.; MULLINS, F. Jr. Hormonal Influences on brain organization in infant rats. *Sciences* 152: 1585-1591, 1966.
- LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 275-293, 1994.
- LIU, D.; DIORIO J.; TANNENBAUM, B.; CALDJII, C.; FRANCIS D.; FREEDMAN, A.;

- SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J.; Maternal care, hippocampal glucocorticoid, and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Science* 277: 1659-1662, 1997.
- LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrous cycle in the rat and its related-phenomena. *Mem. Univer. Calif.* 6: 1-148, 1922.
- 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 rats. *27 th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. October: 25-30, New Orleans, LA, USA, 1081 (Abstrat), 1997.*
- MACCORMICK, C.M.; FUREY, B.F. CHILD, M.; SAWYER, M.J. Neonatal sex hormones have organizational effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of males rats. *Brain. Res.* 105(2): 295-307, 1998.
- MACLUSKY, N.J. ; NAFTOLIM, F. Sexual differentiation of the Central Nervous System. *Science* 211 (20): 1294- 1302, 1981.
- MADHWA, H.G.; MOUDGAL, N.R. Hormonal control of gestation in the intact rat. *Endocrinology* 86: 874-889, 1970.
- MANDL, A.M.; ZUCKERMAN, S. Factors influencing the onset of puberty in albino rats. *J. Endocr.* 8: 357-364, 1952.
- MAS, M. del CASTILLO, A.R., GUERRA, M., DAVIDSON, J.M. & BATTANER, E. Neurochemical correlates of male sexual behavior. *Physiology & Behavior*, 41: 341-5, 1987.
- MATTHEWS, M.K. ; KENYON, R. Four-versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology & Behavior* 33: 65-67, 1984.
- McEWEN, B.S. Neural gonadal steroid actions. *Science* 211(20): 1303-1311, 1981.
- McEWEN, B.S.; KLOET, E.R.; ROSTENE, W.H. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66: 1121-1150, 1986.

- McEWEN, B.S.; ALVES, S.E.; BULLOCH, K.; WEILAND, N.G. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 48(7): 8-14, 1997.
- MEANEY M.J.; AITKEN, D.H. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Developmental Brain Research* 22:301-304, 1985.
- MEANEY, M.J.; DIODORO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J.W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 260-273, 1994.
- MEANEY, M.J.; SEMA, B.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMITHE, J.W.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic pituitary-adrenal stress response. *York Academy of Sciences* 697: 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* 88(19): 8382-8386, 1991.
- MELIA, K.R.; NESTLER, E.J.; HAYCOCK, J.; DUMAN, R.S. Regulation of Tyrosine Hydroxylase (TH) in the Locus Coeruleus (LC) by Corticotropin Releasing Factor (CRH): relation to stress and depression. *20th Annual Meeting Soc Neurosci Abstr* 444:16, 1990.
- MISTRETTA, Ch.M.; BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. In: *Studies on the development of behavior and nervous system*. New York: Academic Press, pp. 215-246, 1978.
- MOGUILEWSKY, M. ; RAYNAUD J.P. The relevance of hypothalamic and hypophyseal progesterin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 105(2): 516-522, 1979.
- MORTON, J.R.C.; DENENBERG, V.H.; ZARROW, M.Y. Modification of sexual development through stimulation in infancy. *Endocrinologia* 72: 439-442, 1962.
- MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of

- glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological. *Endocr. Rev.* 5 (1): 25-44, 1984.
- NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. *Science* 211 (20),1263-1264, 1981.
- NEILL, J.D. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197, 1970.
- NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implication for sexual differentiation of the brain. *Brain Res.* 213: 422- 426, 1981.
- ONO, N.; ALLI, E.T. Effect of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin – releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 82: 7787-7790,1985.
- PALKOVITS, M. Catecholamines in the hypothalamus anatomical review. *Neuroendocrinology* 33:123-128, 1981.
- PAU, K.Y.; SPIES, H.G. Neuroendocrine signals in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Chin. J. Physiol.* 40(4): 181-196. 1997.
- PFAFF, D.W. *Estrogens and brain function: Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior.* New York: Springer, 1980.
- PFAFF, D.W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S.; McCARTHY, M.M.; KOW, L.M. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. in: *Physiology of Reproduction.* Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Presss, NY..2d ed., 2: 107-220, 1994.
- PFEIFER, W.D.; ROTUNDO, R.; MYERS, M.; DENENBERG, V.H. Stimulation in infancy: unique effects of handling. *Physiol. Behav.* 17 (5): 781-784, 1976.

- PHILLIPS, J.G.; POOLSANGUAN, W. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *Endocrinology* 77: 283-291, 1978.
- PLAS-ROSER, S.; ARON, C. Stress related effects in the control of sexual receptivity and in the secretion of progesterone by the adrenals in the cyclic female rats. *Physiol. Behav.* 27: 261-264, 1981.
- PLOTSKY, P.M. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophyseal-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology* 121: 924-930, 1987.
- 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* 18: 195-200, 1993.
- POLITCH, J.A.; HERRENKOHL, L. R. Prenatal stress reduces maternal aggression in mice. *Physiol. Behav.* 23: 415-418, 1979.
- POWERS, B.J. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiology and Behavior* 5: 831-835, 1970.
- RAMIREZ, D.A.; CARRER, H.F.; NASELLO, A.G. Prenatal amphetamine exposure: Ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 605-609, 1979.
- 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* 108: 1795-1802, 1981.
- RASIA-FILHO, A.A.; LONDERO, R.G.; ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Research Bulletin* 48 (2): 173-183, 1999.

- RIVER; VALE W. Influence of corticotrophin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* 114: 914-921, 1984.
- SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance or glucocorticoid endangerment of hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 294-307, 1994.
- SCHANBERG, S.M.; FIELD, T.M. Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Development* 58: 1431-1447, 1987.
- SHANBERG, S.M.; KUHN, C.M. The biochemical effects of tactile deprivation in neonatal rats. *Perspectives on Behavioral Medicine* 2: 133-148, 1985.
- SHUGHRUE, P.J., BUSHNELL, C.D., DORSA D.M. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: A comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 131 (1): 381-388, 1992.
- SIECK, G.; RAMALEY, J.A. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiology & Behavior* 15: 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* 294 (1): 76-95, 1990.
- SIMPKINS, J.W.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. Temporal alterations in luteinizing hormone-releasing hormone concentrations in several discrete brain regions: effects of estrogen-progesterone and norepinephrine synthesis inhibition. *Endocrinology* 107 (2):573-577, 1980.
- SMITH, M. S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteus of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96 (1): 219-225, 1975.
- SMITH, A.W.; RALPH, L.C.; CONN, M.P.; Altered pituitary responsiveness to gonadotropin – releasing hormone in middle – aged rats with 4 – day estrous cycles. *Endocrinology* 111 (6): 1843-1848, 1992.

- STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771: 1-18, 1995.
- STUMPF, W.E.; Estradiol – concentrating neurons: topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography. *Science* 162: 1001-1003, 1968.
- SWANSON, H.H.; BOLWERK, E.; BRENNER, E. Effects of cooling in infant rats on growth, maturation, sleep patterns and responses to food deprivation. *British Journal of Nutrition* 52: 139-148, 1984.
- 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. *J Vet Med Sci* 59(5): 329-334, 1997.
- TURPEN, C.; JOHNSON, D.C. ; DUNN, J.D. Stress – induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology* 20: 339-351, 1976.
- UNERSTALL, J.R.; KOPAJTIC, T.A.; KUCHAR, M.J. Distribution of alpha 2 agonist binding sites in rat and human central nervous system: analysis of some functional anatomic correlates of the adrenergic agents. *Brain Res. Ser* 7: 69, 1984.
- VIAU, V.; MEANEY, M.J. Variations in the hypothalamic – pituitary – adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129 (5): 2503-2511, 1991.
- WALKER, C.D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118(4): 1445-1451, 1986.
- WARD, I. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175: 82-84, 1972.
- WARD, I.L.; WARD, O.B.; WINN, R.J.; BIELAWSKI, D. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress or both factors. *Beh. Neurosc.* 108 (6): 1188-1195, 1994.
- WILDT, L.; HUTCHISON, J.S.; MARSHALL, G.; POHL, C.R.; KNOBIL, E. On the site

of action of progesterone in the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109(4): 1293-1294.

WILSON, C.A.; PEARSON, J.R.; HUNTER, A.J.; TUOHY, P.A.; PAYNE, A.P. The effect of neonatal manipulation of hypothalamic serotonin levels on sexual activity in the adult rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 24: 1175-1183, 1986.

WISE, P.M.; RANSE, N.; BARRACLOUGH, C.A. Further evidence that luteinizing hormone - releasing hormone also is follicle - stimulating hormone - releasing hormone. *Endocrinology* 104: 940-948, 1979.

ZARROW, M.X.; DENENBERG, V.H.; HALTMEYER, G.C.; BRUMAGHIN, J.T. Plasma and adrenal corticosterone levels following exposure of the two-day-old rat to various stressors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 (1): 113-116, 1967.