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

PROCÓPIO CLEBER GAMA DE BARCELLOS FILHO

**Efeitos da corticosterona e do estrógeno na atividade do eixo HPA de ratas:
comportamento e comprimento dos telômeros**

RIBEIRÃO PRETO-SP
2018

PROCÓPIO CLEBER GAMA DE BARCELLOS FILHO

**Efeitos da corticosterona e do estrógeno na atividade do eixo HPA de ratas:
comportamento e comprimento dos telômeros**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Barcellos-Filho, Procópio Cleber Gama de
Efeitos da corticosterona e do estrógeno na atividade do eixo
HPA de ratas: comportamento e comprimento dos telômeros, 2018
P 122.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Franci, Celso Rodrigues.

1. Corticosterona 2.Estrógeno 3.Comportamento, 4. Telômero.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes entidades e instituições.

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) -Bolsa de Doutorado – Junho/2014 - Maio/2018
- CAPES-PROEX
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

FICHA DE APROVAÇÃO

Procópio Cleber Gama de Barcellos Filho

Efeitos da corticosterona e do estrógeno na atividade do eixo HPA de ratas:
comportamento e comprimento dos telômeros

Tese apresentada ao programa de Fisiologia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- Universidade de São Paulo, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em
ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto ____/____/____

*Dedico este trabalho para a família. Gratidão
pai, mãe, e minhas irmãs Milene e Mariel,
sou muito feliz por tê-los na minha vida.!!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado serenidade e calma em todos os momentos.

Aos meus pais Maria Lúcia e Procópio Barcellos, e minhas irmãs Milene e Mariel, por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida, me dando apoio, conselhos e amor. Foi bem difícil ficar longe todos esses anos, mas não teve um dia que deixei de sentir saudade de vocês. Tudo que consegui nesse momento, é graças a educação que me proporcionaram ao longo desses anos. Sem o apoio e carinho, não teria conseguido chegar aqui. Amo muito vocês.

Ao professor Franci, que sempre me tratou com muita educação e respeito. Agradeço a confiança, convívio e ensinamentos ao longo desses sete anos no laboratório. O seu exemplo me fez crescer tanto profissionalmente como pessoalmente. Gratidão por tudo.

Ao professor Rodrigo Tocantins Calado, que sem a sua ajuda nas análises dos telômeros, esse projeto não poderia ser feito. E a todos que convivi no laboratório de hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Em especial ao Leonardo, Barbara e Rita. Muito obrigado por toda ajuda, desde as extrações de DNA, até ao final das análises.

Aos meus amigos do laboratório *Bruno e Iracema*, em especial a querida *Fabiana*, que sempre trouxe muita alegria para o laboratório. A *Larissa*, pela amizade ao longo desses anos. Ao *Guillermo*, por toda a ajuda e conselhos durante o meu mestrado. A *Nathália*, que tive o prazer de conviver durante os primeiros anos do doutorado. E a *Luana* (Lucy), minha grande amiga e companheira no laboratório, apesar de estar longe nesses últimos anos, sempre pude contar com você para tudo, muito obrigado por me ajudar a me aceitar e amar.

A minha querida *Aline* (*Linete*), minha grande companheira de pós-graduação e amiga. Seu apoio em todos os momentos foram imprescindíveis para a conclusão da tese. Você não foi apenas a minha amiga, mas minha irmã de coração. Sua

alegria de viver é linda e exemplar. Cada momento passado com você me trouxe muito carinho e amor. E agradeço também a sua família, por sempre me tratar tão bem e me acolher.

A querida *Ana Omoto (Aninha)*, um dos melhores presentes que eu tive nesse últimos anos. Sua amizade trouxe muita luz e paz na minha vida. Agradeço muito a Deus por ter me dado uma grande amiga irmã. Seu companheirismo na reta final me ajudou a ter serenidade para concluir o trabalho. Agradeço a sua família também, que sempre me trataram com muito carinho.

A minha goiana favorita, Ludmila, seu apoio e amizade nesses últimos meses me trouxe muita força e coragem. Uma pessoa muito verdadeira, gentil e amável. Sentirei muita falta de tomar um cafezinho na cantina com você. Espero algum dia conhecer Goiânia com você.

Aos amigos que a pós-graduação trouxe, onde sempre pude conversar e partilhar das nossas experiências, sou muito grato, em especial a Mariana Benício, Alexandra, Priscila, Natany, Heitor, Nikollas, Nathanne, Fernanda, Ricardo, Helo, Camila, George, Júlio e ao casal mais querido do departamento, Júnia e Matheus.

As pessoas que me ajudaram a crescer pessoalmente fora do ambiente da pós-graduação, em especial a Priscila Rivas e Camila Oliveira. Vocês foram essenciais para a minha caminhada, e para lembrar que a vida precisa de pausas para respirar.

A cidade de Ribeirão Preto e aos amigos que me trouxe ao longo desses 7 anos, em especial a Ana Pitombeira e Elaine Gomes.

Ao laboratório do professor *Dr. José Antunes Rodrigues* e da *Dra. Lucila Leico Kagohara Elias*. Onde pude realizar as análises do labirinto em cruz elevado de RT-PCR, em especial a *Milene Mantovani* e ao *Lucas* pela ajuda e ensinamentos nas análises de RT-PCR.

Ao *Rubens Fernando de Melo*, *Rogério Rosário Azevedo*, por todo apoio técnico, e em especial a *Marina Holanda*, obrigado por toda ajuda em todos os radioimunoensaios, preparo das soluções e companhia no laboratório nesses últimos anos. E ao Humberto e Mariulza, pelo carinho e apoio.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Fisiologia, *Elisa*, *Cláudia*, *Fernando* e *Higor*. E a *querida Maria Luísa*, pelo cafezinho preparado com muito carinho desde o meu mestrado até os meus primeiros anos do doutorado.

A *CAPES* pelo fornecimento da bolsa e a *FAPESP* e o *CNPq* pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

de BARCELLOS-FILHO, P. C. G. **Efeitos da corticosterona e do estrógeno na atividade do eixo HPA de ratas: comportamento e comprimento dos telômeros.** Ribeirão Preto, 2018. 122 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2018.

O estresse crônico promove diversas alterações no funcionamento de um organismo. O aumento de glicocorticoides pode interferir no estado físico e psicológico de um indivíduo. Trabalhos recentes correlacionam estresse psicossocial crônico à redução do comprimento dos telômeros de determinadas células. E o estrógeno, além de ser um fator modulador da atividade do sistema de estresse, também pode interferir no comprimento dos telômeros. O objetivo desse trabalho foi verificar se a exposição crônica aos glicocorticóides promove alterações no comprimento dos telômeros de áreas encefálicas envolvidas no controle da atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) e em respostas comportamentais de ratas, e se o estrógeno pode modular essas alterações. Ratas Wistar ovariectomizadas foram tratadas com cipionato de estradiol (50 ou 100 µg/kg, s.c.) ou óleo, e submetidas à administração de corticosterona 20 mg/Kg ou veículo (salina isotônica 2% Tween 80, s.c.), durante 28 dias. No 25^o dia os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, e no 27^o dia, ao teste de labirinto em cruz elevado. No dia subsequente ao término do tratamento hormonal, os animais foram eutanasiados para coleta do sangue, cérebro e hipófise. O tratamento com cipionato de estradiol causou: aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona e progesterona; redução da expressão de mRNA para CRH, AVP e POMC no PVN; um efeito ansiolítico avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado; um efeito depressivo indicado pelo teste de nado forçado; reduziu o tamanho da amígdala central e hipocampo dorsal, mas não no PVN. A corticosterona causou: redução da secreção de gonadotrofina; redução da expressão de RNA mensageiro para CRH e POMC e aumento para AVP no PVN; um efeito depressivo indicado pelo teste de nado forçado. O conjunto de resultados mostra que modificação na atividade do eixo HPA e a variação das concentrações plasmáticas de estrógeno podem provocar diversas alterações de ações hormonais, atividades comportamentais e de estrutura do DNA em áreas cerebrais.

Palavras-Chaves: Corticosterona, Estrógeno, Comportamento, Telômero.

ABSTRACT

de BARCELLOS-FILHO, P. C. G. **Effects of corticosterone and estrogen on HPA axis activity in rats: behavior and telomere length.** Ribeirão Preto, 2018. 122 f. PhD thesis- Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. 2018.

Chronic stress promotes several changes in the functioning of an organism. Increased glucocorticoids may interfere with an individual's physical and psychological state. Recent works correlate chronic psychosocial stress to the reduction of the telomere length of certain cells. And estrogen, besides being a modulating factor of the activity of the stress system, can also interfere in the length of telomeres. The objective of this study was to verify if chronic exposure to glucocorticoids promotes changes in telomere length of encephalic areas involved in the control of hypothalamic-hypophysis-adrenal (HPA) axis activity and in rat behavioral responses, and whether estrogen can modulate these changes. Ovariectomized Wistar rats were treated with estradiol cypionate (50 or 100 µg / kg, s.c.) or oil, and given 20 mg / kg corticosterone or vehicle (isotonic saline 2% Tween 80, s.c.) for 28 days. On the 25th day the animals were submitted to the forced swim test, and on the 27th day, the elevated plus maze test. On the day after the end of the hormonal treatment, the animals were euthanized for collection of blood, brain and pituitary gland. Treatment with estradiol cypionate caused: increased corticosterone and progesterone plasma concentrations; reduction of mRNA expression for CRH, AVP and POMC in PVN; an anxiolytic effect as assessed by the elevated plus maze test. A depressive effect indicated by the forced swim test; reduced size in the central amygdala and dorsal hippocampus, but not in PVN. Corticosterone caused: reduction of gonadotrophin secretion; reduction of mRNA expression for CRH and POMC and increase for AVP in PVN; a depressive effect indicated by the forced swim test. The set of results shows that changes in HPA axis activity and variation in plasma estrogen concentrations can lead to several changes in hormonal actions, behavioral activities and DNA structure in brain areas.

Keywords: Stress, Corticosterone, Estrogen, Behavior, Telomere.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do eixo HPA (MASTORAKOS et al., 2005).	20
Figura 2: Localização dos telômeros e sua composição por sequencias repetidas de DNA. (CALADO; YOUNG, 2009).....	27
Figura 3: Delineamento experimental.....	35
Figura 4: Teste de nado forçado. Tanque de acrílico utilizado para os testes.....	37
Figura 5: Labirinto em cruz elevado. Aparato utilizado para realização do teste de ansiedade.....	38
Figura 6: Diagramas indicativos dos locais de microdissecção: (A) núcleo paraventricular; (B) Amígdala Central e Hipocampo dorsal; (C) Hipocampo dorsal..	39
Figura 7: Estrógeno e corticosterona reduzem o ganho de peso corporal. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (B) 20 mg / kg s.c. diluição em salina isotônica e Tween-80 2 % ou com o veículo (A) por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0.05 com OVX + SAL; (#) p< 0.05 com OVX + CORTICO. n = 8-10 animais por grupo.....	45
Figura 8: Efeitos do cipionato de estradiol e corticosterona na concentração plasmática de estrógeno. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. ,diluição em salina isotônica e Tween 80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0.05 OVX + SAL. n = 7-10 animais por grupo.	46
Figura 9: Cipionato de estradiol reduz, enquanto a corticosterona aumenta a secreção de LH. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween 80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0,05 OVX + SAL; (#) p< 0,05 com OVX + CORTICO. n = 9-10 animais por grupo.....	47

Figura 10: Cipionato de estradiol reduz a secreção de FSH, mas o tratamento com corticosterona aumenta a secreção de FSH. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0,05 OVX + SAL; (#) p< 0,05 com OVX + CORTICO. n = 9-10 animais por grupo.48

Figura 11: Concentração plasmática de corticosterona. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0,05 OVX + SAL; ; (#) p< 0,05 com OVX + CORTICO. n = 9-10 animais por grupo.49

Figura 12: Concentração plasmática de progesterona em ratas. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0,05 OVX + SAL. n = 7-10 animais por grupo.50

Figura 13: RT-PCR de mRNA para CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50µg/kg and 100µg / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX/Cortico. (C) OVX/ Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50µg/kg e 100µg/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media ±S.E.M. Diferença significativa: (*) p< 0,05 OVX + SAL. n = 4 ratas por grupo.51

Figura 14: RT-PCR para mRNA de AVP no núcleo paraventricular do hipotálamo. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50µg/kg and 100µg / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX/Cortico. (C) OVX/ Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50µg/kg e 100µg/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. diluído em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o

veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 4$ animais por grupo.53

Figura 15: RT-PCR de mRNA para POMC na hipófise. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50 μ g/kg and 100 μ g / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX/Cortico. (C) OVX/ Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50 μ g/kg e 100 μ g/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. diluído em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 4$ animais por grupo.55

Figura 16: Número de entradas (A) e tempo (B) no braço aberto exibidos em sessão de 5-min no labirinto em cruz elevado. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0.05$ com OVX + CORTICO. $n = 8-10$ animais por grupo.57

Figura 17: Imobilidade (A) e Latência para o primeiro episódio de imobilidade (B) no teste de nado forçado. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0.05$ com OVX + CORTICO. $n = 7-8$ animais por grupo.60

Figura 18: Comprimento dos telômeros no núcleo paraventricular do hipotálamo, mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. $n = 8$ animais por grupo.61

Figura 19: Comprimento dos telômeros na amígdala central, mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg

s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 8$ animais por grupos.62

Figura 20: Comprimento dos telômeros no hipocampo dorsal mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50 μ g/Kg e 100 μ g/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em media $\pm$ S.E.M. $n = 7-8$ animais por grupo63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequencias dos <i>primers</i> utilizados no método RT-PCR, para amplificação de mRNA de CRH, AVP e POMC.	41
Tabela 2: Sequencias dos <i>primers</i> utilizados no método qPCR, para amplificação do telômero e <i>Single Gene (RPL30)</i>	42
Tabela 3: Parâmetros analisados no Teste do Labirinto em Cruz elevado. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 8-10$ animais por grupo.	58
Tabela 4: Parâmetros analisados no Teste de Nado Forçado. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 7-8$ animais por grupo.	59

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

µg: micrograma

ACTH: Hormônio Adreno Corticotrofo

AVP: Vasopressina

CRH: Hormônio estimulador das corticotrofinas

FSH: Hormônio Folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador das gonadotrofinas

GR: Receptor para glicocorticoide

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPG: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

i.m.: Intramuscular

kg: quilograma

LH: Hormônio luteinizante

LC: Locus coeruleus

mg: miligrama

ng: nanograma

MR: Receptor para mineralocorticoide

NE: noradrenalina

POMC: Pro-opiomelanocortina

PVN: Núcleo Paraventricular

q-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativo

RIE: Radioimunoensaio

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

mRNA: RNA mensageiro

s.c.: subcutâneo

SNC: Sistema Nervoso Central

ip: intraperitoneal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL (HPA).....	20
1.1.1 Áreas cerebrais envolvidas no controle do eixo HPA	21
1.1.3 Glicocorticóides	22
1.1.3 Receptores para glicocorticóides	24
1.2 ESTRESSE E EIXO HPA.....	24
1.3 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADAS EM FÊMEAS.....	25
1.3.1 Estrógeno e Eixo HPA.....	26
1.4 TELÔMERO.....	26
1.4.1 Estresse e telômeros.....	28
1.4.2 Estrógeno, estresse e telômeros.....	29
2. OBJETIVOS E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS	34
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	34
3.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO - OVARECTOMIA	35
3.4 DOSAGENS HORMONAIS POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	35
3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	36
3.5.1 Labirinto em cruz elevado	37
3.5.2 Teste de nado forçado.....	36
3.6 MICRODISSECÇÃO DE ÁREAS CEREBRAIS	38
3.7 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL	39
3.7.1 Extração de RNA.....	39
3.7.1 Rt-PCR	40
3.8 ANÁLISE DO COMPRIMENTO TELOMÉRICO.....	41
3.8.1 Extração de DNA:.....	41
3.8.2 PCR quantitativo (qPCR):	41
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4. RESULTADOS	45
4.1 PESO CORPORAL.....	45

4.2 ESTRÓGENO	45
4.3 LH E FSH.....	46
4.4 CORTICOSTERONA	48
4.5 PROGESTERONA.....	49
4.6 Expressão de RNA mensageiro (RT- PCR)	50
4.6.1 CRH	50
4.6.2 AVP	52
4.6.3 POMC	54
4.7 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	56
4.8 TESTE DE NADO FORÇADO	58
4.9 COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS	61
4.9.1 PVN.....	61
4.9.2 Amígdala central.....	61
4.9.3 Hipocampo dorsal	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética.....	86
ANEXO B – Artigo relacionado à Tese.....	88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL (HPA)

A capacidade de manter o meio interno em equilíbrio, independente das alterações do meio externo, é definida como homeostase (PACÁK; PALKOVITS, 2001; TORDAY, 2015). O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é um dos componentes na resposta de estresse em mamíferos, e sua regulação determina as concentrações plasmáticas de glicocorticoides (SMITH; VALE, 2006; VARGHESE; BROWN, 2001). Os fatores que promovem a ativação dos componentes do sistema de estresse podem ser classificados em físicos, sociais, psicológicos, e os que alteram a homeostase cardiovascular e metabólica. (VAN DE KAR; BLAIR, 1999) A manutenção e o restabelecimento da homeostase envolvem uma coordenação precisa de várias áreas cerebrais. As informações são processadas pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) através de circuitos límbicos prosencefálicos (PACÁK; PALKOVITS, 2001; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Figura 1: Representação esquemática do eixo HPA (MASTORAKOS et al., 2005).

O PVN é principal núcleo que regula a atividade do eixo estressor (HERMAN et al., 2016; SMITH; VALE, 2006). Neurônios parvocelulares, localizados no PVN, são responsáveis pela síntese e secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (AVP) na circulação porta-hipofisária da eminência mediana (AGUILERA; LIU, 2012; ITOI et al., 1999). Estes hormônios estimulam a transcrição da pró-opiomelanocortina (POMC), na hipófise anterior. Entre os produtos da clivagem da POMC está o ACTH, que atinge a circulação sistêmica estimulando o córtex da adrenal a secretar os glicocorticoides. (SMITH; VALE, 2006). O controle da secreção dos hormônios do eixo HPA é realizado por mecanismo de retroalimentação negativa, pelo qual os glicocorticoides atuam no hipotálamo (PVN), na hipófise, e em áreas prosencefálicas límbicas (TILBROOK; TURNER; CLARKE, 2000). Na figura 1 encontra-se uma representação esquemática do eixo HPA.

1.1.1 Áreas cerebrais envolvidas no controle do eixo HPA

Além do PVN, principal região encefálica envolvida no controle da secreção dos glicocorticóides, outras áreas cerebrais estão envolvidas no controle da resposta de estresse. Essas regiões enviam projeções que interferem na atividade dos neurônios parvocelulares localizados no PVN, entre as quais estão:

- A área préóptica ventrolateral (VLPO), situada na região anterior ao hipotálamo, envolvida entre outras funções, na regulação do sono e do ritmo circadiano (SCHWARTZ; ROTH, 2008).
- Núcleo leito da estria terminal (BST), que se destaca por participação no controle da atividade autonômica, neuroendócrina e do sistema motor somático (DUMONT, 2009).
- Hipotálamo dorso-medial, região ventro-medial (vDMH), adjacente ao terceiro ventrículo, que medeia respostas cardiovasculares e comportamentais durante estresse emocional (DIMICCO et al., 2002).
- Córtex pré-frontal medial (mPFC), envolvido tanto nos mecanismo de memória como de elaboração de decisões (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012).
- Núcleos central e medial da Amígdala, envolvidos no controle das emoções (GALLAGHER; CHIBA, 1996).

- Núcleo do trato solitário, localizado no bulbo do tronco encefálico, que atua principalmente no controle dos sistemas cardiovascular e respiratório (ALHEID; MCCRIMMON, 2008)
- O hipocampo que envia projeções diretas para o PVN e indiretas através dos outros núcleos, realizando uma ação de orquestrador da resposta de estresse, através do subículo ventral (RADLEY; SAWCHENKO, 2011).

Algumas dessas áreas enviam ao PVN, projeções inibitórias (BST, vDMH, Amígdala central e medial, e VLPO), outras enviam projeções estimulatórias (NTS e mPFC). (HERMAN; MUELLER, 2006).

Além do subículo ventral, outras regiões do hipocampo tem envolvimento com o controle do eixo HPA. A parte dorsal do hipocampo está envolvida principalmente nos processos da memória, enquanto a parte ventral está relacionadas aos processos emocionais, de ansiedade e estresse (FANSELOW; DONG, 2010; FUSTER-MATANZO et al., 2011). O hipocampo é uma região bastante afetada pelo aumento da atividade do eixo HPA, podendo levar a um processo de neurodegeneração (KIM; YOON, 1998; RESER, 2016; VYAS et al., 2016). Apesar da distinção funcional da parte dorsal e ventral, as duas regiões são afetadas pelo aumento de glicocorticóides (DOREY et al., 2012).

1.1.3 Glicocorticóides

Os glicocorticoides são hormônios esteroides, produzidos na zona fasciculada do córtex da adrenal (HYATT; BHATT; TAIT, 1983). Atuam no metabolismo lipídico, estimulando a diferenciação dos adipócitos, promovendo adipogênese (AYALA-SUMUANO et al., 2013). Promovem alterações catabólicas no tecido muscular, pela inibição da síntese de proteínas (CUTRONEO, 2002); agem principalmente no metabolismo dos carboidratos, estimulando a neoglicogênese hepática, aumentando a disponibilidade de substratos energéticos ao organismo (MCMAHON; GERICH; RIZZA, 1988; OLEFSKY; KIMMERLING, 1976). Além dessas ações, também atua na pele, rins, ossos, sistemas cardiovascular e imune (MANGOS et al., 2003; NUSSINOVITCH et al., 2010; SCHOEPE et al., 2006; ZHOU; COOPER; SEIBEL, 2013).

O principal glicocorticoide produzido é o cortisol na espécie humana, e a corticosterona em roedores. A secreção desses hormônios apresenta um ritmo

circadiano. O pico maior de secreção desses hormônios ocorre no período que antecede o início das atividades, de um determinado organismo. Em humanos, o pico de secreção ocorre no início da manhã, e em roedores, perto do início da noite. Ao longo do dia, a secreção dos glicocorticóides ocorre de forma pulsátil, caracterizada por períodos de secreção de hormônio intercalados por períodos de inibição do eixo HPA. Essa forma de secreção dos glicocorticóides caracteriza um ritmo ultradiano (WALKER; TERRY; LIGHTMAN, 2010; WINDLE et al., 1998). O ritmo circadiano é dependente do estado sono-vigília padrão e do hábito alimentar sendo, portanto alterado quando se troca o dia pela noite (GAMBLE et al., 2014). A secreção também é controlada por fatores que provocam situações de estresse ao organismo (HERMAN et al., 2012).

Concentrações elevadas de glicocorticóides na circulação sanguínea induzem resistência periférica à insulina e inúmeras desordens metabólicas, além de problemas cardiovasculares como a elevação da pressão arterial, supressão do sistema imunológico e do eixo HPA (ANDREWS; WALKER, 1999; COUTINHO; CHAPMAN, 2011; RENSEN et al., 2017). Sua ação antagônica impede o mecanismo anabólico da insulina aumentando a resistência à insulina, além de levar à diabetes do tipo (DI DALMAZI et al., 2012).

Anormalidades do eixo, com concentrações elevadas de glicocorticóides, podem levar a transtornos psiquiátricos (CIRIACO et al., 2013; VARGHESE; BROWN, 2001) e essas anormalidades aparentam estar relacionadas às mudanças na capacidade dos glicocorticóides circulantes em promover retroalimentação negativa na secreção dos hormônios. Por exemplo, na depressão melancólica há descrição de uma desregulação da retroalimentação negativa no eixo HPA (DINAN; SCOTT, 2005). A hipertrofia da adrenal pode ser encontrada em pacientes deprimidos, já que a glândula adrenal aumentada é capaz de compensar a resposta aumentada de ACTH ao CRH (NEMEROFF et al., 1992).

Pacientes com concentrações plasmáticas de glicocorticóides elevadas cronicamente, são caracterizados com a síndrome de Cushing, resultante de uma secreção endógena crônica e excessiva de cortisol (GEER; ISLAM; BUETTNER, 2014). Uma das causas é o aumento da secreção de ACTH, que pode ser devido a um adenoma corticotrófico, ou em situações raras, a tumores que elevam a secreção de CRH hipotalâmico (SHAHANI et al., 2010). Tumores adrenocorticais também podem acarretar um excesso na secreção de cortisol (STRATAKIS, 2008).

1.1.3 Receptores para glicocorticóides

Há identificação de dois subtipos de receptores para adrenocorticóides : os receptores para mineralocorticoides (MR), e os receptores para glicocorticóides (GR). A expressão de MR no encéfalo é mais restrita, e é verificada no núcleo septal e no hipocampo, subículo e giro denteado. O GR é expresso em mais áreas encefálicas, tais como área septal, hipocampo, amígdala central e núcleo do Trato solitário (NTS). Outras áreas apresentam expressão menor de GR como PVN, locus coeruleus, rafe e subículo (REUL; DE KLOET, 1985). Os GR estão envolvidos em respostas agudas da liberação de glicocorticóides, como por exemplo, durante um estresse de contensão agudo, já os receptores para mineralocorticoides (MR) estão envolvidos tanto na liberação basal de glicocorticoide, como durante o estresse crônico (LIGHTMAN, 2008).

1.2 ESTRESSE E EIXO HPA

A regulação do eixo HPA é fundamental para a sobrevivência de um organismo (HERMAN et al., 2016; STEPHENS; WAND, 2012). O estresse envolve alterações emocionais e físicas que geram determinadas respostas endócrinas e cardiovasculares. Verificam-se, alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e aumento na liberação de hormônios relacionados ao estresse como as catecolaminas e corticosterona (NISHIOKA et al., 1998). A manutenção e o restabelecimento da homeostase envolvem uma coordenação precisa de respostas neurovegetativas, neuroendócrinas, imunes e comportamentais, em que o eixo HPA atua como um dos componentes efetores do sistema de estresse (PACÁK e PALKOVITS, 2001). Além do eixo HPA, o sistema simpático adrenomedular é outro importante componente na resposta de estresse. Esses sistemas participam da mobilização e redistribuição de energia, de oxigênio e nutrientes para órgãos e tecidos. Ambos os sistemas são fundamentais na preparação metabólica e cardiovascular do organismo. Esses dois sistemas integram a comunicação, entre o sistema nervoso central e a periferia, com o objetivo de coordenar e sincronizar tanto a nível celular, como em tecidos e órgãos, a interação com o ambiente (GOLDSTEIN, 2010; KOOLHAAS et al., 2011).

O tempo de duração de uma situação de estresse indica como o hipotálamo vai promover a ativação do eixo HPA. Durante um estresse agudo, há uma preferência na liberação de CRH para ativar o eixo HPA, já durante um estresse de duração crônica a secreção de CRH é menos relevante que a de AVP para ativação do eixo HPA (AGUILERA; PHAM; RABADAN-DIEHL, 1994; GONCHAROVA, 2013). Além do tempo de duração, os receptores para glicocorticóides também tem preferência na sua ativação. Os receptores para glicocorticóides (GR) estão envolvidos em respostas agudas da liberação de glicocorticóides, como por exemplo, durante um estresse de contensão agudo, já os receptores para mineralocorticoides (MR) estão envolvidos tanto na liberação basal de glicocorticóide, como durante situação crônica estresse. (LIGHTMAN, 2008)

Ativação prolongada do eixo HPA por determinados estressores, induz a liberação crônica de glicocorticóides que agem em células com expressão de seus receptores. A ação dos glicocorticóides no sistema nervoso central está associada a mudanças neuroquímicas, inclusive degeneração de tecido cerebral. (VYAS et al., 2016) O hipocampo é uma área sensível à elevação da concentração de glicocorticóides, e participa como um regulador do eixo HPA. (HERMAN et al., 1989). Exposição prolongada aos glicocorticóides, como por exemplo, durante a administração crônica de corticosterona, leva a alterações comportamentais semelhantes à depressão; conforme verificado pelos testes de nado forçado (LEE et al., 2013)

1.3 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADAS EM FÊMEAS

O ciclo reprodutivo das fêmeas depende da liberação coordenada dos hormônios sexuais (CHRISTENSEN et al., 2012). Os neurônios produtores do hormônio liberador das gonodotrofinas (GnRH), distribuem-se ao longo do núcleo pré-óptico hipotalâmico em mamíferos (KUENZEL; BLÄHSER, 1991), sendo o ponto de integração para outras regiões do cérebro que controlam o sistema reprodutor (HERDE et al., 2013; POMPOLO; RAWSON; CLARKE, 2001). O GnRH é responsável por estimular a secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pelos gonadotrofos da hipófise anterior (KUMAR; SAIT, 2011; TSUTSUMI; WEBSTER, 2009). As gonadotrofinas atingem a circulação sistêmica, atuando diretamente sobre a gônada feminina, o ovário. O FSH é responsável pela

maturação e crescimento dos folículos ovarianos (KUMAR et al., 1997), enquanto o LH é responsável por estimular a ovulação, e formação do corpo lúteo (KUMAR et al., 1997). O estrógeno e a progesterona são os principais esteroides secretados pelos ovários. A secreção de estrógeno ocorre principalmente na fase folicular, já a progesterona é secretada na fase lútea pelo corpo lúteo (VERMEULEN, 1976).

1.3.1 Estrógeno e Eixo HPA

Os hormônios ovarianos interferem na secreção de corticosterona. Estão bem estabelecidas as diferenças sexuais na atividade do eixo HPA. Ao longo do ciclo ovariano são observadas flutuações na atividade do eixo HPA correlacionadas à quantidade de hormônios sexuais femininos circulantes. Uma atividade maior é vista no final da fase folicular em mulheres e no proestro em ratas (CAREY et al., 1995), indicando uma modulação positiva dos hormônios femininos na secreção de glicocorticoides. Os hormônios ovarianos podem modular a atividade do eixo HPA pela ação da OT, induzindo um aumento de secreção de glicocorticóides produzidos pela adrenal. Porém, em situações de estresse o estrógeno tanto pode diminuir como aumentar a secreção de glicocorticoides, dependendo da sua concentração plasmática (OCHEDALSKI et al., 2007).

Os receptores de estrógeno são de dois tipos, o ER α e ER β , amplamente expressos em diversas áreas do encéfalo envolvidas no processamento de estímulos emocionais, como hipocampo, amígdala, hipotálamo, córtex frontal e núcleos da rafe (GERRITS et al., 2005).

1.4 TELÔMERO

A terminação dos cromossomos das células eucarióticas é constituída por sequência simples de nucleotídeos e proteínas, denominados de telômeros. (BLACKBURN et al., 1989; GREIDER, 1990). Seis sequencias de nucleotídeos repetidos representam os telômeros em humanos (TTAGGG) $_n$. (HUANG et al., 2014; MOYZIS et al., 1988). Os telômeros têm como função estabilizar as terminações dos cromossomos, protegendo-os de degradações, fusões e rearranjos (BLACKBURN, 1991; LU et al., 2013). Durante o processo de síntese de DNA e divisão celular, a

redução de pares de bases que compõem os telômeros é um processo natural, decorrente da replicação linear incompleta dos cromossomos (LU et al., 2013; MURAKI et al., 2012; SHAMMAS, 2011). Na figura 2 encontra-se a localização dos telômeros e a representação da sua composição.

A telomerase, uma proteína telomérica, regula o tamanho dos telômeros (BLACKBURN, 1990; CALADO RODRIGO T.; CHEN JICHUN, 2006). Ela é uma ribonucleoproteína, composta por um RNA e uma proteína, a transcriptase reversa da telomerase (TERT). Esta enzima alonga o cromossomo adicionando sequência de TTAGGG em suas terminações, que promove a extensão da região telomérica composta por fita única (GREIDER; BLACKBURN, 1985). Utilizando como fita-molde o próprio RNA da telomerase, a TERT consegue copiá-lo e estendê-lo. Desta forma, a telomerase promove a regulação da extensão das terminações do DNA telomérico para compensar o encurtamento, que ocorre devido à ação de nucleases e replicação incompleta do DNA (GOMEZ et al., 2012). A telomerase está mais ativa em células tronco, germinativas, glóbulos brancos, e células de origem tumorais. Mas em alguns casos os telômeros podem ser mantidos sem a telomerase, por mecanismos de recombinação homólogas (HUANG et al., 2014).

Figura 2: Localização dos telômeros e sua composição por sequências repetidas de DNA. (CALADO; YOUNG, 2009)

Como a redução do comprimento telomérico está associada ao processo de divisão celular, o tamanho dos telômeros é inversamente proporcional à idade de um organismo. O encurtamento dos telômeros pode levar a um bloqueio da divisão celular. Esse mecanismo evita o desenvolvimento de câncer, pelo bloqueio da

mitose (AUBERT; LANSDORP, 2008). Determinadas doenças estão associadas ao telômero. Em pacientes com anemia aplástica, tanto hereditária como adquirida, o telômero é menor. Essas alterações no comprimento telomérico podem ser decorrentes de mutações que afetam a telomerase. Mutações na telomerase também estão associadas à fibrose hepática e pulmonar. Além disso, o encurtamento dos telômeros está associado como fator de risco para doenças cardiovasculares (CALADO; YOUNG, 2009).

Os telômeros de humanos possuem comprimento de 5 a 15 kbp (MOYZIS et al., 1988). Em ratos o comprimento dos telômeros pode chegar de 20 a 100 kbp de tamanho (CHERIF et al., 2003). Os telômeros de células somáticas proliferativas encurtam-se progressivamente. Alguns tecidos que possuem atividade celular alta apresentam encurtamento maior dos telômeros. Enquanto tecidos com baixa proliferação celular tem comprimento dos telômeros bastante estáveis (NASIR et al., 2001).

1.4.1 Estresse e telômeros

Estudos demonstram uma associação positiva entre a exposição a ambientes sociais desfavoráveis e a morbidade e a mortalidade. Um mecanismo para explicar essa associação é o estresse crônico, que é responsável por degradar o estado fisiológico. O comprimento dos telômeros é menor em adultos numa variedade de contextos, incluindo a posição social desfavorecida e a depressão (MITCHELL et al., 2014). O estresse crônico está relacionado ao aceleração do encurtamento do telômero, aumento de estresse oxidativo e com isso o aumento do envelhecimento celular (AULINAS et al., 2013). Trabalhos recentes correlacionam redução do comprimento dos telômeros de determinadas células com estresse psicossocial crônico. Foi demonstrado por Choi e colaboradores (2008) que a exposição de linfócitos T ao cortisol promoveu significativa redução da atividade da enzima telomerase (CHOI; FAUCE; EFFROS, 2008). Em pacientes com depressão, nos quais as concentrações de cortisol encontravam-se elevadas, o comprimento do telômero dos leucócitos é menor, (WIKGREN et al., 2012). Os efeitos dos glicocorticóides sobre os telômeros são complexos e podem depender da intensidade e da exposição aos hormônios (AULINAS et al., 2013).

1.4.2 Estrógeno, estresse e telômeros

O sexo pode influenciar no comprimento dos telômeros. Homens tem um encurtamento maior dos telômeros ao longo da vida (BARRETT; RICHARDSON, 2011). Essa diferença pode estar correlacionada aos hormônios sexuais secretados. Trabalho conduzido por Lin e colaboradores (2001) mostrou que em mulheres submetidas à exposição mais longa ao estrógeno, no período entre a menarca e menopausa, a redução do comprimento dos telômeros foi menor do que em mulheres com exposição menor ao estrógeno. O estrógeno endógeno pode estar associado à desaceleração do envelhecimento celular (LIN et al., 2011).

Assim como o estresse altera o comprimento dos telômeros, o estrógeno tem ação moduladora sobre a secreção dos glicocorticóides, demonstrada em animais ovariectomizados, em que a ausência dos hormônios ovarianos elimina as diferenças de gênero na secreção de corticosterona. A reposição com estrógeno reestabelece as diferenças da atividade do eixo HPA (KITAY et al., 1965). O estradiol pode interagir tanto com componentes centrais como periféricos do eixo HPA, modulando a síntese e a liberação do CRH, ACTH e dos glicocorticóides (VAMVAKOPOULOS; CHROUSOS, 1993).

Considerando que o estresse pode promover alterações no comprimento do telômero. Os glicocorticoides, no caso do rato a corticosterona, poderia alterar o comprimento dos telômeros de células do tecido encefálico, devido à sua exposição prolongada. O estrógeno, além de modular o eixo HPA, pode atuar como fator protetor do encurtamento dos telômeros, principalmente durante situações de estresse, onde as concentrações de glicocorticóides encontram-se elevadas.

OBJETIVOS E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

2. OBJETIVOS E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a exposição crônica aos glicocorticóides promove alterações no comprimento dos telômeros de áreas encefálicas envolvidas no controle da atividade do eixo HPA e em respostas comportamentais, e se essas alterações podem ser moduladas por diferentes concentrações de estrógeno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar em ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento prolongado com corticosterona e a diferentes concentrações de estrógeno:

- O comprimento dos telômeros de tecidos encefálicos como amígdala central, hipocampo dorsal e PVN (estruturas envolvidas em mecanismos de controle do eixo HPA);
- A concentração plasmática de corticosterona, progesterona, estrógeno, LH e FSH;
- A expressão de RNA mensageiro (mRNA) para CRH e AVP no PVN e para POMC na hipófise;
- O comportamento exploratório no labirinto em cruz elevado;
- O comportamento no teste de nado forçado.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

- Grupo I- **Controle** - Ratas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de milho) e:

I. 1 Tratadas com corticosterona por 28 dias

I. 2 Tratadas com veículo por 28 dias

- Grupo II- Reposição de **estrógeno 50 ug/kg** - Ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno e:

II. 1 Tratadas com corticosterona por 28 dias

II. 2 Tratadas com veículo por 28 dias

· Grupo III- Reposição de **estrógeno 100 ug/kg** - Ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno e:

III. 1 Tratadas com corticosterona por 28 dias

III. 2 Tratadas com veículo por 28 dias

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar, pesando cerca de 150 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto-SP. As ratas foram mantidas em número de cinco por caixa com dimensões de 45 cm X 31,5 cm X 16 cm, no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura monitorada em torno de 21 ± 1 °C, num ciclo claro escuro de 12h/12h (claro das 6:00h às 18:00h). Os procedimentos foram realizados seguindo os protocolos, as normas e os princípios éticos de experimentação com animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COEBA) e aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (nº 062/2014).

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A figura 3 mostra um esquema geral do protocolo experimental. Os animais passaram por 4 dias de aclimação após a chegarem do Biotério Central. Em seguida à cirurgia de ovariectomia bilateral, os animais foram divididos em três grupos: Grupo I- Ratas tratadas com veículo (óleo de milho) utilizado para diluição do estrógeno; Grupo II- Ratas tratadas com injeção diária de 50 µg/kg de cipionato de estradiol (Pharmacia Brasil) s.c., e durante 28 dias; Grupo III- Ratas tratadas com injeção diária de 100 µg/kg de cipionato de estradiol s.c., durante 28 dias. Cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: um subgrupo tratado com corticosterona (CT) 20mg/kg s.c. (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (SKÓRZEWSKA et al., 2006) diluída em salina isotônica 2% Tween 80 (KULA et al., 2016) por 28 dias; e outro subgrupo tratado com veículo por 28 dias. O início dos tratamentos com estrógeno, corticosterona e respectivos veículos ocorreu no dia subsequente à cirurgia de ovariectomia. No 25º dia os animais foram submetidos ao teste de nado forçado; no 27º dia, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado; no dia posterior ao 28º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação. Amostras de sangue, o cérebro e a hipófise foram retiradas para diferentes análises.

Figura 3: Delineamento experimental

3.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO - OVARIECTOMIA

As ratas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal (*ip*) de ketamina (100mg/kg, Agener®, Brasil) e xilazina (20mg/kg, Dopaser®, Espanha) para as cirurgias de ovariectomia bilateral. Os animais foram submetidos à tricotomia para realização de incisão bilateral na pele e no tecido conjuntivo subcutâneo na região para-costal. Em seguida, foi realizada a incisão da musculatura abdominal para visualização dos ovários, que foram exteriorizados para ligadura das trompas, artérias e veias ovariana, e em seguida removidos. Por fim, foi realizada a sutura da musculatura e da pele. Os animais receberam dose profilática de pentabiótico veterinário (0,2ml/rata, Wyeth, Brasil, i.m.) e dose de analgésico flunixinina meglumina (Banamine, 50ug), s.c. (Schering -Plough.Veterinária, Brasil).

3.4 DOSAGENS HORMONAIS POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

O sangue coletado em cada experimento foi centrifugado e o plasma congelado a -20°C até a realização das dosagens hormonais por RIE.

As concentrações plasmáticas de progesterona e de estrógeno foram determinadas por meio de conjuntos de reagentes para RIE adquiridos da MP Biomedicals, (Santa Ana, California, USA). Os parâmetros de controle dos ensaios progesterona e estrógeno foram respectivamente: dose mínima detectável de 0,3 ng/ml e 1,2 pg/ml, erro intra-ensaio de 3,5 e 2,5%; inter-ensaio de 6 e 7 %.

As concentrações plasmáticas de LH e FSH foram realizadas por RIE de duplo anticorpo, com anticorpo específico e padrões adquiridos junto ao *National Program of Pituitary Hormone, National Institute of Health (Torrance, Califórnia, USA)*. O Anticorpo secundário para a precipitação da reação do RIE foi produzido em ovelha pelo laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). O LH e FSH foram iodinados e purificados no laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). As doses mínimas detectáveis foram: 0,2 ng/mL para o FSH; e 0,05 ng/mL para o LH. Os erros intra-ensaio foram 3% e 4% respectivamente.

Para dosagem de corticosterona foi realizada a extração prévia com etanol. No RIE para corticosterona foram utilizados padrão e anticorpo específico adquiridos da Sigma Co. (USA) e corticosterona triciada adquirida da Amershan (*Piscataway, New Jersey USA*). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5/0,05%). A dose mínima detectável foi de 0,08 ng/ml, os erros intra-ensaio e inter-ensaio foram 4,5% e 11,4%, respectivamente.

3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.5.2 Teste de nado forçado

Os animais foram submetidos ao teste de nado forçado em cilindros de PVC, com 50 cm de altura e 22 cm de diâmetro (figura 4), com água na profundidade de 30 cm e temperatura média de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Foi realizado um pré-teste no dia anterior ao teste de nado forçado, com duração de 15 minutos. Na sessão teste, 25º de tratamento, os animais foram colocados individualmente por 5 minutos nos tanques de água. O período de realização foi das 08:00 às 10:00 h da manhã. Ao terminar o teste cada animal foi retirado do cilindro e seco com toalha. Entre as sessões, a água do cilindro foi escoada e o cilindro higienizado com álcool (75 %). Para o registro comportamental, os animais foram filmados. Os seguintes comportamentos foram mensurados: flutuação (completa imobilidade ou movimentos suaves, apenas o suficiente para manter o nariz/cabeça acima da superfície da água); escalada (movimentos vigorosos com as patas dianteiras acima da superfície da água ou contra a parede do cilindro); natação (movimentação do animal dentro do cilindro com o corpo na horizontal) e mergulho (quando os animais mergulharam ativamente na parte inferior do tanque)

Figura 4: Teste de nado forçado. Tanque de acrílico utilizado para os testes.

3.5.1 Labirinto em cruz elevado

Foi usado o Teste de labirinto em cruz elevado (figura 5) para avaliação de ansiedade. O labirinto elevado 50 cm do piso consiste em dois braços abertos e dois braços fechados, cruzados em ângulo reto, conectados por uma área central (PELLOW et al., 1985). Este teste consiste em pôr o animal na área central do labirinto com o focinho virado para um dos braços fechados (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O animal pode explorar o ambiente livremente por 5 minutos, registrando-se frequência e tempo gastos em cada braço e a distância neles percorrida. Os ensaios experimentais foram gravados por uma câmera de vídeo suspensa. Deslocamento de um quadrado para outro foram registrados usando software especificamente projetado (X-Plo-Rat 2005) da, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (TEJADA et al., 2017).

Procedimento: A sessão experimental foi realizada na manhã do 27º dia (7:00 da manhã às 9:00 da manhã). Para iniciar a sessão, o rato foi colocado no labirinto com o nariz de frente para um dos braços fechados do labirinto e permitiu explorar

livremente por 5 minutos. Entre as sessões, o labirinto foi limpo com uma solução de etanol a 5% e seco com um pano. O número de entradas e tempo gasto dentro de cada tipo de braço foi registrado.

Figura 5: Labirinto em cruz elevado. Aparato utilizado para realização do teste de ansiedade.

3.6 MICRODISSECÇÃO DE ÁREAS CEREBRAIS

Imediatamente após a decapitação, os cérebros foram removidos e congelados em gelo seco para microdissecção da amígdala central, núcleo paraventricular e hipocampo dorsal, utilizando-se a técnica de microdissecção de Palkovits (PALKOVITS, 1973). O cérebro foi fixado a uma peça apropriada, recoberta com meio próprio para congelamento (*Tissue Tek o.c.t. compound, Miles INC. USA*) e então adaptada ao criostato com temperatura mantida a -15°C . A. Para identificação das áreas analisadas foi utilizado o Atlas anatômico de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). Na figura 6, encontram-se diagramas indicando o local das microdissecções.

Figura 6: Diagramas indicativos dos locais de microdissecção: (A) núcleo paraventricular; (B) Amígdala Central e Hipocampo dorsal; (C) Hipocampo dorsal.

3.7 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL

3.7.1 Extração de RNA

Os cérebros e as hipófises removidos em condições RNase *free* foram estocados sob congelamento a -70°C até a etapa de microdissecção do núcleo a ser estudado. Amostras de tecido cerebral foram obtidas por microdissecção conforme descrição no item anterior. O RNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se TRIzol reagente (*Invitrogen, USA*). O RNA total foi quantificado por meio de espectrofotômetro (*Gene Quant II, Pharmacia Biotech*).

3.7.1 Rt-PCR

Após a etapa acima descrita, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 2 µg de RNA, por kit comercial QuantiNova Reverse Transcription Kit (*Qiagen* - cat nº 205413). O cDNA obtido foi utilizado para as reações de PCR em tempo real. As sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizados para as reações estão descritas na tabela 1. As reações foram realizadas em volumes de 10 µl (2 µl de cDNA + 8 µl de *master-mix/primers*), utilizando reagente *SYBR green PCR Master Mix*, (*Applied Biosystems* cat: 4309155) seguindo as orientações do fabricante. As reações com 40 ciclos foram realizadas em um instrumento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Catálogo 4376600, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*). A expressão dos genes-alvo foi normalizada utilizando-se o controle endógeno e calculada pela comparação com o calibrador (grupo controle dos protocolos experimentais). Desta forma, o resultado obtido representará a expressão relativa de mRNA do gene de interesse. A expressão do mRNA foi calculada usando o método $\Delta\Delta Ct$. O ciclo dos limiares (CT) de cada amostra foi medido e normalizado para a média dos genes de manutenção ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{HouseKeeping-RPL 19}}$). ΔCt foi usado para obter de cada amostra o $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Desconhecido}} - \Delta Ct_{\text{Calibrador}}$). Este valor foi usado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores foram expressos como a expressão de mRNA relativa ao grupo controle em unidades arbitrárias.

Foram utilizados diferentes calibradores:

1. O efeito do tratamento com cipionato de estradiol na expressão de mRNA de CRH, AVP e POMC (o grupo OVX / Salina foi usado como calibrador para o OVX + Estrógeno 50 e 100 µg / Kg);
2. O efeito da corticosterona na expressão de mRNA de CRH, AVP e POMC (o grupo OVX / Salina foi utilizado como calibrador para o OVX / corticosterona);
3. O efeito da corticosterona e do estrógeno na expressão do mRNA de CRH, AVP e POMC (o grupo OVX / corticosterona foi usado como calibrador para o OVX / corticosterona + Estrógeno 50 e 100 µg / Kg).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados no método RT-PCR, para amplificação de mRNA de CRH, AVP e POMC.

Primer	Sequência
POMC F(<i>forward</i>)	TGCCGAGATTCTGCTACACT
POMC R (<i>reverse</i>)	ACCAGCTCCACACGTCTATG
CRH F (<i>forward</i>)	CTCTCTGGATCTCACCTTCCAC
CRH R (<i>reverse</i>)	CTAAATGCAGAATCGTTTTGGC
AVP F (<i>forward</i>)	TGCCTGCTACTTCCAGAACTGC
AVP R(<i>reverse</i>)	AGGGGAGACACTGTCTCAGCTC
RPL 19 F (<i>forward</i>)	GCGTCTGCAGCCATCAGTA
RPL 19 R(<i>reverse</i>)	TGGCATTGGCGATATCGTTGA

3.8 ANÁLISE DO COMPRIMENTO TELOMÉRICO

As análises da quantificação do tamanho dos telômeros foram realizadas no laboratório do professor Dr. Rodrigo do T. Calado de S. Rodrigues, Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP.

3.8.1 Extração de DNA:

A extração do DNA das amostras do tecido cerebral foi realizada de acordo com especificações do *kit* comercial “*DNeasy Blood & Tissue Kit*” (*Qiagen*- cat nº 69506). Após obtenção do DNA purificado, este foi ressuspendido em Solução de Hidratação de DNA e quantificado no aparelho NanoVue (*GE Healthcare Life Sciences*). Ao final, o DNA extraído foi estocado a -20°C até o momento de uso.

3.8.2 PCR quantitativo (qPCR):

O comprimento dos telômeros dos tecidos encefálicos de interesse foi avaliado por PCR quantitativo, utilizando metodologia previamente descrita (CAWTHON, 2002). As amostras de DNA, em triplicata, foram amplificadas com volume total de 24 µL/poço. A reação telômero-específica inclui: DNA (~1,6 ng), 2x Rotor-Gene *SYBR Green PCR Master Mix* (*Qiagen*), [água livre de nuclease

(Qiagen), *primer Tel F* (300µM) e *primer Tel F* (300 µM). A reação do *single gene* (RPL 30) seguiu o mesmo padrão de reagentes. As sequências dos *primers Forward* e *Reverse* são mostradas na tabela 2 .

Todas as reações de qPCR foram pipetadas pelo equipamento Qiagility (Qiagen) e amplificadas pelo termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). A reação termal para ambos *amplicons* foi iniciada com incubação a 95°C por 5 minutos, com subsequentes ciclos de 98°C por 7s e 60°C (telômero) ou 58°C (RPL30-single gene) por 10 s. Foram utilizados 25 ciclos de amplificações para a reação do telômero e 35 ciclos para a reação do *single gene*, com duração aproximada de 46 e 61 minutos, respectivamente. Como forma de validar a reação de qPCR e estimar com maior precisão a concentração das amostras avaliadas utilizou-se uma curva de diluição seriada, 1:2, com seis pontos, variando de 10ng a 0,3125ng. As amostras que não se enquadraram dentro dessa curva foram desprezadas. Os resultados obtidos apenas foram considerados quando apresentaram reações com $R^2 \geq 0,99$ eficiência e torno de 100% e slope = $-3,3 \pm 10\%$.

O comprimento do telômero para cada amostra foi determinado usando a razão entre telômero e “*single gene*” (RPL30) com o cálculo do $\Delta C_t [C_t^{(\text{telômero})}/C_t^{(\text{single gene})}]$. A razão T/S para cada amostra foi normalizada para a significância da razão da amostra de referência [$2^{-(\Delta C_{tx} - \Delta C_{tr})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$], utilizando a curva padrão.

Tabela 2: Sequencias dos *primers* utilizados no método qPCR, para amplificação do telômero e *Single Gene* (RPL30).

Primer	Sequência
Tel F (forward)	CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT
Tel R (reverse)	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT'
Rpl30 (forward)	CAGACGCCAAGATGGCCGGG
Rpl 30(reverse)	AGCGGAAGCAGAAGCCGAGC

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas: concentrações de corticosterona, progesterona, estrógeno, LH, FSH, comprimento do telômero das áreas encefálicas estudadas, tempo no labirinto e tempo no nado forçado foram analisadas inicialmente por representação de histograma e gráfico de normalidade para observar o ajuste na

distribuição normal. Então foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) e *two-way* ANOVA. Na análise da expressão do mRNA para CRH e AVP no PVN e POMC na hipófise, a comparação entre grupos OVX / Salina vs OVX / Salina + Estrógeno 50µg / kg e 100µg / kg, e OVX / Cortico vs OVX / Cortico + Estrógeno 50µg / kg e 100µg / kg, foi feito por um *one-way* ANOVA. A comparação entre os grupos OVX / Salina vs OVX / Cortico foi realizada por teste t Student. Os dados foram plotados como média $\pm$ erro padrão da media. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%. As análises foram conduzidas no programa Statistic 13 . O pós-teste utilizado foi o de Fisher LSD. Os gráficos foram confeccionados no GraphPad Prism 6

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL

O peso corporal aumentou em todos os grupos [$F_{(1, 58)} = 355,15$; $p=0,001$] durante o período experimental de 28 dias. Porém, os grupos tratados com corticosterona e estrógeno tiveram ganho de peso menor que seus respectivos grupos controles [$F_{(1, 58)} = 453,52$; $p=0,001$ e $F_{(1, 58)} = 818,66$; $p=0,001$]. Os resultados estão expressos na Figura 7.

Figura 7: Estrógeno e corticosterona reduzem o ganho de peso corporal. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (B) 20 mg / kg s.c. diluição em salina isotônica e Tween-80 2 % ou com o veículo (A) por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0.05$ com OVX + SAL; (#) $p < 0.05$ com OVX + CORTICO. $n = 8-10$ animais por grupo.

4.2 ESTRÓGENO

A concentração plasmática de estrógeno pode ser observada na figura 8. Os resultados mostram que tratamento com cipionato de estradiol foi efetivo para aumentar as concentrações plasmáticas deste hormônio [$F_{(1, 58)} = 40.227$; $p=0.001$]. O pós-teste também mostrou o aumento das concentrações de estrógeno em todos os grupos que foram tratados estrógeno ($265,20 \pm 24,30$ / $379,67 \pm 46,64$ / $209,43 \pm 47,43$ / $365,09 \pm 69,47$ pg/mL) quando comparados com os grupos tratados com óleo ($43,89 \pm 7,65$ / $95,03 \pm 13,34$ pg/mL).

Figura 8: Efeitos do cipionato de estradiol e corticosterona na concentração plasmática de estrógeno. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. ,diluição em salina isotônica e Tween 80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0.05$ OVX + SAL. $n = 7-10$ animais por grupo.

4.3 LH E FSH

Figure 9 mostra a concentração plasmática de LH, que foi reduzida pelo tratamento com cipionato de estradiol, em ambas as concentrações utilizadas [$F_{(1, 58)} = 98.337$; $p = 0.001$]. O pós-teste confirmou essa redução. Nos grupos OVX tratados com estrógeno 50 e 100 µg/Kg, que receberam salina ou corticosterona, as concentrações de LH ($0,307 \pm 0,06$ / $0,22 \pm 0,02$ / $0,24 \pm 0,06$ / $0,23 \pm 0,02$ ng/mL) foram menores quando comparadas às concentrações dos grupos tratados com óleo ($2,56 \pm 0,20$ / $6,47 \pm 0,85$ ng/mL). Entretanto, o tratamento com corticosterona aumentou as concentrações de LH [$F_{(1, 58)} = 16,37$; $p = 0,0002$]. A concentração de LH foi maior no grupo OVX tratado com óleo e corticosterona ($6,47 \pm 0,8$ ng/mL) quando comparado com seu respectivo grupo controle, tratado com óleo e salina ($2,56 \pm 0,2$ ng/mL). A análise da interação das duas variáveis também mostrou diferenças entre os grupos analisados [$F_{(2, 58)} = 17,44$; $p = 0,0001$].

Figura 9: Cipionato de estradiol reduz, enquanto a corticosterona aumenta a secreção de LH. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween 80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0,05$ com OVX + CORTICO. $n = 9-10$ animais por grupo.

A concentração plasmática de FSH (figura 10) apresentou o mesmo perfil de resposta da concentração de LH. As concentrações plasmáticas de FSH diminuíram com o tratamento de cipionato de estradiol, em ambas as concentrações [$F_{(1, 57)} = 52,755$; $p = 0,001$]. O pós-teste confirmou essa redução. Nos grupos OVX tratados com estrógeno 50 e 100 µg/Kg ($2,04 \pm 0,18$ / $1,66 \pm 0,21$ / $2,0 \pm 0,29$ / $2,18 \pm 0,35$ ng/mL) que receberam salina ou corticosterona, as concentrações de FSH foram menores quando comparadas com as concentrações dos grupos tratados com óleo ($9,88 \pm 1,32$ / $15,28 \pm 2,45$ ng/mL). Assim como na resposta de LH, o tratamento com corticosterona aumentou as concentrações de FSH [$F_{(1, 58)} = 4,0937$; $p = 0,04783$]. A concentração de FSH foi maior no grupo OVX tratado com óleo e corticosterona ($15,28 \pm 2,45$ ng/mL) do que seu respectivo grupo controle, tratado com óleo e salina ($9,88 \pm 1,32$ ng/mL). No entanto, a análise de interação das duas variáveis não mostrou diferença entre os grupos analisados [$F_{(2, 58)} = 2,841$; $p = 0,0673$].

Figura 10: Cipionato de estradiol reduz a secreção de FSH, mas o tratamento com corticosterona aumenta a secreção de FSH. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0,05$ com OVX + CORTICO. $n = 9-10$ animais por grupo.

4.4 CORTICOSTERONA

Os resultados das concentrações de corticosterona plasmática estão expressos na figura 11. A variável estrógeno [$F_{(1, 58)} = 3,9082$; $p = 0,02599$] e corticosterona [$F_{(1, 58)} = 23,683$; $p = 0,001$] alteraram a concentração plasmática de corticosterona. A interação das duas variáveis também mostrou diferenças entre os grupos analisados [$F_{(2, 58)} = 20,79$; $P < 0,0001$]. A secreção de corticosterona aumentou nos grupos tratados com cipionato de estradiol e salina ($326,03 \pm 32,99$ / $361,20 \pm 34,87$ ng/mL) em comparação com seu respectivo grupo controle, tratado com óleo e salina ($134,70 \pm 6,12$ ng/mL). As concentrações de corticosterona aumentaram no grupo tratado com corticosterona e óleo ($233,39 \pm 16,46$ ng/mL). Entretanto, com o tratamento combinado de cipionato de estradiol e corticosterona, as concentrações de corticosterona ($135,03 \pm 22,77$ / $146,59 \pm 23,52$ ng/mL) permaneceram em valores próximos do grupo controle, tratado com óleo e salina ($134,70 \pm 6,12$ ng/mL).

Figura 11: Concentração plasmática de corticosterona. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno ($50\mu\text{g/Kg}$ e $100\mu\text{g/Kg}$ s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; ; (#) $p < 0,05$ com OVX + CORTICO. $n = 9-10$ animais por grupo.

4.5 PROGESTERONA

Tratamento com cipionato de estradiol aumentou as concentrações de progesterona [$F_{(1, 58)} = 4,8108$; $p=0,01237$] nos grupos que receberam salina. A análise de interação das duas variáveis, corticosterona e estrógeno, também mostrou diferenças entre os grupos analisados [$F_{(2, 58)} = 4,676$; $P = 0,0140$]. O pós-teste confirmou o aumento nos grupos tratados com cipionato de estradiol, em ambas as concentrações 50 e $100\mu\text{g/Kg}$ ($5,53\pm0,85$ / $5,47\pm1,26$ ng/mL) em comparação ao seu respectivo grupo controle, tratado com óleo e salina ($1,05\pm0,15$ ng/mL). A análise de variância mostrou que a variável corticosterona, alterou as concentrações de progesterona [$F_{(1, 58)} = 4,179$; $p = 0,0464$]. O pós-teste não mostrou diferenças entre os grupos que receberam corticosterona. (Figura 12)

Figura 12: Concentração plasmática de progesterona em ratas. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 7-10$ animais por grupo.

4.6 Expressão de mRNA (RT- PCR)

4.6.1 CRH

Foi avaliada a expressão de mRNA para CRH no núcleo paraventricular. A variável tratamento com cipionato de estradiol alterou a expressão de mRNA para CRH, nos animais que receberam salina [$F_{(1, 8)} = 11,91$ $p = 0,0030$], mas não nos animais que receberam corticosterona [$F_{(1, 8)} = 2,222$; $p = 0,1644$]. O pós-teste indicou redução na expressão de RNA mensageiro para CRH, nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as concentrações ($0,2266 \pm 0,11$ / $0,5091 \pm 0,13$) em comparação com animais tratados com óleo que receberam salina ($1,168 \pm 0,23$) (figura 14-A). Nos animais tratados com óleo, a administração de corticosterona reduziu a expressão de mRNA para CRH ($0,4173 \pm 0,13$), em comparação aos animais submetidos à administração de salina ($1,068 \pm 0,23$) (figura 13-B). Este efeito da corticosterona não foi verificado nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as doses (figura 13-C).

Figura 13: RT-PCR de mRNA para CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50µg/kg and 100µg / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX/Cortico. (C) OVX/ Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50µg/kg e 100µg/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 4$ ratas por grupo.

4.6.2 AVP

Foi avaliada a expressão para mRNA para AVP no núcleo paraventricular do hipotálamo. A variável estrógeno alterou a expressão de mRNA para AVP [$F_{(2, 9)} = 18,25$; $p = 0,0007$], bem como nos animais que receberam corticosterona [$F_{(2, 9)} = 14,13$; $p = 0,0017$]. O pós-teste indicou redução na expressão de mRNA para AVP, nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as concentrações ($0,5883 \pm 0,07$ / $0,3272 \pm 0,09$) comparando com os tratados com óleo e salina ($1,025 \pm 0,13$) (figura 14-A). Nos animais tratados com óleo, a administração de corticosterona aumentou a expressão de mRNA para AVP ($1,907 \pm 0,27$), em comparação aos animais submetidos à administração de salina ($1,025 \pm 0,13$) (figura 14-B). Nos animais submetidos à administração de corticosterona, o pós-teste indicou redução na expressão de mRNA para AVP nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as doses ($0,2988 \pm 0,09$ / $0,4812 \pm 0,14$) em comparação aos animais tratados com óleo ($1,034 \pm 0,16$) (figura 14-C).

Figura 14: RT-PCR para mRNA de AVP no núcleo paraventricular do hipotálamo. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50µg/kg and 100µg / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Cortico. (C) OVX / Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50µg/kg e 100µg/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. diluído em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 4$ animais por grupo.

4.6.3 POMC

Foi avaliada a expressão para mRNA para POMC na hipófise. A variável estrógeno alterou a expressão, tanto nos animais tratados com salina [$F_{(2, 9)} = 32,11$; $p = 0,0001$], como nos animais tratados com corticosterona [$F_{(2, 9)} = 39,54$ $p = 0,0001$]. Para os animais que receberam salina, o pós-teste indicou redução na expressão de mRNA para POMC, nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as concentrações ($0,2001 \pm 0,13$ / $0,1897 \pm 0,14$) em comparação aos animais tratados com óleo ($1,168 \pm 0,13$) (Figura 15-A). A administração de corticosterona reduziu a expressão de mRNA para POMC nos animais tratados com óleo ($0,6781 \pm 0,10$), em comparação com o grupo controle tratado com óleo e salina ($1,168 \pm 0,13$) (FIGURA 15-B). Nos animais que receberam corticosterona, o pós-teste também indicou redução na expressão de mRNA para POMC nos animais tratados com cipionato de estradiol em ambas as concentrações ($0,2804 \pm 0,07$ / $0,16900 \pm 0,08$) em comparação aos animais tratados com óleo ($1,174 \pm 0,14$) (Figura 15-C).

Figura 15: RT-PCR de mRNA para POMC na hipófise. (A) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX / Salina + Estrógeno 50µg/kg and 100µg / kg. (B) OVX / Salina (calibrador) vs. OVX/Cortico. (C) OVX/ Cortico (calibrador) vs. OVX / Cortico + Estrógeno 50µg/kg e 100µg/kg. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c. diluído em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 4$ animais por grupo.

4.7 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.

Figura 16-A mostra o número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado. A variável estrógeno alterou o número de entradas [$F_{(1, 58)}=8,0567$; $p=0,00081$]. Nos grupos tratados com cipionato de estradiol submetidos à administração de salina, o número de entradas no braço aberto ($5,25\pm0,80$ / $5,18\pm0,66$) foi maior do que os grupos tratados com óleo que receberam salina ($2,1\pm0,31$). No grupo tratado com cipionato de estradiol na dose de $100 \mu\text{g/Kg}$, que recebeu corticosterona, o número de entradas no braço aberto foi maior ($6,44\pm1,18$). O número de entradas no braço fechado não foi alterado nesse modelo experimental. O conjunto de resultados está apresentado na tabela 3. O tempo que os animais permaneceram no braço aberto aumentou com o tratamento com cipionato de estradiol [$F_{(1, 58)} = 8,2351$; $p= 0,00072$]. Nos grupos tratados com estrógeno submetidos à administração de salina, o tempo de permanência no braço aberto foi maior ($40,34\pm7,32$ / $48,26\pm7,81$ s) quando comparado ao tempo do grupo tratado com óleo submetidos à administração de salina ($17,48\pm2,73$ s). Entre animais que receberam corticosterona, somente os animais tratados com cipionato de estradiol na dose de $100 \mu\text{g/Kg}$ ($52,48\pm12,01$ s) apresentaram o tempo no braço aberto maior que seu respectivo grupo controle ($23,63\pm6,03$ s). Na figura 16-B estão expressos os valores do tempo no braço aberto.

Figura 16: Número de entradas (A) e tempo (B) no braço aberto exibidos em sessão de 5-min no labirinto em cruz elevado. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0.05$ com OVX + CORTICO. $n = 8-10$ animais por grupo.

Entre os grupos que receberam administração de salina, o tempo no centro do labirinto aumentou nos grupos tratados com cipionato de estradiol ($58,46 \pm 6,63$ s / $67,2 \pm 7,15$ s) quando comparado com o grupo tratado com óleo ($42,22 \pm 5,63$). A distância percorrida aumentou somente no grupo tratado com cipionato de estradiol, na dose de 100 µg/Kg e salina ($9,02 \pm 0,84$ m), em comparação ao grupo tratado com óleo ($7,32 \pm 0,78$ m). Estes resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros analisados no Teste do Labirinto em Cruz elevado. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 8-10$ animais por grupo.

Comportamentos	Grupos Experimentais					
	SALINA			CORTICO		
	OVX	E2 50	E2 100	OVX	E2 50	E2 100
Número de entradas	9,8 $\pm$	11,91 $\pm$	12,18 $\pm$	9,99 $\pm$	9,8 $\pm$	9,77 $\pm$
no braço fechado	1,09	1,06	1,12	1,09	0,81	0,45
Tempo no braço	240,2 $\pm$	201,1 $\pm$	184,5 $\pm$	221,5 $\pm$	220,7 $\pm$	202,8 $\pm$
fechado (s)	22,5	17,7*	17,4*	21,3	21,7	25,5*
Tempo no centro (s)	42,2 $\pm$	58,4 $\pm$	67,2 $\pm$	54,7 $\pm$	50,3 $\pm$	44,6 $\pm$
	5,6	6,6 *	7,1*	7,9	7,6	6,9
Distância percorrida	7,3 $\pm$	8,0 $\pm$	9,02 $\pm$	6,7 $\pm$	7,02 $\pm$	7,2 $\pm$
(m)	0,78	0,65	0,84	0,75	0,88	0,92

4.8 TESTE DE NADO FORÇADO

Os animais foram submetidos ao teste de nado forçado por 5 minutos, precedido de um pré-teste no dia anterior. O tempo de imobilidade no nado forçado está apresentado na figura 17-A. A variável tratamento com estrógeno alterou o tempo de imobilidade [$F_{(1, 40)} = 6,767$; $P = 0,0029$], enquanto a variável administração de corticosterona [$F_{(1, 40)} = F_{(1, 41)} = 2,908$; $P = 0,0957$] e a interação das duas variáveis [$F_{(2, 39)} = 2,230$; $P = 0,1204$] não mostraram diferenças na análise de variância. Entre os grupos submetidos à administração de salina, os grupos tratados com cipionato de estradiol nas duas doses, apresentaram tempo de imobilidade (93,12 $\pm$ 25,89 / 92,92 $\pm$ 15,38) maior que o grupo tratado com óleo (38,22 $\pm$ 14,99). Entre os grupos submetidos à administração de corticosterona, o tempo de imobilidade foi maior nos grupos tratados com óleo (85,29 $\pm$ 10,51) e estrógeno na dose de 100 μ g/Kg (132,23 $\pm$ 18,94593) em comparação ao grupo que recebeu salina e foi tratado com óleo (38,22 $\pm$ 14,99).

A figura 17-B apresenta as médias $\pm$ EPM da latência para o primeiro episódio de imobilidade no nado forçado. As duas variáveis, corticosterona [$F_{(1, 40)} = 5,965$; $p = 0,0195$] e estrógeno, [$F_{(1, 40)} = 5,965$; $p = 0,0195$] assim como a interação das duas variáveis [$F_{(2, 39)} = 10,57$; $p = 0,0002$] alteraram o tempo de latência. A análise do pós-teste indicou que entre os animais submetidos à administração de salina, o

tempo de latência foi menor nos grupos tratados com cipionato de estradiol nas duas concentrações ($77,86 \pm 5,72$ / $67,00 \pm 8,49$), em comparação com o grupo tratado com óleo ($129,38 \pm 11,24$). Entre os animais tratados com corticosterona, a latência foi menor no grupo tratado com estrógeno na dose de $100 \mu\text{g/Kg}$ ($90,88 \pm 5,55$) que no grupo tratado com óleo ($117,9 \pm 6,61$). Na tabela 4 encontra-se o resultado dos demais parâmetros analisados no teste de Nado Forçado. O comportamento de escaladas e mergulho no nado forçado não sofreram alterações com as variáveis tratamento com cipionato de estradiol ou corticosterona, e nem com a interação das duas variáveis. Já com o comportamento nado a variável estrógeno não alterou [$F_{(1, 42)} = 2,051$ $p = 0,1413$], mas o tratamento com corticosterona [$F_{(1, 42)} = 6,563$; $p = 0,0141$] e a interação [$F_{(2, 42)} = 5,519$; $p = 0,0074$] das duas variáveis alteraram esse comportamento. O pós-teste mostrou que os grupos tratados com estrógeno na dose de $50 \mu\text{g/Kg}$ ($58,45 \pm 9,71$), e corticosterona mais salina ($60,19 \pm 11,34$) ou estrógeno nas duas doses ($76,49 \pm 11,85$ / $73,28 \pm 9,57$) apresentaram tempo de nado menor que o grupo controle, tratado com óleo e salina ($132,43 \pm 19,53$).

Tabela 4: Parâmetros analisados no Teste de Nado Forçado. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 7-8$ animais por grupo.

Comportamentos	Grupos Experimentais					
	SALINA			CORTICO		
	OVX	E2 50	E2 100	OVX	E2 50	E2 100
Escaladas	$127,27 \pm$	$146,48 \pm$	$113,76 \pm$	$130,20 \pm$	$146,61 \pm$	$95,70 \pm$
	15,1	26,3	11,1	17,5	17,7	12,3
Natação	$132,43 \pm$	$58,45 \pm$	$90,95 \pm$	$60,19 \pm$	$76,49 \pm$	$73,28 \pm$
	19,5	9,7 *	12,7	11,3 *	11,8 *	9,5 *
Mergulho	$0,79 \pm$	$1,35 \pm$	$0,45 \pm$	$0,24 \pm$	$0,59 \pm$	$0,01 \pm$
	0,92	0,82	0,20	0,25	0,27	0,01

Figura 17: Imobildade (A) e Latência para o primeiro episódio de imobildade (B) no teste de nado forçado. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno (50µg/Kg e 100µg/Kg s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. Diferença significativa: (*) $p < 0,05$ OVX + SAL; (#) $p < 0,05$ com OVX + CORTICO. $n = 7-8$ animais por grupo.

4.9 COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS

4.9.1 PVN

Os resultados da análise do comprimento dos telômeros no núcleo paraventricular estão expressos na figura 18. A corticosterona [$F_{(1, 35)} = 0,30921$; $p = 0,58243$], o estrógeno [$F_{(1, 35)} = 1,2279$; $p = 0,30769$] e a interação dessas duas variáveis [$F_{(1, 35)} = 0,30921$; $p = 0,58243$] não alteraram o comprimento dos telômeros das células dessa região. O pós-teste também não indicou diferenças entre os grupos estudados.

Figura 18: Comprimento dos telômeros no núcleo paraventricular do hipotálamo, mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno ($50\mu\text{g/Kg}$ e $100\mu\text{g/Kg}$ s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. $n = 8$ animais por grupo.

4.9.2 Amígdala central

O comprimento dos telômeros na amígdala central está expressos na figura 19. A corticosterona não alterou o comprimento dos telômeros das células dessa região [$F_{(1, 40)} = 1,642$; $p = 0,2070$]. Porém, a variável tratamento com cipionato de estradiol [$F_{(1, 40)} = 7,528$; $P = 0,0016$] alterou o comprimento dos telômeros nessa área. A interação das variáveis estrógeno e corticosterona não mostrou diferença [$F_{(1, 35)} = 0,03242$; $p = 0,9681$]. Para os grupos submetidos à administração de salina, o pós-teste indicou diminuição do comprimento dos telômeros na amígdala central em

animais tratados com cipionato de estradiol nas duas doses, com administração de salina ($0,63 \pm 0,046 / 0,60 \pm 0,041$) ou corticosterona ($0,58 \pm 0,052 / 0,54 \pm 0,05$) em comparação aos animais tratados com óleo e submetidos à administração de salina ($0,799 \pm 0,058$).

Figura 19: Comprimento dos telômeros na amígdala central, mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno ($50 \mu\text{g/Kg}$ e $100 \mu\text{g/Kg}$ s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. (*) $p < 0,05$ OVX + SAL. $n = 8$ animais por grupos.

4.9.3 Hipocampo dorsal

Na figura 20 estão expressos os resultados do comprimento dos telômeros no hipocampo dorsal. A corticosterona [$F_{(1, 40)} = 0,8075$; $p = 0,3742$] não alterou o comprimento dos telômeros das células dessa região. A variável tratamento com cipionato de estradiol alterou o comprimento dos telômeros nessa área [$F_{(1, 40)} = 5,280$; $P = 0,0092$]. O pós-teste indicou que entre os grupos submetidos à administração de salina, os grupos tratados com cipionato de estradiol na dose de $100 \mu\text{g/Kg}$ ($0,57 \pm 0,038$) ou corticosterona ($0,59 \pm 0,031$) apresentaram diferenças em comparação ao grupo tratado com óleo ($0,70 \pm 0,05$). A interação das variáveis estrógeno e corticosterona não mostrou diferenças na análise de variância [$F_{(1, 35)} = 0,7639$; $p = 0,4725$].

Figura 20: Comprimento dos telômeros no hipocampo dorsal mensurados por q-PCR. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com estrógeno ($50\mu\text{g/Kg}$ e $100\mu\text{g/Kg}$ s.c.) ou óleo de milho (veículo), e tratadas com corticosterona (20 mg / kg s.c., diluição em salina isotônica e Tween-80 2 %) ou com o veículo por vinte e oito dias. Valores estão expressos em média $\pm$ S.E.M. $n = 7-8$ animais por grupo

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

-Análises hormonais e da Atividade do Eixo HPA

O tratamento com cipionato de estradiol provocou alterações no ganho de peso corporal, o que também ocorreu com a administração de corticosterona. Ambos os hormônios causaram redução de ganho de peso corporal em relação aos animais que não receberam esses hormônios. Lee et al (2013) também observou uma redução no ganho de peso corporal no tratamento crônico com corticosterona. Outros trabalhos também mostram um menor ganho de peso corporal pelos glicocorticóides (LIU et al., 2011). A redução no ganho de peso pode ser relacionada a concentrações elevadas exógena de corticosterona, indicando efetividade do tratamento com esse hormônio (ULLOA et al., 2010). Asarian et al (2012) também descreveu que o estrógeno reduz o ganho de peso corporal. Os efeitos desses hormônios no ganho de peso corporal estão relacionados às alterações no metabolismo energético e no controle da ingestão alimentar (CHEN; BROWN; RUSSO, 2009; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

O tratamento com cipionato de estradiol foi efetivo para aumentar as concentrações plasmáticas de estrógeno, que por sua vez provocaram a redução verificada nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas (LH e FSH). Esses dados estão de acordo com o conceito clássico de controle por retroalimentação negativa do estrógeno no eixo hipotálamo hipófise gônada (HPG) (LEMARCHAND-BÉRAUD et al, 1975; MCPHERSON et al, 1975).

A administração corticosterona reduziu ou aumentou as concentrações de gonadotrofinas, respectivamente nos animais tratados ou não tratados com cipionato de estradiol. A ativação crônica do eixo HPA, que tem como consequência a elevação das concentrações plasmáticas de glicocorticóides, tem efeito inibitório sobre vários sistemas hormonais, entre os quais o eixo HPG como previamente descrito na literatura (COLLU et al., 1984; RABIN et al., 1988). Os glicocorticóides agem inibitoriamente em diferentes níveis do eixo HPG, no hipotálamo, na hipófise e no ovário (CHROUSOS; TORPY; GOLD, 1998; WHIRLEDGE; CIDLOWSKI, 2010). É a mimetização do estresse crônico que reconhecidamente inibe a função reprodutiva. Por outro lado, o aumento da concentração de gonadotrofinas induzido pela administração de corticosterona em animais não tratados com cipionato de estradiol é de interpretação mais complexa. Há um dado na literatura de

experimento “in vitro” com cultura de células da hipófise, que mostra efeito estimulatório da corticosterona sobre a secreção de FSH (Suter & Schwartz, 1985). Assim, uma ação estimulatória direta da corticosterona na hipófise poderia ser uma hipótese de interpretação. Esta ação eventualmente poderia ser facilitada pela ausência do mecanismo de retroalimentação negativa do estrógeno. Há que se considerar também que esta ação estimulatória da corticosterona possa estar relacionada também à dose utilizada. Outra possibilidade a considerar é a ação da corticosterona no hipotálamo provocando alteração na liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O CRH é um dos principais inibidores da atividade do eixo reprodutivo (BARBARINO et al., 1989; OLSTER; FERIN, 1987; ROOZENDAAL et al., 1996). O CRH pode atuar diretamente inibindo neurônios GnRH, e indiretamente estimulando neurônios opiatérgicos que têm ação inibitória sobre neurônios GnRH (ALMEIDA et al., 1992; RASMUSSEN et al., 1989). A administração de corticosterona inibe neurônios CRH no hipotálamo. Assim, a remoção de dois fatores moduladores inibitórios sobre os neurônios GnRH (redução CRH pela administração de corticosterona, redução de estrógeno pela ovariectomia e ausência de tratamento no grupo analisado) facilitaria a atividade secretória dos mesmos, resultando em maior estimulação da hipófise com secreção maior de gonadotrofinas.

Nos grupos que receberam salina, a concentração plasmática de corticosterona foi maior nos grupos tratados com cipionato de estradiol em comparação ao não tratado. Este resultado é consistente com diversos estudos que mostram concentrações de glicocorticóides maiores em fêmeas, associadas às concentrações elevadas de estrógeno, dependendo da fase do ciclo estral. (KITAY, 1961; YOSHIMURA et al., 2003). Nos grupos tratados com cipionato de estradiol que receberam corticosterona, as concentrações de glicocorticóides foram similares às concentrações do grupo tratado com óleo que recebeu salina. Portanto, a administração de corticosterona neutralizou o efeito do cipionato de estradiol. Essa redução também pode ser observada em situação de estresse e é atribuída a uma modulação bidirecional do estrógeno sobre o eixo HPA, que pode tanto aumentar como reduzir sua atividade (OCHEDALSKI et al., 2007). Outros pesquisadores demonstraram que a administração crônica de corticosterona pode reduzir a secreção endógena de glicocorticóides em uma situação de estresse, acompanhada pela inibição da atividade do núcleo paraventricular (SKÓRZEWSKA et al., 2006).

Nossos resultados corroboram essa interação entre corticosterona e estrógeno na regulação da atividade do eixo HPA.

A secreção de progesterona aumentou nos grupos tratados com cipionato de estradiol que receberam salina, mas não se alterou nos grupos tratados que receberam corticosterona. Progesterona, um dos esteroides primários sintetizados a partir do colesterol, é um dos precursores para vários hormônios esteroides, incluindo os glicocorticóides. Ela pode ser secretada tanto pelos ovários como pelas glândulas adrenais. A secreção de progesterona é aumentada em resposta a vários tipos de estressores e é utilizada como um marcador da atividade do sistema de estresse (BUDEC et al., 2002; FAJER; HOLZBAUER; NEWPORT, 1971; VALDEZ et al., 2012). Como utilizamos ratas ovariectomizadas em nossos experimentos, a variação da secreção da progesterona é de origem adrenal, e, portanto relacionada à alteração de atividade do eixo HPA.

Em relação ao núcleo paraventricular do hipotálamo, componente central e integrador do eixo HPA, verificou-se que o tratamento com cipionato de estradiol reduziu significativamente a expressão de mRNA para POMC, CRH e AVP em comparação aos não tratados. Outros pesquisadores também mostraram que o estrógeno é capaz de reduzir a expressão de mRNA para CRH (PAULMYER-LACROIX et al., 1996), AVP (NOMURA et al., 2002) e POMC (GAO; HE; KAPCALA, 1997). O fato do tratamento com cipionato de estradiol aumentar a secreção de hormônios relacionados com o eixo HPA, como a corticosterona e progesterona, e reduzir a expressão de mRNA para CRH, AVP e POMC indica que ação do estrógeno deve envolver outros mecanismos que não esses mediadores no núcleo paraventricular do hipotálamo. Há evidências que aumento da concentração dos glicocorticoides pode estar associado diretamente ao aumento da atividade simpático-medular (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; EHRHART-BORNSTEIN et al., 1998), na qual o estrógeno poderia estar atuando.

A administração de corticosterona também reduziu a expressão de mRNA para POMC e CRH, mas aumentou a expressão de mRNA para AVP. A redução da expressão de mRNA para CRH e POMC pela corticosterona, também é descrita por outros autores, e é atribuído à ação de retroalimentação negativa (MAKINO; GOLD; SCHULKIN, 1994; YOUNG; KWAK; KOTTAK, 1995).

Em relação ao mRNA para AVP, a literatura apresenta situações patológicas (depressão, Alzheimer, etc.), em que o aumento dessa expressão está associado à

hiperatividade do eixo HPA, portanto com concentrações plasmáticas elevadas de glicocorticoides. Discute-se que nessas situações o controle do eixo HPA é mais dependente de AVP que de CRH (GONCHAROVA, 2013; LABUDOVA et al., 1998). Por outro lado, em situações de estresse crônico descreve-se um aumento de mRNA para AVP maior do que para CRH (LIGHTMAN, 2008). Nós não utilizamos um modelo de estresse induzido por um estímulo estressor, mas mimetizamos uma ação efetora relacionada à hiperatividade do eixo HPA, com a administração de corticosterona. Estes dados em conjunto indicam que em situações crônicas de concentração plasmática elevada de glicocorticoide (induzida por alguma patologia específica, por estresse, ou por administração exógena), esse hormônio modificaria o contexto molecular hipotalâmico de controle do eixo HPA.

- Análises comportamentais

Na análise do teste comportamental no labirinto em cruz elevado verificou-se que nos animais tratados com cipionato de estradiol que receberam e salina, o número de entradas e o tempo no braço aberto aumentaram em comparação com os animais não tratados. Nos animais que receberam corticosterona, no grupo tratado com estrógeno na dose de 100 µg/ml, o número de entradas e o tempo no braço aberto aumentaram com relação ao grupo tratado com óleo que recebeu salina.

O teste no labirinto em cruz elevado é um método experimental para análise de comportamento de ansiedade em ratos, e é utilizado para testar efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas e hormônios (WALF & FRYE, 2007). Nossos resultados mostraram que número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos foram maiores nos animais tratados com estrógeno, indicando um efeito ansiogênico, já relatado em outros trabalhos (MARCONDES et al., 2001; NOMIKOS; SPYRAKI, 1988; WALF; FRYE, 2009). A ativação dos receptores de serotonina pode resultar em resposta ansiolítica (PISZCZEK et al., 2015), e o estrógeno pode modular essa resposta (ANDRADE et al., 2017). Outros neurotransmissores e hormônios podem participar dessa resposta. A ocitocina está associada para redução da ansiedade, e o estrógeno aumenta o número de receptores para esse hormônio no núcleo ventromedial e central da amígdala em ratas (QUIÑONES-JENAB et al., 1997)

O teste do nado forçado, preditivo de efeito antidepressivo, foi descrito pela primeira vez em 1978 por Porsolt e colaboradores (PORSOLT et al., 1978). Ratos

são colocados em um cilindro com água sem a possibilidade de sair, e é feita a observação do tempo de imobilidade e de nado. A redução do tempo de imobilidade indica um efeito antidepressivo para um determinado tratamento (CAN et al., 2012; SLATTERY; CRYAN, 2012; YANKELEVITCH-YAHAV et al., 2015).

Considerando que os testes são baseados em uma avaliação que depende de atividade motora, o tratamento não pode alterar a capacidade locomotora do animal, para não gerar distorções de interpretações. Em nossos experimentos, a distância percorrida no teste do labirinto em cruz elevado foi maior no grupo tratado com cipionato de estradiol na dose de 100 µg/ml que recebeu administração de corticosterona, que nos demais grupos, indicando que esses hormônios não alteraram a capacidade locomotora dos animais. Outros pesquisadores mostraram anteriormente que tanto a corticosterona como o estrógeno não alteram a capacidade motora dos animais (LEE et al., 2013; WALF; FRYE, 2010).

Considerando que as terapias hormonais não alteraram a habilidade motora, o aumento no tempo da imobilidade é relacionado a um efeito de comportamento semelhante à depressão, o que foi observado nos grupos tratados com cipionato de estradiol. Na literatura é descrito em testes de nado forçado, que a ovariectomia em ratas pode reduzir a imobilidade (WALKER et al., 1995) e aumentar o comportamento semelhante à depressão (LI et al., 2014). Por sua vez, a terapia hormonal estrogênica pode induzir efeitos antidepressivos (KOSS et al., 2012; ROCHA et al., 2005). A divergência dos nossos resultados pode ser explicada pelo tempo de tratamento, pelo tipo de estrógeno ou pela dose utilizada, fatores que podem interferir na resposta (ESTRADA-CAMARENA; FERNÁNDEZ-GUASTI; LÓPEZ-RUBALCAVA, 2003). Nós utilizamos dose fisiológica para reproduzir concentrações similares à fase de proestro ou dose supra fisiológica por 28 dias. Há que se considerar também que hormonal tratamento com cipionato de estradiol, nas doses utilizadas, aumentou a secreção de corticosterona. E a exposição prolongada a glicocorticoides podem aumentar comportamentos semelhantes a depressão (ANACKER et al., 2011).

Nos grupos submetidos à administração de corticosterona, o tempo de imobilidade foi maior tanto no grupo sem tratamento com cipionato de estradiol, como no grupo tratado com dose supra fisiológica, quando comparado com o grupo sem tratamento que recebeu salina. Esses dados corroboram com outros descritos na literatura, em que o tratamento com corticosterona (LEE et al., 2013) assim como

a exposição ao estresse (TAMBURELLA et al., 2013) aumentam o comportamento semelhante a depressão.

Em síntese o tratamento com cipionato de estradiol nas doses e tempo de tratamento utilizados pode ter efeitos ansiolítico e de aumento no comportamento semelhante a depressão. Este último também verificado com a administração de corticosterona. Apesar da ansiedade e depressão serem dois tipos de transtornos diferentes, em muitos casos, o aumento da atividade do eixo HPA pode desencadear esses transtornos.

- Análise do comprimento telomérico

Na análise do comprimento telomérico, verificou-se que: o cipionato de estradiol e a corticosterona não causaram alterações em células do PVN; o cipionato de estradiol reduziu o comprimento dos telômeros na amígdala central nos animais que receberam salina ou corticosterona; o cipionato de estradiol somente na dose supra fisiológica reduziu o comprimento dos telômeros no hipocampo dorsal nos animais que receberam salina ou corticosterona.

O estresse crônico é um dos fatores que podem acelerar o encurtamento dos telômeros (EPEL et al., 2004; SIMON et al., 2006; WEI et al., 2015). O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos no encurtamento dos telômeros durante o estresse crônico (FURUMOTO et al., 1998; KAWANISHI; OIKAWA, 2004; VON ZGLINICKI, 2002). A elevação da concentração plasmática de corticosterona pela administração exógena na dose utilizada durante o tempo de 28 dias não foi capaz de alterar o comprimento dos telômeros em células do PVN, da amígdala central e do hipocampo dorsal. Não se pode descartar que alterações possam ocorrer com outras doses e outros tempos de administração. O hipocampo é umas das regiões do cérebro com intensa atividade mitótica e neurogênese (ERIKSSON et al., 1998; MING; SONG, 2011). Wei & col. (2015) verificaram uma redução dos telômeros no hipocampo de ratos em um modelo genético de depressão com hiperatividade do eixo HPA.

Por outro lado, o tratamento com cipionato de estradiol foi efetivo para reduzir o comprimento dos telômeros na amígdala central e no hipocampo dorsal, mas não do PVN. Isto indica que há diferenciação de resposta nas áreas cerebrais. Há trabalhos mostrando o efeito protetor do estrógeno no comprimento dos telômeros em leucócitos (BAYNE et al., 2011; LEE et al., 2005; LIN et al., 2011; SHIN; LEE, 2016). As alterações de telômeros em regiões cerebrais precisam ser mais

investigadas em suas relações com morte neuronal, assim como possíveis ações neuroprotetoras retardar ou evitar o encurtamento telomérico.

-Repercussões do aumento da atividade do eixo HPA sobre o comportamento e os telômeros em áreas cerebrais

O controle fino das concentrações plasmáticas de glicocorticoides é essencial para manutenção da vida (HERMAN et al., 2016; PACÁK; PALKOVITS, 2001). O aumento dos glicocorticoides, devido a um agente estressor, permite ao organismo ajustar o metabolismo energético para se adaptar aos desafios da condição de estresse (REUL et al., 2015). Porém, a ativação crônica desses mecanismos pode causar alterações físicas e psicológicas prejudiciais ao organismo. As alterações observadas nesse trabalho demonstraram que o aumento na atividade do eixo HPA, pelo estrógeno, foi acompanhado de alterações no teste de nado forçado, com aumento do comportamento semelhante à depressão. Os telômeros da amígdala central e do hipocampo também foram alterados, levando a uma redução do comprimento. Entre as funções dos telômeros, está a proteção do DNA, evitando que o mesmo sofra degradações, rearranjos e fusões (BLACKBURN, 1991; GREIDER, 1990). Quando o telômero chega a um tamanho crítico, onde ele não possa mais proteger o DNA, a célula entra em processo de apoptose ou acontece um desarranjo no seu conteúdo genético, podendo levar a determinados tipos de câncer (MONDELLO; SCOVASSI, 2004; TITEN; GOLIC, 2008; ZHANG et al., 1999). Nesse trabalho não podemos afirmar que as células das áreas cerebrais cujo comprimento telomérico foi reduzido, estavam sofrendo apoptose. Não fizemos esta avaliação. O conjunto de resultados deste trabalho mostra que modificação na atividade do eixo HPA e a variação das concentrações plasmáticas de estrógeno podem provocar diversas alterações de ações hormonais, atividades comportamentais e de estrutura do DNA em áreas cerebrais.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Utilizando um modelo experimental de ratas ovariectomizadas, tratadas diariamente com cipionato de estradiol e corticosterona por vinte e oito dias, observamos que:

1. O estrógeno modula a atividade do eixo HPA, e as concentrações de corticosterona podem influenciar essa modulação. O tratamento simultâneo com corticosterona e estrógeno os níveis de glicocorticoides mantêm-se próximo ao grupo controle, tratado com óleo e salina.
2. O estrógeno reduz a ansiedade de ratos, como pode ser visto no labirinto em cruz elevado, mas produz comportamentos semelhantes à depressão, avaliado no teste de nado forçado.
3. O comprimento dos telômeros não é alterado pelo tratamento com corticosterona nas áreas estudadas. O estrógeno não exerceu efeito protetor nas terminações do DNA das células na amígdala central e no hipocampo dorsal, onde o comprimento telomérico estava reduzido.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AGUILERA, G.; LIU, Y. THE MOLECULAR PHYSIOLOGY OF CRH NEURONS. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 67–84, jan. 2012.

AGUILERA, G.; PHAM, Q.; RABADAN-DIEHL, C. Regulation of pituitary vasopressin receptors during chronic stress: relationship to corticotroph responsiveness. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, n. 3, p. 299–304, jun. 1994.

ALHEID, G. F.; MCCRIMMON, D. R. The chemical neuroanatomy of breathing. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 3–11, 10 dez. 2008.

ALMEIDA, O. F. et al. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone and opioid peptide neurons: functional changes after adrenalectomy and/or castration. **Brain Research**, v. 571, n. 2, p. 189–198, 7 fev. 1992.

ANACKER, C. et al. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, In Search Of The Biological Basis Of Mood Disorders: Exploring Out Of The Mainstream. v. 36, n. 3, p. 415–425, 1 abr. 2011.

ANDRADE, T. G. C. S. DE et al. Interaction between estradiol and 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus on acquisition of aversive information and association to the context in ovariectomized rats. **Neurobiology of Stress**, v. 7, p. 80–88, 26 maio 2017.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 96, n. 5, p. 513–523, maio 1999.

AUBERT, G.; LANSDORP, P. M. Telomeres and aging. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 557–579, abr. 2008.

AULINAS, A. et al. [Telomeres, aging and Cushing's syndrome: are they related?]. **Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición**, v. 60, n. 6, p. 329–335, jul. 2013.

AYALA-SUMUANO, J.-T. et al. Glucocorticoid Paradoxically Recruits Adipose Progenitors and Impairs Lipid Homeostasis and Glucose Transport in Mature Adipocytes. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, dez. 2013.

BARBARINO, A. et al. Corticotropin-releasing hormone inhibition of gonadotropin release and the effect of opioid blockade. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 3, p. 523–528, mar. 1989.

BARRETT, E. L. B.; RICHARDSON, D. S. Sex differences in telomeres and lifespan. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 913–921, dez. 2011.

BAYNE, S. et al. Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. **Protein & Cell**, v. 2, n. 4, p. 333–346, abr. 2011.

BLACKBURN, E. H. et al. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. **Genome**, v. 31, n. 2, p. 553–560, 1989.

BLACKBURN, E. H. Telomeres: structure and synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 11, p. 5919–5921, 15 abr. 1990.

BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v. 350, n. 6319, p. 569–573, 18 abr. 1991.

BORNSTEIN, S. R.; CHROUSOS, G. P. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 5, p. 1729–1736, maio 1999.

BUDEC, M. et al. Acute ethanol treatment increases level of progesterone in ovariectomized rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 26, n. 3, p. 173–178, abr. 2002.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–2365, 10 dez. 2009.

CALADO RODRIGO T.; CHEN JICHUN. Telomerase: not just for the elongation of telomeres. **BioEssays**, v. 28, n. 2, p. 109–112, 24 jan. 2006.

CAN, A. et al. The Mouse Forced Swim Test. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 59, 29 jan. 2012.

CAREY, M. P. et al. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. **The Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 311–321, fev. 1995.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 10, p. e47, 15 maio 2002.

CHEN, J.-Q.; BROWN, T. R.; RUSSO, J. Regulation of Energy Metabolism Pathways by Estrogens and Estrogenic Chemicals and Potential Implications in Obesity Associated with Increased Exposure to Endocrine Disruptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1793, n. 7, p. 1128–1143, jul. 2009.

CHERIF, H. et al. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 5, p. 1576–1583, 1 mar. 2003.

CHOI, J.; FAUCE, S. R.; EFFROS, R. B. Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, p. 600–605, maio 2008.

CHRISTENSEN, A. et al. Hormonal Regulation of Female Reproduction. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 44, n. 8, p. 587–591, jul. 2012.

CHROUSOS, G. P.; TORPY, D. J.; GOLD, P. W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. **Annals of Internal Medicine**, v. 129, n. 3, p. 229–240, 1 ago. 1998.

CIRIACO, M. et al. Corticosteroid-related central nervous system side effects. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. Suppl 1, p. S94-98, dez. 2013.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2–13, 15 mar. 2011.

CUTRONEO, K. R. Relationship between glucocorticoid-mediated early decrease of protein synthesis and the steady state decreases of glucocorticoid receptor and TGF-beta activator protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 2, p. 194–203, fev. 2002.

DI DALMAZI, G. et al. Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 525093, 2012.

DIMICCO, J. A. et al. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 469–480, mar. 2002.

DINAN, T. G.; SCOTT, L. V. Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic–pituitary–adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 3, p. 259–264, set. 2005.

DOREY, R. et al. Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2870–2880, dez. 2012.

DUMONT, É. C. What is the bed nucleus of the stria terminalis? **Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1289–1290, 13 nov. 2009.

EHRHART-BORNSTEIN, M. et al. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 101–143, abr. 1998.

EPEL, E. S. et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17312–17315, 7 dez. 2004.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, nov. 1998.

ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 830–838, maio 2003.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057–1070, 20 dez. 2012.

FAJER, A. B.; HOLZBAUER, M.; NEWPORT, H. M. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. **The Journal of Physiology**, v. 214, n. 1, p. 115–126, abr. 1971.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7, 14 jan. 2010.

FURUMOTO, K. et al. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. **Life Sciences**, v. 63, n. 11, p. 935–948, 1998.

FUSTER-MATANZO, A. et al. Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β . **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27262, 2011.

- GALLAGHER, M.; CHIBA, A. A. The amygdala and emotion. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 221–227, abr. 1996.
- GAMBLE, K. L. et al. Circadian Clock Control of Endocrine Factors. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 466–475, ago. 2014.
- GAO, Y.; HE, J. R.; KAPCALA, L. P. Estrogen inhibits hypothalamic pro-opiomelanocortin gene expression in hypothalamic neuronal cultures. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 340–344, maio 1997.
- GEER, E. B.; ISLAM, J.; BUETTNER, C. Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 75–102, mar. 2014.
- GERRITS, M. et al. Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the PVN of ovariectomized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 1, p. 147–155, 30 set. 2005.
- GOLDSTEIN, D. S. Adrenal Responses to Stress. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 30, n. 8, p. 1433–1440, 2010.
- GOMEZ, D. E. et al. Telomere structure and telomerase in health and disease. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 5, p. 1561–1569, 29 ago. 2012.
- GONCHAROVA, N. D. Stress Responsiveness of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis: Age-Related Features of the Vasopressinergic Regulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 12 mar. 2013.
- GREIDER, C. W. Telomeres, telomerase and senescence. **BioEssays**, v. 12, n. 8, p. 363–369, 1 ago. 1990.
- GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. **Cell**, v. 43, n. 2 Pt 1, p. 405–413, dez. 1985.
- HERDE, M. K. et al. GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 31, p. 12689–12697, 31 jul. 2013.
- HERMAN, J. P. et al. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 292–298, 30 mar. 2012.
- HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603–621, 15 mar. 2016.
- HUANG, Y. et al. Telomere regulation in pluripotent stem cells. **Protein & Cell**, v. 5, n. 3, p. 194–202, mar. 2014.
- HYATT, P. J.; BHATT, K.; TAIT, J. F. Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 19, n. 1C, p. 953–959, jul. 1983.
- ITOI, K. et al. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 13, p. 5464–5472, 1 jul. 1999.

- KAWANISHI, S.; OIKAWA, S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 278–284, jun. 2004.
- KIM, J. J.; YOON, K. S. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 12, p. 505–509, dez. 1998.
- KITAY, J. I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 68, p. 818–824, maio 1961.
- KITAY, J. I. et al. Relation of the ovary to adrenal corticosterone production and adrenal enzyme activity in the rat. **Endocrinology**, v. 77, n. 5, p. 902–908, nov. 1965.
- KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, abr. 2011.
- KOSS, W. A. et al. Estrogen effects on the forced swim test differ in two outbred rat strains. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 2, p. 81–86, 15 maio 2012.
- KUENZEL, W. J.; BLÄHSER, S. The distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and fibers throughout the chick brain (*Gallus domesticus*). **Cell and Tissue Research**, v. 264, n. 3, p. 481–495, jun. 1991.
- KULA, J. et al. Short-term repeated corticosterone administration enhances glutamatergic but not GABAergic transmission in the rat motor cortex. **Pflugers Archiv**, v. 468, p. 679–691, 2016.
- KUMAR, P.; SAIT, S. F. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 4, n. 1, p. 2–7, 2011.
- KUMAR, T. R. et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 201–204, fev. 1997.
- LABUDOVA, O. et al. Brain vasopressin levels in Down syndrome and Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 806, n. 1, p. 55–59, 21 set. 1998.
- LEE, B. et al. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 313–322, 30 jul. 2013.
- LEE, D.-C. et al. Effect of Long-Term Hormone Therapy on Telomere Length in Postmenopausal Women. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 4, p. 471–479, 31 ago. 2005.
- LI, L.-H. et al. Ovariectomy Results in Variable Changes in Nociception, Mood and Depression in Adult Female Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 7 abr. 2014.
- LIGHTMAN, S. L. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 880–884, jun. 2008.
- LIN, J. et al. Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. **Brain Research**, v. 1379, p. 224–231, 16 mar. 2011.
- LIU, X.-Y. et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 5, p. 977–984, 2011.

- LU, W. et al. Telomeres - Structure, Function, and Regulation. **Experimental cell research**, v. 319, n. 2, p. 133–141, 15 jan. 2013.
- MAKINO, S.; GOLD, P. W.; SCHULKIN, J. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Research**, v. 640, n. 1–2, p. 105–112, 21 mar. 1994.
- MANGOS, G. J. et al. Glucocorticoids and the kidney. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 8, n. 6, p. 267–273, dez. 2003.
- MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 435–440, dez. 2001.
- MASTORAKOS, G. et al. Exercise and the stress system. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 4, n. 2, p. 73–89, jun. 2005.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309–338, jun. 2013.
- MCMAHON, M.; GERICH, J.; RIZZA, R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 4, n. 1, p. 17–30, 1 fev. 1988.
- MING, G.-L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687–702, 26 maio 2011.
- MITCHELL, C. et al. Social disadvantage, genetic sensitivity, and children's telomere length. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 16, p. 5944–5949, 22 abr. 2014.
- MONDELLO, C.; SCOVASSI, A. I. Telomeres, telomerase, and apoptosis. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 82, n. 4, p. 498–507, ago. 2004.
- MOYZIS, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)., present at the telomeres of human chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, p. 5, 1988.
- MURAKI, K. et al. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. **Frontiers in Oncology**, v. 2, 4 out. 2012.
- NASIR, L. et al. Telomere Lengths and Telomerase Activity in Dog Tissues: A Potential Model System to Study Human Telomere and Telomerase Biology. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 3, n. 4, p. 351–359, jul. 2001.
- NEMEROFF, C. B. et al. Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. **Archives of General Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 384–387, maio 1992.
- NISHIOKA, T. et al. Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Research**, v. 781, n. 1–2, p. 57–61, 19 jan. 1998.
- NOMIKOS, G. G.; SPYRAKI, C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 691–696, jul. 1988.

NOMURA, M. et al. Estrogen receptor-beta regulates transcript levels for oxytocin and arginine vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus of male mice. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 109, n. 1–2, p. 84–94, 30 dez. 2002.

NUSSINOVITCH, U. et al. Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 32, p. 3574–3585, 2010.

OCHEDALSKI, T. et al. Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 3, p. 189–197, mar. 2007.

OLEFSKY, J. M.; KIMMERLING, G. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 271, n. 2, p. 202–210, abr. 1976.

OLSTER, D. H.; FERIN, M. Corticotropin-releasing hormone inhibits gonadotropin secretion in the ovariectomized rhesus monkey. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 65, n. 2, p. 262–267, ago. 1987.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, ago. 2001.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain Research**, v. 59, p. 449–450, 14 set. 1973.

PAULMYER-LACROIX, O. et al. The modulatory role of estrogens on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of ovariectomized rats: role of the adrenal gland. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 515–519, jul. 1996.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.] Academic Press, 1998.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985.

PISZCZEK, L. et al. Modulation of anxiety by cortical serotonin 1A receptors. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, 24 fev. 2015.

POMPOLO, S.; RAWSON, J. A.; CLARKE, I. J. Projections from the arcuate/ventromedial region of the hypothalamus to the preoptic area and bed nucleus of stria terminalis in the brain of the ewe; lack of direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Brain Research**, v. 904, n. 1, p. 1–12, 15 jun. 2001.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 15 fev. 1978.

QUIÑONES-JENAB, V. et al. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 1, p. 9–17, jan. 1997.

RADLEY, J. J.; SAWCHENKO, P. E. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 26, p. 9683–9695, 29 jun. 2011.

- RASMUSSEN, D. D. et al. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human mediobasal hypothalamus in vitro: opiate receptor-mediated suppression. **Neuroendocrinology**, v. 49, n. 2, p. 150–156, fev. 1989.
- RENSEN, N. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis suppression after treatment with glucocorticoid therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, p. CD008727, 06 2017.
- RESER, J. E. Chronic stress, cortical plasticity and neuroecology. **Behavioural Processes**, v. 129, p. 105–115, 1 ago. 2016.
- REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505–2511, dez. 1985.
- REUL, J. M. H. M. et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. **Neurobiology of Stress**, Stress Resilience. v. 1, p. 44–59, 1 jan. 2015.
- ROCHA, B. A. et al. 17 β -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- β knockout (BERKO) mice. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 3, p. 637–643, 1 maio 2005.
- ROOZENDAAL, M. M. et al. Effect of CRH on the preovulatory LH and FSH surge in the cyclic rat: a role for arginine vasopressin? **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 10, p. 765–770, out. 1996.
- SCHOEPE, S. et al. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Experimental Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 406–420, jun. 2006.
- SCHWARTZ, J. R. ; ROTH, T. Neurophysiology of Sleep and Wakefulness: Basic Science and Clinical Implications. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 4, p. 367–378, dez. 2008.
- SHAHANI, S. et al. Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. **Diagnostic Pathology**, v. 5, p. 56, 31 ago. 2010.
- SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 1, p. 28–34, jan. 2011.
- SHIN, Y.-A.; LEE, K.-Y. Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 12, n. 3, p. 238–246, 30 jun. 2016.
- SIMON, N. M. et al. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 432–435, 1 set. 2006.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 3 maio 2012.
- SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395, dez. 2006.
- STEPHENS, M. A. C.; WAND, G. Stress and the HPA Axis. **Alcohol Research : Current Reviews**, v. 34, n. 4, p. 468–483, 2012.

STRATAKIS, C. A. Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotrophin-independent Cushing syndrome). **Endocrine development**, v. 13, p. 117–132, 2008.

TAMBURELLA, A. et al. Behavioural and neurochemical changes induced by stress-related conditions are counteracted by the neurokinin-2 receptor antagonist saredutant. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 4, p. 813–823, maio 2013.

TEJADA, J. et al. X-PloRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 33, 2017.

TILBROOK, A. J.; TURNER, A. I.; CLARKE, I. J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 105–113, maio 2000.

TITEN, S. W. A.; GOLIC, K. G. Telomere Loss Provokes Multiple Pathways to Apoptosis and Produces Genomic Instability in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 180, n. 4, p. 1821–1832, dez. 2008.

TORDAY, J. S. Homeostasis as the Mechanism of Evolution. **Biology**, v. 4, n. 3, p. 573–590, 15 set. 2015.

TSUTSUMI, R.; WEBSTER, N. J. G. GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. **Endocrine journal**, v. 56, n. 6, p. 729–737, 2009.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, jun. 2009.

VALDEZ, S. R. et al. Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague Dawley rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 15, n. 4, p. 361–377, jul. 2012.

VAMVAKOPOULOS, N. C.; CHROUSOS, G. P. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 1896–1902, out. 1993.

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M. L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 1, p. 1–48, jan. 1999.

VARGHESE, F. P.; BROWN, E. S. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. **Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 3, n. 4, p. 151–155, 2001.

VERMEULEN, A. The hormonal activity of the postmenopausal ovary. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 42, n. 2, p. 247–253, fev. 1976.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 7, p. 339–344, jul. 2002.

VYAS, S. et al. Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. **Gender Medicine**, v. 6, n. 1, p. 300–311, abr. 2009.

- WALF, A. A.; FRYE, C. A. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 2, p. 169–174, 9 fev. 2010.
- WALKER, C. D. et al. Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, n. 8, p. 615–622, ago. 1995.
- WALKER, J. J.; TERRY, J. R.; LIGHTMAN, S. L. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1688, p. 1627–1633, 7 jun. 2010.
- WEI, Y. B. et al. Telomerase dysregulation in the hippocampus of a rat model of depression: normalization by lithium. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 7, p. pyv002, 24 jan. 2015.
- WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids, Stress, and Fertility. **Minerva endocrinologica**, v. 35, n. 2, p. 109–125, jun. 2010.
- WIKGREN, M. et al. Short telomeres in depression and the general population are associated with a hypocortisolemic state. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 294–300, 15 fev. 2012.
- WINDLE, R. J. et al. Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 443–450, fev. 1998.
- YANKELEVITCH-YAHAV, R. et al. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 97, 2 mar. 2015.
- YOSHIMURA, S. et al. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. **Steroids**, v. 68, n. 5, p. 439–445, maio 2003.
- YOUNG, E. A.; KWAK, S. P.; KOTTAK, J. Negative Feedback Regulation following Administration of Chronic Exogenous Corticosterone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, n. 1, p. 37–45, jan. 1995.
- ZHANG, X. et al. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. **Genes & Development**, v. 13, n. 18, p. 2388–2399, 15 set. 1999.
- ZHOU, H.; COOPER, M. S.; SEIBEL, M. J. Endogenous Glucocorticoids and Bone. **Bone Research**, v. 1, n. 2, p. 107–119, 28 jun. 2013.

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 062/2014, sobre o projeto intitulado “*Efeitos da corticosterona e do estrógeno em telômeros de neurônios de áreas envolvidas no controle do eixo HPA*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Celso Rodrigues Franci** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de agosto de 2014.

We certify that the protocol nº 062/2014, entitled “*Effects of corticosterone and estrogen in telomeres of neurons from areas involved in control of the HPA axis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 08/25/2014.

Ribeirão Preto, 25 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP

Effects of estrogen and corticosterone on the activity of HPA axis in female rats: behavior and telomere length.

Procópio Cleber Gama de Barcellos Filho¹, Leonardo Campos Zanelatto², Barbara Amélia Aparecida Santana Lemos², Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues², Celso Rodrigues Franci¹.

¹ *Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.* ² *Department of Internal Medicine, University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.*

*** Corresponding Author and Reprint Requests:** Celso Rodrigues Franci, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School/USP. Avenida dos Bandeirantes, 3900. 14049-900 - Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602-0221
Phone: +55 16 3315-3022.
E-mail: crfranci@fmrp.usp.br

Running Head: HPA axis, behavior and the length of telomeres.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

Number of figures: 6

ABSTRACT

Chronic stress promotes several changes in the functioning of an organism. Increased glucocorticoids can affect components of an individual's physical and psychological state, such as anxiety and depression. In addition, recent work correlates chronic psychosocial stress to the reduction of the telomere length of certain cells. And estrogen, besides being a modulating factor of the activity of the stress system, can also influence the length of telomeres. Considering that stress can promote changes in telomere length, it is still unclear whether increased glucocorticoid concentrations alter the length of telomeres in brain tissue cells. The objective of this study was to verify if chronic exposure to glucocorticoids promotes changes in the telomere length of encephalic areas involved in the control of hypothalamic-hypophysis-adrenal (HPA) axis activity and in rat behavioral responses, and whether estrogen modulates these changes. **METHODS:** Wistar rats were ovariectomized and treated with estradiol cypionate (50 or 100 µg / kg, s.c.) or oil, and corticosterone 20 mg / kg or vehicle (isotonic saline 2% Tween 80, s.c.) for 28 days. On the 25th day the animals were submitted to the forced swim test, and on the 27th day, the high cross maze test. On the day after the end of the hormonal treatment, the animals were euthanized for collection of blood, brain and pituitary gland. **RESULTS:** Treatment with estradiol cypionate increased corticosterone and progesterone concentrations. But the expression of messenger RNA for CRH, AVP and POMC was reduced by estrogen. The estradiol cypionate promoted an anxiolytic effect in the animals, with an increase in the number of entries and time in the open arm. In forced swimming, estrogen increased the time of immobility, indicating a depressive effect. The telomeres of PVN were not altered by treatments, but in the central amygdala and dorsal hippocampus, estradiol cypionate reduced the length of the cells of these brain nuclei. **CONCLUSION:** Thus, corticosterone did not alter the length of telomeres, but estrogen reduced telomere length and altered anxiety levels of depression in animals.

Keywords: Stress, Corticosterone, Estrogen, Behavior, Telomere.

INTRODUCTION

The endings of chromosomes in eukaryotic cells are composed of repeated simple sequences of DNA and proteins, called telomeres. (1–3) Telomeres have the function to stabilize the endings of chromosomes, protecting them from degradation, fusions and rearrangements. (4–6) The number of base pairs that comprise the telomeres is reduced during cell division. (7) As the reduction of telomere length is associated with the cell division process, the size of telomeres is inversely proportional to age of an organism. The excessive shortening of telomeres can lead to a blockage of cell division. (8) The reduction of telomeres length occurs naturally with aging; however, some diseases can enhanced this process, as cardiovascular disease, diabetes, and cancer. (9) In recent years, a number of studies associated shorter blood leukocyte telomere length with psychological stress, major depression, and posttraumatic stress disorder. (10–13)

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is one of the components in the stress response in mammals, and determines the plasma concentrations of glucocorticoids. (14) Disturbances in the HPA axis lead to emotional and physical changes that generate certain endocrine and cardiovascular responses. (15) The maintenance and restoration of homeostasis involving precise coordination of neurovegetative, neuroendocrine, immune and behavioral responses in the HPA act as an effector component of the stress system. (16) The main neuronal population involved in this control is located in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Parvocellular neurons, located in the PVN, are responsible for the synthesis and secretion of CRH and AVP. These hormones stimulate the secretion of ACTH, which reaches the systemic circulation, and stimulates the adrenal cortex to secrete glucocorticoids. (17,18) Prolonged activation of the HPA axis by certain stressors induces chronic increased release of glucocorticoids which act in cells expressing their receptors. The action of glucocorticoids in the central nervous system is associated with neurochemical changes, including degeneration of brain tissue. The hippocampus is a sensitive area to the increase the concentration of glucocorticoids secretion and participates of the regulatory circuit of the HPA axis. (19) Long-term exposure to glucocorticoids, such as during chronic administration of corticosterone leads to behavioral changes similar to depression. (20–22)

Some studies have shown a positive association between exposure to adverse social environments, morbidity, and mortality. Similar situations are associated to the chronic stress, which is responsible for degrading physiological functioning. Telomeres length is lower in adults in a variety of contexts, including the disadvantaged social status and depression.(23,24) Chronic stress is related to the acceleration of telomere shortening, increased oxidative stress and thus increasing the cellular aging. (25) Recent studies correlate reducing the length of telomeres of certain cells with chronic psychosocial stress. It has been shown by Choi et al (2008) that exposure of T lymphocytes to cortisol promoted a significant reduction in telomerase activity. In patients with depression, in which the cortisol levels found is high, leukocytes-telomeres length is smaller. (12)

Sex differences in the activity of the HPA axis are well established. Throughout the ovarian cycle fluctuations are observed in the activity of the HPA axis, which corresponds to the amount of circulating hormones. A higher activity is seen in the late follicular phase in women and proestrus in rats. (26) Ovarian hormones modulate the activity of the HPA axis, leading to increased secretion of glucocorticoids produced by the adrenal glands. However, in stressful situations estrogen may go down as increase the secretion, a dependent function of plasma concentration. (27) The modulatory action of estrogen on the secretion of glucocorticoids is demonstrated in ovariectomized animals. The absence of ovarian hormones eliminates gender differences in corticosterone secretion. The replacement with estrogen reestablishes the differences of activity of the HPA axis (28) Estradiol can interact with both central and peripheral components of the HPA axis, modulating the synthesis and release of CRH, ACTH and glucocorticoids. (29)

Sex hormones may influence telomere length. Men have a greater shortening of telomeres lifelong (30). This difference can be correlated to the secretion of sex hormones. The work conducted by Lin et al (2001) showed in women undergoing longer exposure to the estrogen in the period between menarche and menopause, that the reduction in telomeres length was smaller than in women with lower exposure to estrogen. Endogenous estrogen may be associated with slowing of cell aging.(31)

Considering that stress can lead to several behavioral changes, hormonal and DNA structure; the aim of the present study was to assess the effects of the exposure to the glucocorticoids and estrogen on the hormonal and behavioral

aspects and the telomeres length in the brain areas of female rats. Estrogen may put up as a protective factor for these changes, when concentrations of glucocorticoids are high.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Female rats with thirty days were obtained from the animal house of the University of São Paulo at Ribeirão Preto. The animals were kept under controlled conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and daylight cycle (12:12 h, lights on at 6:00 am). Food and water were provided ad libitum. The rats were allowed 4 days to acclimate to the surroundings before any experimentation was performed. All protocols were approved by the Ethics Committee in Animal Research of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (No. 062/2014).

Ovariectomy (OVX)

Female rats were subjected to bilateral ovariectomy. The surgical procedures were performed under anesthesia induced by ketamina (100mg/kg, *Agener®*, Brasi, i.p.) and xilazina (20mg/kg, *Dopaser®*, Espanha, i.p.) and were followed by prophylactic doses of veterinary pentabiotic (0,2ml/rata, Wyeth, Brasil, i.m.) and analgesic flunixinina meglumina (50ug, banamine, Schering -Plough.Veterinária, s.c.).

Design and drug treatment

The rats were randomly divided into six groups follows: *Group I- OVX* - Rats treated with vehicle (corn oil, used to estrogen dilution) s.c. daily for 28 days. *Group II- OVX + E2 50* - Rats treated with 50 mg / kg of estradiol cypionate (Pharmacia Brazil) s.c. daily for 28 days. *Group III- OVX + E2 100* - Rats treated with 100 mg / kg of estradiol cypionate s.c. for 28 days. In all groups, animals were divided in two subgroups: experimental - treated with corticosterone 20mg / kg s.c. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % (32,33) for 28 days; and control group - treated with vehicle for 28 days. The initiation of treatment with estrogen and corticosterone was the day following ovariectomy surgery. On the 25th day the animals were submitted to the forced swimming test. On the 27th day, the animals were evaluated in the elevated plus maze. And on the day following the 28th

day of treatment, the animals were sacrificed by decapitation for withdrawal of blood samples, the brain and pituitary gland.

Hormones measurement by radioimmunoassay (RIA)

The measure of plasma corticosterone required previous extraction using ethanol. The RIA used a specific antibody and standard from Sigma (St. Louis, MO, USA) and H³-corticosterone from NEN Life Sciences Products (Boston, USA). The lower limit of detection for CORT was 0.08 ng/ml, and the intra-assay and inter-assay variation coefficients were 4.5% and 11.4%, respectively. Luteinizing hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) were determined using double-antibody RIA using specific antibodies provided by the National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, CA, USA). Dr. Francis's laboratory produced the iodinated hormones and the secondary antibody for precipitation. The lower limits of detection were 0.05 ng/mL for LH, 0.2 ng/ml for FSH. The intra-assay coefficients of variation for LH, FSH were 4%, 3%, respectively. Progesterone and 17 β -estradiol: were determined by RIA using the MP Biomedical® Double Antibody 125I kit (Eschwege, Germany). The lower limit of detection and the intra-assay coefficient were 1.2 ng/ml and 2.5% for progesterone, and 1.5 pg/ml and 3.5% for estradiol, respectively.

Microdissection, extraction of RNA and quantitative real-time PCR

Coronal brain slices were sectioned on a cryostat and then microdissected using a 1.5-mm-diameter stainless-steel punch needle. The PVN, Central Amygdala and Dorsal hippocampus was punched according to the Paxinos and Watson. Samples were collected in an RNase free microtube and stored at 4 °C o. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) and quantified. Then, 1 μ g of total RNA was used to synthesize cDNA, using a QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen - cat n° 205413). Quantitative was performed using a SYBR green PCR Master Mix, (Applied Biosystems cat: 4309155), and the corresponding primer sequence of tested genes was (written 5'3'):: POMC Fw: CGCGATCGACTAGCGA; POMC Rv: CGATGGGTTCGCTAGCTA; CRH Fw: CGATCGGCATGCGTAGCGCTA; CRH Rv: TCGATGGCTAGCTCCCA; AVP Fw: TTGGTAGCGTTCGATC; AVP Rv: GATTCTTAGGTAGCGGGTA; RPL 19 Fw: AAGTACTGGGGTTAAGT; RPL 19 Rv: TTCAATACTGGATTCGATTG. All reactions were performed in 7500 Real-Time

PCR System (Life Technologies). The mRNA expression was calculated using the $\Delta\Delta CT$ method. Threshold cycle (CT) of each sample was measured and normalized to the average of the housekeeping genes ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{Housekeeping gene}}$, RPL 19). ΔCt was used to obtain each sample $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{unknown}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$). This value was used in the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Values are expressed as the mRNA expression relative to the control group in arbitrary units.

Different calibrators were used: 1) the effect of estrogen treatment on CRH, AVP and POMC mRNA expression (the OVX+Saline group was used as a calibrator for the OVX+ Estrogen50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$). 2) the effect of corticosterone on CRH, AVP and POMC mRNA expression (the OVX/Saline group was used as a calibrator for the OVX/corticosterone). 3) the effect of corticosterone and estrogen on CRH, AVP and POMC mRNA expression (the OVX/corticosterone group was used as a calibrator for the OVX/corticosterone + Estrogen50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$).

Elevated plus maze

The apparatus consisted of two open arms (50 cm $\times$ 10 cm) crossed at right angles by two opposing arms of the same size. Two of the opposite arms were enclosed by wooden walls 40 cm high, except for the central part where the arms crossed. The entire apparatus was elevated 50 cm above the floor (Pellow et al., 1985). To prevent the rats from falling, a rim of Plexiglas (0.5 cm high) surrounded the perimeter of the open arms. The experimental trials were recorded by an overhead video camera interfaced with a computer in an adjacent room. To quantify motor activity, the image of the elevated plus-maze was divided into 10 cm squares in a transparent mask placed on the monitor. Displacement from one square to another and behavior were recorded using specifically designed software (X-Plo-Rat 2005) that is freely available at <http://scotty.ffclrp.usp.br/news.php> from the Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Procedure: One day before the behavioral test, which corresponded to the 26 day, the animals were placed next to the maze apparatus in a different temperature-controlled room with a light: dark cycle for acclimation. The experimental session was carried out in the morning of day 27 (7:00 am to 9:00 am). To begin the session, the rat was placed in the maze with the nose facing one of the closed arms of the maze and allowed to freely explore for 5 minute. Between the sessions, the maze was

cleaned with a 5% ethanol solution and dried with a cloth. The number of entries into and time spent inside each type of arm were recorded.

Forced swim test

The animals were submitted to the forced swim test in PVC cylinders, 50 cm high and 22 cm in diameter, with water at depth of 30 cm and mean temperature of $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A pre-test was performed the previous day, lasting 15 minutes. In the test session, the animals were individually placed for 5 minutes in the water tanks. The period of performance was from 08:00 to 10:00 in the morning. At the end of the test each animal was removed from the cylinder and dried. Between the sessions, the water of the cylinder was drained and the cylinder sanitized with ethanol (75%). For the behavioral record, the animals were filmed. The following behaviors were measured: fluctuation (complete immobility or soft movements, just enough to keep nose / head above water surface); climbing (vigorous movements with the front legs above the surface of the water or against the wall of the cylinder); swimming (the animal moves inside the cylinder with the body horizontal), and diving (the animal dives to the bottom of the cylinder).

Telomere Length

Relative telomere length of the paraventricular nucleus DNA was determined with triplicate DNA samples (0,2 ng) were used both for the telomeres (Tel) and the single-copy gene (ribosomal protein L30, *Rpl30*) qRTPCR, amplified by using Power SYBR Green in 8 μL total volume. The reaction was performed on Rotor Gene Qiagen Sequence Detection System with the following conditions: 95°C for 10 minutes; followed by 39 repeats of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, and then a dissociation stage to monitor amplification specificity. The relative (TL) was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method, where $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct calibrator}$ sample and $\Delta\text{Ct sample} = \text{Ct Tel} - \text{Ct single copy gene}$. The corresponding primer sequence of tested genes was (written 5'3'): Tel Fw: CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT; Tel Rv: GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT; *Rpl30* Fw: GCT CAC TCA CCA AGA TCA GACG; *Rpl30* Rv: CTT CCG CTA GTG ACA GGC TC. The telomere length of the rat DNA was determined according to the protocol of Cawthon et al. (2002).

Statistical Analyses

All of the data of this study are presented as the means $\pm$ standard error of the mean (SEM). The dependent variables body weight and hormonal levels (corticosterone, progesterone, estradiol, LH and FSH) were analyzed separately with the following independent factors: corticosterone and estradiol treatment. The behavior variables analyzed according the corresponding co-variables (corticosterone and estradiol treatment) using two-way ANOVA and GLM procedures. In the analyzes of the expression of messenger RNA for CRH and AVP in PVN and POMC in the pituitary, the comparison between OVX / Saline vs OVX / Saline + Estrogen groups 50 μ g / kg and 100 μ g / kg, and OVX / Cortico vs OVX / Cortico + Estrogen 50 μ g / kg and 100 μ g / kg, was done by a one-way ANOVA. The comparison between the OVX / Salina vs OVX / Cortico groups was done by t-test. The statistics of this data were different due to the calibrators used. All statistical analyses were performed Statistic 13, procedures with ANOVA(two-way and one-way), GLM and test-t, followed by the Fisher LSD posttest. The significance level was defined at 5%.

RESULTS

Body weight

In all animals, there was an increase in body weight during the protocols [$F_{(1, 58)} = 355.15$; $p=0.001$]. The corticosterone or estrogen treated groups had lower weight gain than their respective control groups [$F_{(1, 58)} = 453.52$; $p=0.001$ and $F_{(1, 58)} = 818.66$; $p=0.001$], and the association of both treatments reduced the body weight of the animals [$F_{(1, 58)} = 17.865$; $p= 0.001$].

Estrogen

The plasma concentration of estrogen may be observed in the figure 1-A. Treatment with estrogen increased the plasma level of this hormone in [$F_{(1, 58)} = 40.227$; $p=0.001$]. The posttest also showed increase in the 17 β -estradiol in all groups treated with estrogen (265.20 $\pm$ 24.30 / 379.67 $\pm$ 46.64 / 209.43 $\pm$ 47.43 / 365.09 $\pm$ 69.47 pg/mL) when compared with the oil-treated groups (43.89 $\pm$ 7.65 / 95.03 $\pm$ 13.34 pg/mL).

LH and FSH

Figure 1-B shows the plasma concentration of LH that decreased for treatment with estrogen, in both concentrations [$F_{(1, 58)}=98.337$; $p=0.001$] in all groups studied. The posttest also showed the reduction of LH levels by estrogen. In the groups OVX saline and corticosterone treated with estrogen 50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$, LH levels (0.307 ± 0.06 / 0.22 ± 0.02 / 0.24 ± 0.06 / 0.23 ± 0.02 ng/mL) were lower when compared with the oil-treated groups (2.56 ± 0.20 / 6.47 ± 0.85 ng/mL). Moreover, the treatment with corticosterone increased LH levels [$F_{(1, 58)}=10.425$; $p=0.00196$]. LH levels were higher in the group OVX treated with oil and corticosterone (6.47 ± 0.8 ng/mL) than in the respective control group, treated with oil and saline (2.56 ± 0.2 ng/mL).

The plasma concentration of FSH (figure 1-C) followed similar pattern to the LH. FSH plasma levels decreased with estrogen treatment, in both concentrations [$F_{(2, 57)}=52.755$; $p=0.001$] in all groups studied. The posttest also showed the reduction of FSH levels by estrogen, the groups OVX saline and corticosterone treated with estrogen 50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$ (2.04 ± 0.18 / 1.66 ± 0.21 / 2.0 ± 0.29 / 2.18 ± 0.35 ng/mL) FSH levels were lower when compared to the oil-treated groups (9.88 ± 1.32 / 15.28 ± 2.45 ng/mL). Moreover, the treatment with corticosterone increased FSH levels [$F_{(1, 58)}=4.0937$; $p=0.04783$]. FSH levels were higher in the group OVX treated with oil and corticosterone (15.28 ± 2.45 ng/mL) than in the respective control group treated with oil and saline (9.88 ± 1.32 ng/mL).

Corticosterone

Corticosterone plasma levels are shown in figure 2-A. Treatment with estrogen [$F_{(1, 58)}=3.9082$; $p=0.02599$] and corticosterone [$F_{(1, 58)}=23.683$; $p=0.001$] altered secretion of corticosterone. The secretion of corticosterone increased in groups treated with estrogen and saline (326.03 ± 32.99 / 361.20 ± 34.87 ng/mL) compared to their respective control group, treated with oil and saline (134.70 ± 6.12 ng/mL). The secretion of corticosterone increased in the group treated with corticosterone and corn oil (233.39 ± 16.46 ng/mL). However, with the treatment combined of estrogen and corticosterone, CT levels (135.03 ± 22.77 / 146.59 ± 23.52 ng/mL) remained close to values of the control group, treated with oil and saline (134.70 ± 6.12 ng/mL).

Progesterone

The corticosterone plasma levels are shown in figure 2-B. Treatment with estrogen increase progesterone levels [$F_{(1, 58)} = 4.8108$; $p=0.01237$]. The posttest also showed increase of levels progesterone in the group treatment with estrogen in both concentrations 50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$ (5.53 ± 0.85 / 5.47 ± 1.26 ng/mL) when compared with the respective control group treated with oil and saline (1.05 ± 0.15 ng/mL). In the groups treated with corticosterone, progesterone levels (2.56 ± 0.40 / 2.014282 ± 0.58 / 2.88 ± 0.55 ng/mL) remained close to those of the group treated with oil and saline (1.05 ± 0.15 ng/mL).

Elevated plus maze

Figure 4-A shows the number of entries into open and close arms. Only estrogen treatment changed the number of entries into the open arm [$F_{(1, 58)}=8.0567$; $p= 0.00081$]. In the group treated with estrogen and saline the number of entries into the open arm (5.25 ± 0.80 / 5.18 ± 0.66) was higher than group treated with oil and saline (2.1 ± 0.31). In the group treated with corticosterone and estrogen at a concentration of 100 $\mu\text{g/Kg}$, the number of entries into the open arm was higher (6.44 ± 1.18). The number of entries into the close arms was not changed by this experimental model. The results are showed in table 1.

The time spent in the open arm increased in estrogen-treated groups [$F_{(1, 58)} = 8.2351$; $p= 0.00072$]. The groups trated with estrogen and saline the time in the open arm increased (40.34 ± 7.32 / 48.26 ± 7.81 s) when compared to the group treated with oil (17.48 ± 2.73 s). In the rats treated with corticosterone, only the animals treated with the dose of estrogen 100 $\mu\text{g/Kg}$ (52.48 ± 12.01 s) the time in the open arms was higher that their respective control group (23.63 ± 6.03 s). The time in the close arms decreased in the rats treated with estrogen [$F_{(1, 58)}=5.8761$; $p= 0.00478$]. In the groups treated with estrogen in both studied doses and saline (201.19 ± 17.74 s / 184.53 ± 17.41 s), the times in the closed arm were lower compared to their respective control group (240.29 ± 22.50 s).

The time spent in the center of elevate plus maze increased in estrogen-treated groups (58.46 ± 6.63 s / 67.2 ± 7.15 s) when compared to the group treated with oil (42.22 ± 5.63). The distance traveled increased only in the group treated with estrogen at a dose of 100 (9.02 ± 0.84 m), compared to their respective control group, treated with oil (7.32 ± 0.78 m). These results are shown in table 1.

Forced Swim Test

The animals were submitted to the forced swim test for 5 minutes, preceded by a pre-test the previous day. The time of immobility in forced swimming is shown in figure 5-A. The variable treatment with estrogen changed the immobility time [$F(1, 40) = 6.767$; $P = 0.0029$], while the variable administration of corticosterone [$F(1, 40) = F(1, 41) = 2.908$; $P = 0.0957$] and the interaction of the two variables [$F(2, 39) = 2.230$; $P = 0.1204$] showed no differences in analysis of variance. Among the groups submitted to saline administration, the groups treated with estrogen at the two doses presented immobility time (93.12 ± 25.89 / 92.92 ± 15.38) higher than the oil treated group (38.22 ± 14.99). Among the groups submitted to corticosterone administration, the immobility time was higher in the groups treated with oil (85.29 ± 10.51) and estrogen at the dose of $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ (132.23 ± 18.94593) compared to the group which received saline and was treated with oil (38.22 ± 14.99).

Figure 5-B presents mean $\pm$ SEM of the latency for the first episode of immobility in forced swimming. The two variables, corticosterone [$F(1, 40) = 5.965$; $p = 0.0195$] and estrogen, [$F(1, 40) = 5.965$; $p = 0.0195$] as well as the interaction of the two variables [$F(2, 39) = 10.57$; $p = 0.0002$] altered the latency time. The post-test analysis indicated that among the animals submitted to saline administration, the latency time was lower in the estrogen-treated groups at the two concentrations (77.86 ± 5.72 / 67.00 ± 8.49), compared to the oil treated group (129.38 ± 11.24). Among the animals treated with corticosterone, the latency was lower in the group treated with estrogen at the dose of $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ (90.88 ± 5.55) than in the group treated with oil (117.9 ± 6.61).

Table 2 shows the results of the other parameters analyzed in the forced swim test. The behavior of climbing and diving in forced swimming did not change with the variables treatment with estrogen or corticosterone, nor with the interaction of the two variables. However, the behavior of swim variable did not change [$F(1, 42) = 2.051$ $p = 0.1413$], but corticosterone treatment [$F(1, 42) = 6.563$; $p = 0.0141$] and the interaction [$F(2, 42) = 5.519$; $p = 0.0074$] of the two variables altered this behavior. The post-test showed that the groups treated with estrogen at the dose of $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ (58.45 ± 9.71), and corticosterone plus saline (60.19 ± 11.34) or estrogen at both doses (76.49 ± 11.85 / 73.28 ± 9.57) had less swimming time than the control group treated with oil and saline (132.43 ± 19.53).

Telomere length

The results of the analysis of the telomeres length in the paraventricular nucleus are shown in figure 6-A. Corticosterone [F (1,35) = 0.30921; p = 0.58243], or estrogen [F (1,35) = 1.2279; p = 0.30769] and the interaction of these two variables [F (1,35) = 0,30921; p = 0.58243] did not alter the telomere length of the cells in that region. The post-test also did not indicate differences between the groups studied.

The length of the telomeres in the central amygdala is shown in Figure 6-B. Corticosterone did not alter the telomere length of the cells of that region [F (1, 40) = 1.642; p = 0.2070]. However, the variable treatment with estrogen [F (1, 40) = 7.528; P = 0.0016] altered the length of telomeres in this area. The interaction of the estrogen and corticosterone variables showed no difference [F (1, 35) = 0.03242; p = 0.9681]. For the groups submitted to saline administration, the post-test indicated a decrease in the telomeres length in the central amygdala in animals treated with estrogen at both doses, with administration of saline (0.63 ± 0.046 / 0.60 ± 0.041) or corticosterone (0.58 ± 0.052 / 0.54 ± 0.05) compared to the oil-treated animals and administered saline (0.799 ± 0.058).

In figure 6-C the results of the telomere length in the dorsal hippocampus are expressed. Corticosterone [F (1,40) = 0.8075; p = 0.3742] did not alter the telomer length of the cells in that region. The variable treatment with estrogen altered the telomeres length in this area [F (1, 40) = 5.280; P = 0.0092]. The post-test indicated that among groups submitted to saline administration, groups treated with estrogen at the dose of 100 µg / kg (0.57 ± 0.038) or corticosterone (0.59 ± 0.031) presented differences compared to the treated group with oil (0.70 ± 0.05). The interaction of the variables estrogen and corticosterone did not show differences in the analysis of variance [F (1,35) = 0,7639; p = 0.4725].

DISCUSSION

Treatment with estradiol cypionate was effective in increasing plasma concentrations of estrogen, which in turn led to a reduction in plasma concentrations of gonadotrophins (LH and FSH). These data are in accordance with the classical concept of negative feedback control of estrogen in the hypothalamic pituitary gland (HPG) axis. (34,35)

Corticosterone administration reduced or increased gonadotrophin concentrations, respectively, in animals treated or not treated with estradiol cypionate. Chronic activation of the HPA axis, which results in elevated plasma glucocorticoid concentrations, has an inhibitory effect on several hormonal systems, including the HPG axis as previously described in the literature (36,37). Glucocorticoids act inhibitoryly at different levels of the HPG axis, the hypothalamus, the pituitary gland, and the ovary. (38,39) It is the mimicry of chronic stress that is known to inhibit reproductive function. On the other hand, the increased concentration of gonadotrophins induced by the administration of corticosterone in animals not treated with estradiol cypionate is more complex to interpret. There is a data in the literature of in vitro experiment with culture of cells of the pituitary, that shows corticosterone stimulating effect on the secretion of FSH(40) Thus, a direct stimulatory action of corticosterone on the pituitary gland could be a hypothesis of interpretation. This action could eventually be facilitated by the absence of the negative feedback mechanism of estrogen. It should also be considered that this stimulating action of corticosterone may also be related to the dose used. Another possibility to consider is the action of corticosterone on the hypothalamus causing alteration in the release of gonadotrophin releasing hormone (GnRH). The CRH is one of the main inhibitors of the activity of the reproductive axis. (41–43) The CRH can act directly by inhibiting GnRH neurons, and indirectly by stimulating opiagic neurons that have inhibitory action on GnRH neurons. (44,45) Administration of corticosterone inhibits CRH neurons in the hypothalamus. Thus, the removal of two inhibitory modulatory factors on GnRH neurons (CRH reduction by corticosterone administration and reduction of estrogen by ovariectomy and absence of treatment in the analyzed group) would facilitate their secretory activity, resulting in greater stimulation of the pituitary with higher secretion of gonadotrophins. In groups receiving saline, plasma corticosterone concentration was higher in the estradiol-treated groups compared to the untreated. This result is consistent with several studies showing higher concentrations of glucocorticoids in females associated with high estrogen concentrations, depending on the phase of the estrous cycle. (46,47)

In the groups treated with estradiol cypionate receiving corticosterone, glucocorticoid concentrations were similar to the concentrations of the oil treated group that received saline. Therefore, administration of corticosterone neutralized the effect of estradiol cypionate. This reduction can also be observed under stress and is

attributed to a bidirectional modulation of estrogen on the HPA axis, which may either increase or reduce its activity (27). Other researchers have demonstrated that chronic corticosterone administration may reduce endogenous glucocorticoid secretion in a stressful situation, accompanied by inhibition of paraventricular nucleus activity. (32) Our results corroborate this interaction between corticosterone and estrogen in the regulation of HPA axis activity. Progesterone secretion increased in the estradiol-treated groups receiving saline but did not change in the treated groups receiving corticosterone. Progesterone, one of the primary steroids synthesized from cholesterol, is one of the precursors to various steroid hormones, including glucocorticoids. Progesterone secretion is increased in response to various types of stressors and is used as a marker of stress system activity. (48–50) As we used ovariectomized rats in our experiments, the variation of progesterone secretion is of adrenal origin, and therefore, related to the alteration of HPA axis activity.

Regarding the paraventricular nucleus of the hypothalamus, central and integrating component of the HPA axis, it was found that treatment with estradiol cypionate significantly reduced the mRNA expression for POMC, CRH and AVP compared to untreated. Other researchers have also shown that estrogen is able to reduce mRNA expression for CRH (51), AVP (52) and POMC. (53) The fact that treatment with estradiol cypionate increases the secretion of hormones related to the HPA axis, such as corticosterone and progesterone, and reduce mRNA expression for CRH, AVP and POMC indicates that estrogen action should involve mechanisms other than these mediators in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. There is evidence that increased glucocorticoid concentration may be associated directly with increased sympathetic-medullary activity (54,55), in which estrogen may be acting. Corticosterone administration also reduced mRNA expression for POMC and CRH, but increased mRNA expression for AVP. The reduction of mRNA expression for CRH and POMC by corticosterone is also described by other authors, and is attributed to the negative feedback action. (56,57)

In relation to mRNA for AVP, the literature presents pathological conditions (depression, Alzheimer, etc.), in which the increase of this expression is associated to the hyperactivity of the HPA axis, therefore with high plasma concentrations of glucocorticoids. It is argued that in these situations control of the HPA axis is more dependent on AVP than on CRH. (58,59) On the other hand, in situations of chronic stress, an increase of mRNA for PVA is higher than for CRH. (60) We did not use a

stress model induced by a stressor stimulus, but mimicked an effector action related to HPA axis hyperactivity with corticosterone administration. These data together indicate that in chronic situations of elevated glucocorticoid plasma concentration (induced by some specific pathology, by stress, or by exogenous administration), this hormone would modify the hypothalamic molecular context of HPA axis control. In the behavioral test in the high cross maze it was found that in animals treated with estradiol cypionate that received and saline, the number of entries and time in the open arm increased compared to untreated animals. In animals receiving corticosterone, in the estrogen-treated group at the dose of 100 µg / ml, the number of entries and time in the open arm increased with respect to the saline-treated group.

The elevated plus maze test is an experimental method for analyzing anxiety behavior in rats and is used to test the anxiolytic and anxiogenic effects of drugs and hormones. (61) Our results showed that number of entries and length of stay in open arms were higher in animals treated with estrogen, indicating an anxiogenic effect. As reported in other papers. (62–64) Activation of serotonin receptors may result in anxiolytic response (65), and estrogen may modulate this response (66). Other neurotransmitters and hormones may participate in this response. Oxytocin is associated with reduced anxiety, and estrogen increases the number of receptors for this hormone in the ventromedial and central nucleus of the amygdala in rats (67).

The increase in immobility time in the forced swim test is related to a behavioral effect similar to depression, which was observed in the groups treated with estradiol cypionate. In the literature it is described in forced swimming tests that ovariectomy in rats can reduce immobility (68) and increase the behavior similar to depression. (69) In turn, estrogenic hormone therapy may induce antidepressant effects. (70,71) The divergence of our results can be explained by the time of treatment, the type of estrogen or the dose used factors that may interfere with the response. (72) We used a physiological dose to reproduce concentrations similar to the proestrus phase or supraphysiological dose for 28 days. It must also be considered that hormonal treatment with estradiol cypionate, at the doses used, increased the secretion of corticosterone. And prolonged exposure to glucocorticoids may increase behaviors similar to depression. (73)

In the groups submitted to corticosterone administration, the immobility time was higher in both the untreated group with estradiol cypionate and in the group

treated with supra-physiologic dose when compared to the untreated group receiving saline. These data corroborate with others described in the literature, in which treatment with corticosterone (22) as well as exposure to stress (74) increase behavior similar to depression.

In summary treatment with estradiol cypionate at the doses and time of treatment used may have anxiolytic effects and increase in behavior similar to depression. The latter was also verified with the administration of corticosterone. Although anxiety and depression are two different types of disorders, in many cases, increased HPA axis activity can trigger these disorders.

In the telomere length analysis, it was found that: estradiol cypionate and corticosterone did not cause changes in PVN cells; estradiol cypionate reduced the telomeres length in the central amygdala in animals receiving saline or corticosterone; estradiol cypionate only at the supraphysiological dose reduced the telomeres length in the dorsal hippocampus in animals receiving saline or corticosterone. Chronic stress is one of the factors that can accelerate shortening of telomeres. (23,75,76) Oxidative stress is one of the major mechanisms involved in the shortening of telomeres during chronic stress. (77–79)

Elevation of plasma corticosterone concentration by exogenous administration at the dose used during the 28-day time course was not able to alter the telomeres length in PVN, central amygdala and dorsal hippocampus cells. It cannot be ruled out that changes may occur with other doses and other times of administration. The hippocampus is one of the regions of the brain with intense mitotic activity and neurogenesis. (80,81) Wei et al. (2015) found a reduction of telomeres in the hippocampus of rats in a genetic model of depression with HPA axis hyperactivity. On the other hand, treatment with estradiol cypionate was effective in reducing the telomeres length in the central amygdala and dorsal hippocampus, but not in PVN. This indicates that there is differentiation of response in the brain areas. There are studies showing the protective effect of estrogen on the length of the telomeres in leukocytes. (82–84) Changes in telomeres in brain regions need to be further investigated in their relationships with neuronal death, as well as possible neuroprotective actions to delay or prevent telomere shortening.

Fine control of plasma glucocorticoid concentrations is essential for the maintenance of life. The increase in glucocorticoids, due to a stressor, allows the body to adjust the energy metabolism to adapt to the challenges of the stress

condition. However, the chronic activation of these mechanisms can cause physical and psychological changes detrimental to the organism. The changes observed in this study demonstrated that the increase in the activity of the HPA axis by estrogen was accompanied by changes in the forced swimming test, with an increase in behavior similar to depression. The telomeres of the central amygdala and hippocampus were also altered, reducing the length. Among the functions of the telomeres is the protection of the DNA, avoiding that it undergoes degradations, rearrangements and fusions. When the telomere reaches a critical size, where it can no longer protect DNA, the cell goes into apoptosis or a breakdown occurs in its genetic content, which can lead to certain types of cancer. In this work we cannot say that the cells of the brain areas whose telomere length was reduced were suffering apoptosis. Do not do this evaluation. The set of results of this work shows that modification in HPA axis activity and the variation of estrogen plasma concentrations can cause several alterations in hormonal actions, behavioral activities and DNA structure in brain areas.

CONCLUSION

Estrogen modulates the activity of the HPA axis, and the corticosterone concentrations may to influence this modulation. Simultaneous treatment with estrogen and corticosterone levels induced glucocorticoids keeps near the control group, treated with oil and saline. Estrogen reduces anxiety of rats, as can be seen in the elevated plus maze, but produces depression-like behaviors observed in the forced swim test. The telomeres length in the PVN was not changed by treatment with corticosterone and estrogen, but in the central amygdala and dorsal hippocampus treatment with estrogen reduced the length of the telomere.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Marina Holanda and Rubens Fernando de Mello for the technical assistance. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

FIGURE LEGEND

Figure 1. Effects of estrogen and corticosterone on plasma estrogen (A), LH (B) and FSH (C). Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol ($50\mu\text{g/Kg}$ and $100\mu\text{g/Kg}$) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. $n = 8-10$ rats per group.

Figure 2. Plasma concentration of corticosterone (A) and progesterone (B) in female rats. Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol ($50\mu\text{g/Kg}$ and $100\mu\text{g/Kg}$) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. (#) $p < 0.05$ with OVX + CORTICO. $n = 8-10$ rats per group.

Figure 3. RT-PCR of mRNA for CRH, AVP in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and POMC in the pituitary. (A-D-G) OVX / Saline (calibrator) vs. OVX / Saline + Estrogen $50\mu\text{g/kg}$ and $100\mu\text{g / kg}$. (B-E-H) OVX / Saline (calibrator) vs. OVX/Cortico. (C-F-I) OVX/ Cortico (calibrator) vs. OVX / Cortico + Estrogen $50\mu\text{g/kg}$ and $100\mu\text{g/kg}$. Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol ($50\mu\text{g/Kg}$ and $100\mu\text{g/Kg}$) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. (#) $p < 0.05$ with OVX + CORTICO. $n = 4$ rats per group.

Figure 4. Number of entries (A) and Time (B) into the open arms, exhibited after one 5-min session in the elevated plusmaze. Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol ($50\mu\text{g/Kg}$ and $100\mu\text{g/Kg}$) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. (#) $p < 0.05$ with OVX + CORTICO. $n = 8-10$ rats per group.

Figure 5. Time (A) and latency to immobility (B) forced swim test. Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol (50µg/Kg and 100µg/Kg) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. (#) $p < 0.05$ with OVX + CORTICO. $n = 7-9$ rats per group.

Figure 6. Telomere length in paraventricular nucleus of hypothalamus (A), central amygdala (B) and dorsal hippocampus (C) measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Ovariectomized rats were treated with subcutaneous estradiol (50µg/Kg and 100µg/Kg) or corn oil (vehicle) for twenty-eight consecutive days. And treated with corticosterone 20 mg / kg s.c. diluted in isotonic saline and Tween 80 2 % or with vehicle for twenty-eight consecutive days. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL. $n = 8$ rats per group.

TABLE LEGEND

Table 1: Parameters analyzed in the Elevated plus maze test. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL.

Table 2: Parameters analyzed in the Forced Swim Test. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Significant difference: (*) $p < 0.05$ with OVX + SAL.

REFERENCES

1. **Greider CW.** Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays* 1990;12(8):363–369.
2. **Blackburn EH.** Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350(6319):569–573.
3. **Zakian VA.** Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 1995;270(5242):1601–1607.
4. **Day JP, Marder BA, Morgan WF.** Telomeres and their possible role in chromosome stabilization. *Environ. Mol. Mutagen.* 1993;22(4):245–249.
5. **GOMEZ DE, ARMANDO RG, FARINA HG, MENNA PL, CERRUDO CS, GHIRINGHELLI PD, ALONSO DF.** Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int. J. Oncol.* 2012;41(5):1561–1569.
6. **Webb CJ, Wu Y, Zakian VA.** DNA repair at telomeres: keeping the ends intact. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(6). doi:10.1101/cshperspect.a012666.

7. **Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N.** Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J. Cell. Physiol.* 2014;229(10):1323–1329.
8. **Aubert G, Lansdorp PM.** Telomeres and aging. *Physiol. Rev.* 2008;88(2):557–579.
9. **Price LH, Kao H-T, Burgers DE, Carpenter LL, Tyrka AR.** Telomeres and early-life stress: an overview. *Biol. Psychiatry* 2013;73(1):15–23.
10. **Lung F-W, Chen NC, Shu B-C.** Genetic pathway of major depressive disorder in shortening telomeric length. *Psychiatr. Genet.* 2007;17(3):195–199.
11. **Prather AA, Puterman E, Lin J, O'Donovan A, Krauss J, Tomiyama AJ, Epel ES, Blackburn EH.** Shorter leukocyte telomere length in midlife women with poor sleep quality. *J. Aging Res.* 2011;2011:721390.
12. **Wikgren M, Maripuu M, Karlsson T, Nordfjäll K, Bergdahl J, Hultdin J, Del-Favero J, Roos G, Nilsson L-G, Adolfsson R, Norrback K-F.** Short telomeres in depression and the general population are associated with a hypocortisolemic state. *Biol. Psychiatry* 2012;71(4):294–300.
13. **Mathur MB, Epel E, Kind S, Desai M, Parks CG, Sandler DP, Khazeni N.** Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field. *Brain. Behav. Immun.* 2016;54:158–169.
14. **Nakashima T, Noguchi T, Furukawa T, Yamasaki M, Makino S, Miyata S, Kiyohara T.** Brain oxytocin augments stress-induced long-lasting plasma adrenocorticotrophic hormone elevation in rats. *Neurosci. Lett.* 2002;321(3):161–164.
15. **Nishioka T, Anselmo-Franci JA, Li P, Callahan MF, Morris M.** Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1998;781(1–2):57–61.
16. **Ulrich-Lai YM, Herman JP.** Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(6):397–409.
17. **Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ.** Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod.* 2000;5(2):105–113.
18. **Levy BH, Tasker JG.** Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Front. Cell. Neurosci.* 2012;6:24.
19. **Herman JP, Mueller NK.** Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav. Brain Res.* 2006;174(2):215–224.
20. **Brown ES, Chandler PA.** Mood and Cognitive Changes During Systemic Corticosteroid Therapy. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 2001;3(1):17–21.
21. **Ciriaco M, Ventrice P, Russo G, Scicchitano M, Mazzitello G, Scicchitano F, Russo E.** Corticosteroid-related central nervous system side effects. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2013;4(Suppl 1):S94-98.
22. **Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm D-H.** Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. *Biomol. Ther.* 2013;21(4):313–322.

23. **Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM.** Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(49):17312–17315.
24. **Mitchell C, Hobcraft J, McLanahan SS, Siegel SR, Berg A, Brooks-Gunn J, Garfinkel I, Notterman D.** Social disadvantage, genetic sensitivity, and children's telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(16):5944–5949.
25. **Aulinas A, Santos A, Valassi E, Mato E, Crespo I, Resmini E, Roig O, Bell O, Webb SM.** [Telomeres, aging and Cushing's syndrome: are they related?]. *Endocrinol. Nutr. Organo Soc. Espanola Endocrinol. Nutr.* 2013;60(6):329–335.
26. **Carey MP, Deterd CH, de Koning J, Helmerhorst F, de Kloet ER.** The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J. Endocrinol.* 1995;144(2):311–321.
27. **Ochedalski T, Subburaju S, Wynn PC, Aguilera G.** Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J. Neuroendocrinol.* 2007;19(3):189–197.
28. **Kitay JI, Coyne MD, Newsom W, Nelson R.** Relation of the ovary to adrenal corticosterone production and adrenal enzyme activity in the rat. *Endocrinology* 1965;77(5):902–908.
29. **Vamvakopoulos NC, Chrousos GP.** Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J. Clin. Invest.* 1993;92(4):1896–1902.
30. **Barrett ELB, Richardson DS.** Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell* 2011;10(6):913–921.
31. **Lin J, Kroenke CH, Epel E, Kenna HA, Wolkowitz OM, Blackburn E, Rasgon NL.** Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. *Brain Res.* 2011;1379:224–231.
32. **Skórzewska A, Bidziński A, Lehner M, Turzyńska D, Wiśłowska-Stanek A, Sobolewska A, Szyndler J, Maciejak P, Taracha E, Płaźnik A.** The effects of acute and chronic administration of corticosterone on rat behavior in two models of fear responses, plasma corticosterone concentration, and c-Fos expression in the brain structures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006;85(3):522–534.
33. **Kula J, Blasiak A, Czerw A, Tylko G, Sowa J, Hess G.** Short-term repeated corticosterone administration enhances glutamatergic but not GABAergic transmission in the rat motor cortex. *Pflugers Arch.* 2016;468:679–691.
34. **Lemarchand-Béraud T, Reymond M, Rappoport G, Magrini G, Gomez J.** [Effect of the steroid sex hormones on the LH and FSH responses to LHRH in the normal subject]. *Pathol. Biol. (Paris)* 1975;23(10):917–922.
35. **McPherson JC, Costoff A, Mahesh VB.** Influence of estrogen-progesterone combinations on gonadotropin secretion in castrate female rats(1). *Endocrinology* 1975;97(4):771–779.
36. **Collu R, Gibb W, Ducharme JR.** Effects of stress on the gonadal function. *J. Endocrinol. Invest.* 1984;7(5):529–537.

37. **Rabin D, Gold PW, Margioris AN, Chrousos GP.** Stress and reproduction: physiologic and pathophysiologic interactions between the stress and reproductive axes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988;245:377–387.
38. **Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW.** Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann. Intern. Med.* 1998;129(3):229–240.
39. **Whirledge S, Cidlowski JA.** Glucocorticoids, Stress, and Fertility. *Minerva Endocrinol.* 2010;35(2):109–125.
40. **Suter DE, Schwartz NB.** Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1985;117(3):849–854.
41. **Barbarino A, De Marinis L, Tofani A, Della Casa S, D’Amico C, Mancini A, Corsello SM, Sciuto R, Barini A.** Corticotropin-releasing hormone inhibition of gonadotropin release and the effect of opioid blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989;68(3):523–528.
42. **Olster DH, Ferin M.** Corticotropin-releasing hormone inhibits gonadotropin secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987;65(2):262–267.
43. **Rooszendaal MM, Swarts JJ, Wolbers WB, Threels A, Wiegant VM, Mattheij JA.** Effect of CRH on the preovulatory LH and FSH surge in the cyclic rat: a role for arginine vasopressin? *J. Neuroendocrinol.* 1996;8(10):765–770.
44. **Almeida OF, Hassan AH, Harbuz MS, Linton EA, Lightman SL.** Hypothalamic corticotropin-releasing hormone and opioid peptide neurons: functional changes after adrenalectomy and/or castration. *Brain Res.* 1992;571(2):189–198.
45. **Rasmussen DD, Gambacciani M, Swartz W, Tueros VS, Yen SS.** Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human mediobasal hypothalamus in vitro: opiate receptor-mediated suppression. *Neuroendocrinology* 1989;49(2):150–156.
46. **Kitay JL.** Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology* 1961;68:818–824.
47. **Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R.** Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 2003;68(5):439–445.
48. **Fajer AB, Holzbauer M, Newport HM.** The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *J. Physiol.* 1971;214(1):115–126.
49. **Budec M, Koko V, Milovanović T, Balint-Perić L, Petković A.** Acute ethanol treatment increases level of progesterone in ovariectomized rats. *Alcohol Fayettev. N* 2002;26(3):173–178.
50. **Valdez SR, Bonafede MM, Carreño NB, Deis RP, Jahn GA.** Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague Dawley rats. *Stress Amst. Neth.* 2012;15(4):361–377.
51. **Paulmyer-Lacroix O, Héry M, Pugeat M, Grino M.** The modulatory role of estrogens on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular

- nucleus of ovariectomized rats: role of the adrenal gland. *J. Neuroendocrinol.* 1996;8(7):515–519.
52. **Nomura M, McKenna E, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S.** Estrogen receptor-beta regulates transcript levels for oxytocin and arginine vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus of male mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2002;109(1–2):84–94.
 53. **Gao Y, He JR, Kapcala LP.** Estrogen inhibits hypothalamic pro-opiomelanocortin gene expression in hypothalamic neuronal cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;45(2):340–344.
 54. **Bornstein SR, Chrousos GP.** Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(5):1729–1736.
 55. **Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP.** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.* 1998;19(2):101–143.
 56. **Makino S, Gold PW, Schulkin J.** Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 1994;640(1–2):105–112.
 57. **Young EA, Kwak SP, Kottak J.** Negative Feedback Regulation following Administration of Chronic Exogenous Corticosterone. *J. Neuroendocrinol.* 1995;7(1):37–45.
 58. **Goncharova ND.** Stress Responsiveness of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis: Age-Related Features of the Vasopressinergic Regulation. *Front. Endocrinol.* 2013;4. doi:10.3389/fendo.2013.00026.
 59. **Labudova O, Fang-Kircher S, Cairns N, Moenkemann H, Yeghiazaryan K, Lubec G.** Brain vasopressin levels in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1998;806(1):55–59.
 60. **Lightman SL.** The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20(6):880–884.
 61. **Walf AA, Frye CA.** Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol. Behav.* 2010;99(2):169–174.
 62. **Nomikos GG, Spyraiki C.** Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology* 1988;27(7):691–696.
 63. **Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC.** Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 2001;74(4–5):435–440.
 64. **Walf AA, Frye CA.** Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gend. Med.* 2009;6(1):300–311.
 65. **Piszczyk L, Piszczyk A, Kuczmanska J, Audero E, Gross CT.** Modulation of anxiety by cortical serotonin 1A receptors. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9. doi:10.3389/fnbeh.2015.00048.

66. **Andrade TGCS de, Silva JV dos S, Batistela MF, Frei F, Sant'Ana AB.** Interaction between estradiol and 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus on acquisition of aversive information and association to the context in ovariectomized rats. *Neurobiol. Stress* 2017;7:80–88.
67. **Quiñones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JP, Pfaff DW.** Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology* 1997;65(1):9–17.
68. **Walker CD, Trottier G, Rochford J, Lavallée D.** Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. *J. Neuroendocrinol.* 1995;7(8):615–622.
69. **Li L-H, Wang Z-C, Yu J, Zhang Y-Q.** Ovariectomy Results in Variable Changes in Nociception, Mood and Depression in Adult Female Rats. *PLoS ONE* 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0094312.
70. **Koss WA, Einat H, Schloesser RJ, Manji HK, Rubinow DR.** Estrogen effects on the forced swim test differ in two outbred rat strains. *Physiol. Behav.* 2012;106(2):81–86.
71. **Rocha BA, Fleischer R, Schaeffer JM, Rohrer SP, Hickey GJ.** 17 β -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- β knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 2005;179(3):637–643.
72. **Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C.** Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2003;28(5):830–838.
73. **Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM.** The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 2011;36(3):415–425.
74. **Tamburella A, Leggio GM, Micale V, Navarria A, Bucolo C, Cicirata V, Drago F, Salomone S.** Behavioural and neurochemical changes induced by stress-related conditions are counteracted by the neurokinin-2 receptor antagonist saredutant. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013;16(4):813–823.
75. **Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong K-K.** Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol. Psychiatry* 2006;60(5):432–435.
76. **Wei YB, Backlund L, Wegener G, Mathé AA, Lavebratt C.** Telomerase dysregulation in the hippocampus of a rat model of depression: normalization by lithium. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2015;18(7):pyv002.
77. **Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N.** Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci.* 1998;63(11):935–948.
78. **von Zglinicki T.** Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 2002;27(7):339–344.
79. **Kawanishi S, Oikawa S.** Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1019:278–284.

80. **Ming G-L, Song H.** Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 2011;70(4):687–702.
81. **Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH.** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998;4(11):1313–1317.
82. **Bayne S, Li H, Jones MEE, Pinto AR, van Sinderen M, Drummond A, Simpson ER, Liu J-P.** Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. *Protein Cell* 2011;2(4):333–346.
83. **Lee D-C, Im J-A, Kim J-H, Lee H-R, Shim J-Y.** Effect of Long-Term Hormone Therapy on Telomere Length in Postmenopausal Women. *Yonsei Med. J.* 2005;46(4):471–479.
84. **Shin Y-A, Lee K-Y.** Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women. *J. Exerc. Rehabil.* 2016;12(3):238–246.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Table 1.

Behavior	Grupos Experimentais					
	SALINA			CORTICO		
	OVX	E2 50	E2 100	OVX	E2 50	E2 100
Entries in to close arms	9,8± 1,09	11,91± 1,06	12,18± 1,18	9,09± 0,09	9,9± 1,28	9,77± 1,45
Time in to close arms (s)	240,2± 22,5	201,1± 17,7*	184,5± 17,4*	221,5± 21,3	220,7± 21,7	202,8± 25,5*
Time in center (s)	42,2± 5,6	58,4± 6,6*	67,2± 7,1*	54,7± 7,9	50,3± 7,6	44,6± 6,9
Distance traveled (m)	7,3± 0,78	8,0± 0,65	9,02± 0,84 *	6,7± 0,75	7,02± 0,88	7,2± 0,92

Table 2.

Behavior	Grupos Experimentais					
	SALINA			CORTICO		
	OVX	E2 50	E2 100	OVX	E2 50	E2 100
Climbs	127,27± 15,1	146,48± 26,3	113,76± 11,1	130,20± 17,5	146,61± 17,7	95,70± 12,3
Swimming	132,43± 19,5	58,45± 9,7 *	90,95± 12,7	60,19± 11,3 *	76,49± 11,8 *	73,28± 9,5 *
Diving	0,79± 0,92	1,35± 0,82	0,45± 0,20	0,24± 0,25	0,59± 0,27	0,01± 0,01