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

ISABELLE RODRIGUES DOS SANTOS

**EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL NA RESPOSTA AO ESTRESSE EM
MODELO ANIMAL DE PERIMENOPAUSA**

Ribeirão Preto

2018

ISABELLE RODRIGUES DOS SANTOS

**EFEITOS DA TERAPIA HORMONAL NA RESPOSTA AO ESTRESSE EM
MODELO ANIMAL DE PERIMENOPAUSA**

Versão original

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Janete A. Anselmo Franci

Ribeirão Preto

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Isabelle Rodrigues

Efeitos da terapia hormonal na resposta ao estresse em modelo animal de perimenopausa/ Isabelle Rodrigues dos Santos. Ribeirão Preto, 2018.

101pg; 30cm

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientação: Prof^ª. Dra. Janete A. Anselmo Franci

1.Perimenopausa. 2.Periestropausa. 3.Estresse. 4.Sistema de estresse. 5.Terapia Hormonal. 6.Estradiol. 7.Progesterona. 5.Corticosterona. 6.Núcleo Paraventricular. 7.Locus Coeruleus. 8.Diepóxido de 4-vinilciclohexeno.

FICHA DE APROVAÇÃO

Isabelle Rodrigues dos Santos

Efeitos da terapia hormonal na resposta ao estresse em modelo animal de perimenopausa

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e,
então, com todo o coração,
dedicar-se a ele.”

- Buda.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha família, por confiar e me incentivar a seguir meus sonhos, independente de quão difíceis de alcançar eles pareçam. Em especial, dedico à minha mãe, Isabella, por todo o amor, carinho, dedicação em me oferecer o melhor sempre e por me acompanhar em cada momento, e minha irmã Caroline, pelo apoio e conselhos.

Aos meus avós maternos e paternos, Fúlvia, Antunes, Elisa, Claudete e Floriano, pelas orações, torcidas, opiniões e conselhos. Vocês são minha fonte de inspiração.

Ao meu noivo Thiago, minha base e inspiração para continuar seguindo sempre em frente. Meu orgulho.

À Gabrielle Almeida (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Durante estes quase seis anos inserida neste mundo da pesquisa e ensino, guardo boas recordações do tempo que se foi. Em especial, gratidão por cada pessoa que tive a oportunidade de conhecer, trabalhar e dividir o caminho. Hoje, posso dizer que estive com as pessoas certas, no lugar certo!

Desta forma, gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora, a Prof^a. Dra. Janete A. Anselmo Franci. Exemplo de amor à profissão, ao ensino e, em especial, a nos ensinar a crescer a cada dia. Obrigada pela confiança e oportunidade.

Aos meus colegas de laboratório, Ruither Carolino, Nayara Pestana, Bruna Kalil e Marina Scafuto. Além de grandes profissionais, são excelentes pessoas. Muito obrigada por toda a paciência, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Aos colegas que já saíram do laboratório, mas os quais a gratidão permanece: Litamara, Nathalí, Natali Cecilia, Yan, Cristiane e Paulo.

Ao meu avô Antunes, pelos conselhos e apoio sempre bem-vindos.

Ao Dr. Rodrigo Rorato, pelas orientações e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, contribuição e interesse para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de Fisiologia e da FORP, em especial a Priscila, Aline e Heitor. Obrigada pelas horas de estudos compartilhadas, pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários da secretaria do programa, por sempre nos auxiliar e socorrer.

E aos funcionários e veterinário do biotérioI da FORP, pela manutenção e cuidado com nossos animais.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais pelo sacrifício.

As empresas de fomento: FAPESP, CNPq e CAPES.

“A vida é uma viagem a três estações: ação, experiência e recordação.”
- Júlio Camargo.

Santos, Isabelle Rodrigues. **Efeitos da terapia hormonal na resposta ao estresse em modelo animal de perimenopausa.** 101pg. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

A perimenopausa é caracterizada como o período de transição da vida reprodutiva para a não reprodutiva em mulheres, e inicia-se com o aparecimento dos sintomas clínicos, prolongando-se até um ano após a última menstruação. Esta fase é caracterizada pela ocorrência de ciclos menstruais irregulares, alterações na produção hormonal, bem como por mudanças comportamentais, neuroendócrinas e metabólicas, sendo o período de maior vulnerabilidade a desordens afetivas quando comparado às outras fases da vida. Apesar dos diversos estudos desenvolvidos acerca das manifestações destes sintomas durante a perimenopausa, ainda pouco se sabe a respeito das modificações na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e da resposta ao estresse. O reagente químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) acelera o processo natural de atresia folicular, possibilitando estudos desta fase da vida reprodutiva. Assim sendo, sua aplicação em roedores constitui um excelente modelo experimental capaz de simular em animais o que ocorre durante a perimenopausa. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar, neste modelo animal de perimenopausa: 1) as respostas endócrinas (corticosterona e progesterona) e neuroniais (atividade das subdivisões parvocelulares medial e posterior - PaMP e PaPo do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do locus coeruleus - LC) ao estresse de contenção e 2) a influência da terapia hormonal sobre estas respostas. Para tanto, ratas Wistar receberam injeções subcutâneas de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes subcutâneos de um pellet contendo placebo (PL), estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol+progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h na fase do diestro, ou 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD/Óleo. O sangue foi coletado imediatamente (0min) e 60min após o final do estresse, quando os animais foram anestesiados e perfundidos para obtenção do tecido cerebral e posterior estudo imunohistoquímico das áreas de interesse. As concentrações basais de corticosterona foram semelhantes entre os grupos Óleo e VCD não estressadas. Contudo, a

secreção de corticosterona em resposta ao estresse das ratas em periostropausa foi 72% menor que a do grupo controle. As concentrações basais de progesterona das ratas em periostropausa foram menores do que aquelas das ratas controles, mas o aumento da secreção deste hormônio induzido pelo estresse agudo por contenção não foi diferente entre os grupos. Centralmente, nas subdivisões PaMP e PaPo do PVN, assim como no LC, o número de neurônios c-Fos positivos expressos não foi diferente entre ratas VCD e óleo e o estresse aumentou de maneira semelhante o número de neurônios ativados em ambos os grupos. A secreção de corticosterona de animais em periostropausa tratados com estradiol, associado ou não à progesterona, foi ainda mais atenuada. Por outro lado, nas ratas tratadas com progesterona, as concentrações de corticosterona após o estresse mostraram-se mais elevadas que as do grupo VCD estressado sem tratamento hormonal. Todos os grupos tratados com hormônios aumentaram a secreção de progesterona em resposta ao estresse, no entanto esta resposta foi amplificada pelo estradiol. Nenhum dos tratamentos hormonais modificou a atividade neuronal após o estresse na PaMP, embora todos tenham atenuado esta resposta na PaPo. No LC, todos os tratamentos bloquearam o aumento de atividade neuronal induzida pelo estresse. Uma hora após o final do estresse, as concentrações de corticosterona e progesterona retornaram aos níveis basais observados nas ratas não estressadas. No entanto, nos grupos tratados com estradiol, os níveis de progesterona não retornaram aos basais, sendo estes níveis significativamente maiores após o fim do estímulo. Em conjunto, nossos resultados demonstram que na periostropausa, embora a secreção de progesterona em resposta ao estresse esteja preservada, a capacidade da adrenal em secretar corticosterona está reduzida. Esta redução parece não estar associada à deficiência central no funcionamento do eixo HPA (PVN) ou do sistema simpático central (LC), mas sim, a disfunções na esteroidogênese adrenal, que foram parcialmente corrigidas pela progesterona exógena. A diminuição da atividade neuronal do LC pelos esteróides ovarianos sugere uma possível atenuação do tônus simpático por estes hormônios. Ainda, a capacidade de recuperação pós-estresse da secreção de corticosterona e de progesterona se mostrou preservada neste modelo experimental.

Palavras-chave: Perimenopausa. Periostropausa. Estresse. Sistema de estresse. Terapia Hormonal. Estradiol. Progesterona. Corticosterona. Núcleo paraventricular. Locus coeruleus. Diepóxido de 4-vinilciclohexeno.

Santos, Isabelle Rodrigues. **Effects of hormonal therapy on stress response in an animal model of perimenopause.** 101pg. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

ABSTRACT

Perimenopause is characterized as the period of transition from reproductive to non-reproductive life in women, and begins with the onset of clinical symptoms, lasting up to one year after the last menstrual period. This phase is characterized by irregular menstrual cycles, alterations in hormonal production, as well as by behavioral, neuroendocrine and metabolic changes, and increased vulnerability to affective disorders when compared to other phases of life. Despite the various studies on the manifestations of these symptoms during perimenopause, little is known about the changes in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and the response to stress. The chemical reagent diepoxide 4-vinylcyclohexene (VCD) accelerates the natural process of follicular atresia, enabling studies of this phase of reproductive life. Therefore, its application in rodents constitutes an excellent experimental model capable of simulating in animals what occurs during perimenopause. Thus, the objective of this study was to evaluate, in an animal model of perimenopause: 1) the endocrine responses (corticosterone and progesterone) as well as the neuronal response (parvocellular subdivisions of PVN, medial- PaMP) and posterior-PaPO and locus coeruleus – LC) to restraint stress and 2) the influence of hormonal therapy on these responses. Female Wistar rats received subcutaneous injections of Oil or VCD for 15 consecutive days, from the 28th day of life. Around the 56th to 66th day of the onset of Oil or VCD administration, the rats of the groups to be stressed received subcutaneous implants of a pellet containing placebo (PL), estradiol (E2), progesterone (P4) or estradiol + progesterone (E2P4). Restraint stress was applied for 30 minutes between 09:00 and 10:00 in the diestrus phase, or 20 days after the onset of hormonal therapy (VCD + E2, VCD + P4 and VCD + E2P4 groups), from 75 to 85 days after starting VCD / Oil administration. The blood was collected immediately (0min) and 60min after the end of stress, when the animals were anesthetized and perfused to take the brain for immunohistochemistry of PVN and LC. Basal corticosterone concentrations were similar between the non-stressed Oil and VCD groups. However, corticosterone secretion in response to stress was 72% lower than that of the control group. The basal progesterone concentrations of periostropausal rats were lower than those of the control rats, but the increase in the secretion of this hormone induced by stress was not different between the

groups. Centrally, in the PaMP and PaPO subdivisions of PVN as well as LC, the number of c-Fos positive neurons expressed was not different between VCD and Oil rats and the stress increased similarly the number of activated neurons in both groups. Corticosterone secretion from estradiol-treated periostropause rats, associated or not with progesterone, was further attenuated. On the other hand, in rats treated with progesterone, post-stress corticosterone concentrations were higher than those in the stressed VCD group without hormonal treatment. All groups treated with hormones increased progesterone secretion in response to stress, however this response was amplified by estradiol. None of the hormone treatments modified neuronal activity after stress in PaMP, although all hormone treatment attenuated this response in PaPo. In the LC, all treatments blocked the increase of neuronal activity induced by stress. One hour after the end of stress, corticosterone and progesterone concentrations returned to the baseline levels observed in the non-stressed rats. However, in the estradiol-treated groups, progesterone levels did not return to the basal levels, these levels being significantly higher after the end of the stimulus. Taken together, our results demonstrate that in periostropause, although progesterone secretion in response to stress is preserved, the ability of the adrenal to secrete corticosterone is reduced. This reduction appears not to be associated with a central deficiency in HPA axis (PVN) or central sympathetic (LC) function, but rather to dysfunctions in adrenal steroidogenesis, which have been partially corrected by exogenous progesterone. The reduction of neuronal LC activity by ovarian steroids suggests a possible attenuation of sympathetic tone by these hormones. Furthermore, the post-stress recovery capacity of corticosterone and progesterone secretion seems to be preserved in this experimental model.

Key words: Perimenopause. Periostropause. Stress. Stress system. Hormonal Therapy. Estradiol. Progesterone. Corticosterone. Paraventricular nucleus. Locus coeruleus. 4-vinylcyclohexene diepoxide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Caracterização do perfil hormonal da mulher em perimenopausa (círculo vazio) em comparação a pós-menopausa (círculo fechado). (extraído de: SANTORO et al, 1996). 19
- Figura 2.** Diversidade de sintomas neurológicos durante a perimenopausa. (Modificado de: BRINTON et al., 2015).. 20
- Figura 3.** Comparação entre o risco de depressão entre os gêneros ao longo da vida e representação esquemática das variações nas concentrações de estradiol na vida da mulher. (extraído de: DEECHER et al, 2008). 21
- Figura 4.** Esquema comparativo do ciclo reprodutivo de roedores (ciclo estral de 4 dias) e de mulheres (ciclo menstrual de aproximadamente 28 dias). (extraído de: DONNER, LOWRY, 2013). 22
- Figura 5.** Comparação entre o modelo de ovariectomia (OVX) e de aceleração da depleção folicular ovariana induzida pelo VCD. (extraído de: JAX® NOTES™, 2005). 24
- Figura 6.** Efeitos do composto químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) sobre os folículos primordiais e primários; e a atresia folicular induzida pelo VCD (Modificado de: BROOKS, POLLOW, HOYER, 2016). 25
- Figura 7.** Representação esquemática dos componentes central e periférico do sistema de estresse (CRH/PVN e LC), suas inter-relações funcionais e suas interações com outros sistemas homeostáticos e moléculas envolvidas na resposta ao estresse. (Extraído de NICOLAIDES et al, 2015). 27

Figura 8. Desenho experimental.....	36
Figura 9. Efeito da depleção folicular ovariana na secreção basal de corticosterona e de progesterona plasmática.	43
Figura 10. Efeito da depleção folicular na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse.....	44
Figura 11. Efeito da depleção folicular na atividade dos neurônios (c-Fos) das subdivisões parvocelular medial (Fig. A, PaMP) e parvocelular posterior (Fig. C, PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.....	45
Figura 12. Efeito da depleção folicular na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.....	46
Figura 13. Efeito da terapia hormonal na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse.....	47
Figura 14. Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.....	48
Figura 15. Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.....	49
Figura 16. Concentrações plasmáticas de corticosterona e de progesterona no período de recuperação (60 minutos após o estresse).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

17-OH: 17-Hidroxilase

3 β HSD: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

ACTH: Corticotrofina

AMH: Hormônio anti-mülleriano

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina

EM: eminência mediana

ER: Receptor de estradiol

ER α : Receptor de estradiol do tipo beta

ER β : Receptor de estradiol do tipo alfa

FSH: Hormônio folículo estimulante

HPA: Hipotálamo-hipófise-adrenal

LC: locus coeruleus

LH: Hormônio luteinizante

NA: Noradrenalina

PaMP: Parvocelular medial

PaPo: Parvocelular posterior

PR: Receptor de progesterona

PVN: núcleo paraventricular

SNC: Sistema nervoso central

SNC: Sistema nervoso central

VCD: Diepóxido de 4-vinilciclohexeno

VCD+E2: Ratas tratadas com VCD com terapia estrogênica

VCD+E2P4: Ratas tratadas com VCD com terapia estrogênica e com progesterona

VCD+P4: Ratas tratadas com VCD com terapia com progesterona

VHC: 4-vinilciclohexeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A perimenopausa	18
1.2 Modelo animal de perimenopausa: a periostropausa	21
1.2.1 O Diepóxido de 4-vinilciclohexeno: VCD	24
1.3 O sistema de estresse	26
1.3.1 Esteróides ovarianos e modulação do sistema de estresse	29
1.4 A Perimenopausa e a percepção de estresse	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Animais	35
3.2 Delineamento experimental	35
3.3 Tratamento com VCD	37
3.4 Tratamento Hormonal	37
3.5 Lavado vaginal	37
3.6 Estresse agudo por contenção	37
3.7 Coleta de amostras de sangue	38
3.8 Anestesia	38
3.9 Perfusão	38
3.10 Imunohistoquímica	39
3.11 Análise Quantitativa	40
3.12 Dosagens Hormonais	41
3.13 Análise Estatística	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Efeito da depleção folicular na secreção basal de corticosterona e progesterona plasmática	43
4.2 Secreção de corticosterona e de progesterona induzida pelo estresse.	43

4.3 Atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.	44
4.4 Atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.	46
4.5 Efeito da terapia hormonal na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse.	47
4.6 Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.	48
4.7 Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.	48
4.8 Efeito do estresse, da depleção folicular e da terapia hormonal no período de recuperação pós-estresse.	49
5 DISCUSSÃO	53
5.1 Secreção basal de corticosterona	54
5.2 Secreção de corticosterona induzida pelo estresse.	55
5.3 Secreção basal de Progesterona	56
5.4 Secreção de progesterona induzida pelo estresse.	57
5.5 Atividade basal e induzida por estresse dos neurônios parvocelulares do PVN.	58
5.6 Atividade basal e induzida por estresse dos neurônios noradrenérgicos do LC	60
5.7 Terapia com estradiol sobre a secreção de corticosterona e progesterona.	62
5.8 Terapia com progesterona sobre a secreção de corticosterona e progesterona.	65
5.9 PVN	68
5.10 LC	71
5.11 Efeito do estresse, da depleção folicular e da terapia hormonal no período de recuperação pós-estresse.	74
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 A perimenopausa

“Os ovários, depois de longos anos de serviço, não têm a capacidade de se aposentar graciosamente na velhice, mas ficam irritados, transmitem sua irritação aos gânglios abdominais, que, por sua vez, transmitem a irritação ao cérebro, produzindo distúrbios no tecido cerebral que se manifestam como extremo nervosismo ou em uma explosão de insanidade.” FARNHAM, 1887, tradução nossa.

Desde o século passado, a percepção de que o envelhecimento reprodutivo feminino acarretava no surgimento de sintomas físicos e de humor em mulheres que atravessavam este período, vem intrigando pesquisadores e estudiosos sobre o que era, até então, considerado como o final da vida reprodutiva: a **menopausa** (FRITZ, SPEROFF, 2011). Hoje, sabemos que o aparecimento da maioria dos sintomas típicos do envelhecimento reprodutivo é característico de uma fase anterior à menopausa, denominada como o período de transição da vida reprodutiva para a não reprodutiva, ou **perimenopausa** (PRIOR, 1998; SCHMIDT; HAQ; RUBINOW, 2004; TWISS et al, 2007).

A perimenopausa pode ser definida como o período que antecede a menopausa, a qual se estende a partir do aparecimento dos sintomas clínicos, até um ano após a última menstruação. Este período de transição pode perdurar por mais de cinco anos, podendo se estender por até uma década, e corresponde à fase de envelhecimento ovariano e declínio acentuado do número de folículos primordiais e primários (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996; PRIOR, 1998; KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2016).

Subjacente a este declínio da função ovariana, a perimenopausa é caracterizada pela ocorrência de ciclos menstruais irregulares, alterações na produção hormonal (SU; FREEMAN, 2009) e, de modo geral, por mudanças comportamentais, neuroendócrinas e metabólicas associadas com a maior vulnerabilidade a desordens afetivas. Assim, podemos considerá-la como uma fase marcante e significativa de alterações fisiológicas que podem afetar drasticamente a qualidade de vida das mulheres (HALE, LECTURE, BURGER, 2009; REIS et al., 2014; SANTORO, 2016).

A fim de estabelecer o perfil hormonal predominante durante a perimenopausa, o estudo desenvolvido por Santoro e colaboradores (1996) caracterizou, por meio da análise de dosagens dos metabólitos urinários dos principais hormônios reprodutivos (hormônio luteinizante LH, hormônios folículo estimulante FSH, estradiol e progesterona) o perfil hormonal das mulheres em perimenopausa e em menopausa, comparando as variações.

observadas entre os dois períodos reprodutivos (Figura 1).

Figura 1. Caracterização do perfil hormonal da mulher em perimenopausa (círculo vazio) em comparação a pós-menopausa (círculo fechado). Note que, durante a perimenopausa, as concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) e do metabólito urinário do estradiol, estrona (E1), encontram-se aumentadas, enquanto as concentrações do metabólito urinário da progesterona, pregnanediol (PDG), encontram-se relativamente reduzidas ao longo do ciclo (extraído de: SANTORO et al, 1996).

De acordo com este estudo, durante a perimenopausa, as concentrações urinárias de LH encontram-se inalteradas quando comparadas às concentrações deste hormônio em mulheres menopausadas; as concentrações de FSH, no entanto, encontram-se elevadas assim como as concentrações dos estrogênios. A progesterona, por sua vez, encontra-se em contínuo declínio, o qual se completa até o estabelecimento da menopausa (SANTORO et al, 1996).

Com o aumento da expectativa de vida, a fase pós-reprodutiva abrange aproximadamente um terço da vida de uma mulher, uma vez que a idade em que a menopausa é estabelecida permanece fixa, apesar da maior longevidade. Deste modo, a proporção de mulheres que experimentarão a transição para a menopausa e suas consequências, tende a aumentar (MURRAY et al, 2015; REHMAN, MASSON, 2005). Relacionando estes achados, sugere-se que as alterações na função ovariana e hormonais, características da perimenopausa, parecem ser os fatores desencadeadores dos principais sintomas observados nas mulheres, durante esse período.

A gama de sintomas que as mulheres na perimenopausa manifestam é diversa (Figura 2), porém, claramente mais significantes neste período do que em comparação a pós-menopausa (SCHOTT-BAER, KOTAL, 2000). Estes sintomas incluem: alterações vasomotoras, suores noturnos (presentes na maioria das vezes) e ondas de calor frequentes,

bem como distúrbios do sono, aumento do ganho de peso, perda do interesse sexual e ocorrência de transtornos afetivos e de humor - como transtornos de ansiedade, agressividade e depressão (CIANO et al, 2017; INAYAT, DANISH, HASSAN, 2017; PRIOR, 1998; WOODS, MITCHELL, 2005).

Figura 2: Diversidade de sintomas neurológicos durante a perimenopausa. A maioria das mulheres experimentará sintomas neurológicos durante a perimenopausa (aprox.80%); no entanto, uma pequena proporção (aprox. 20%) das mulheres passará por esta fase sem apresentarem nenhum dos sintomas típicos. (Modificado de: BRINTON et al., 2015).

De fato, este é o período de maior vulnerabilidade a desordens afetivas, como a depressão, quando comparado a outros períodos da vida (FREEMAN et al, 2006; YEN et al, 2009). Além disso, as flutuações dos hormônios reprodutivos parecem estar relacionadas a maior incidência de depressão neste período, conforme demonstrado no trabalho de DEECHER et al, 2008 (Figura 3). Como podemos observar (painel superior), o risco do desenvolvimento de depressão entre mulheres e homens é o mesmo antes da menarca (primeira menstruação). Após este período, o qual compreende a adolescência e a vida adulta, esta proporção entre os gêneros aumenta. No entanto, é na perimenopausa que o risco de depressão em mulheres se eleva drasticamente, fato que é relacionado às variações nas flutuações hormonais características deste período da vida reprodutiva (painel inferior). Após o estabelecimento da menopausa, o risco das mulheres manifestarem episódios de depressão se iguala aos homens (quando há o cessar da função reprodutiva e da instabilidade hormonal) (DEECHER et al, 2008).

Figura 3: Comparação entre o risco de depressão entre os gêneros ao longo da vida e representação esquemática das variações nas concentrações de estradiol na vida da mulher. Paine superior: risco relativo aproximado de depressão maior entre mulheres e homens, durante toda a vida. Paine inferior: esquema estimado das flutuações hormonais ovarianas de uma mulher ao longo da vida; notar o aumento nas variações da flutuação hormonal ao longo da perimenopausa (extraído de: DEECHER et al, 2008).

Assim, considerando todas as alterações e instabilidades que este inconveniente período da vida reprodutiva das mulheres pode acarretar, fica clara a necessidade de se compreender melhor os mecanismos que governam este período na tentativa de melhorar a qualidade de vida e do envelhecimento das mulheres (SANTORO, 2016; TWISS et al., 2007).

1.2 Modelo animal de perimenopausa: a periostropausa

O processo de transição fisiológica à senescência reprodutiva é uma particularidade observada em muitas espécies de mamíferos, inclusive em mulheres (KERMATH, GORE, 2012). A utilização de roedores para o desenvolvimento de estudos no intuito de avaliar os efeitos do envelhecimento reprodutivo no organismo, similarmente ao que ocorre nas mulheres, é amplamente realizado (FERREIRA et al, 2015; MATT et al, 1986; OLVERA-HERNÁNDEZ, CHAVIRA, FERNÁNDEZ-GUASTI, 2013).

Modelos animais que utilizam fêmeas de roedores, especialmente ratas, se mostram viáveis uma vez que esses animais apresentam ciclos ovulatórios espontâneos e variações cíclicas dos hormônios reprodutivos (ciclo estral) semelhantes ao que é observado em mulheres (ciclo menstrual), conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 4; KERMATH, GORE, 2012; DONNER, LOWRY, 2013).

Figura 4. Esquema comparativo do ciclo reprodutivo de roedores (ciclo estral de 4 dias) e de mulheres (ciclo menstrual de aproximadamente 28 dias). São descritas as flutuações médias dos hormônios circulantes: 17 β -estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) na rata (painel esquerdo) vs. na mulher (painel direito). Barras cinza no painel esquerdo retratam o período noturno das fases do ciclo estral: Diestro tardio, proestro, estro e metaestro (extraído de: DONNER, LOWRY, 2013).

Note que, apesar das diferenças relacionadas à amplitude da secreção dos hormônios reprodutivos em cada fase e da duração do ciclo reprodutivo entre as espécies (4 dias em ratas e aproximadamente 28 dias em mulheres), o perfil de secreção hormonal e a sequência de eventos na rata (Figura 4, gráfico a esquerda) é bastante semelhante ao observado na mulher (Figura 4, gráfico a direita).

É importante notar que enquanto a mulher exibe um aumento inicial da secreção de progesterona no final da fase folicular, após a ovulação a secreção de progesterona do corpo lúteo dá continuidade ao aumento da progesterona folicular, de forma que apenas um pico de progesterona é produzido. A rata, por sua vez, exibe dois picos distintos e separados de progesterona. Um pico de origem folicular, que ocorre na fase de proestro, e um segundo pico de origem luteal, que se inicia na fase de metaestro e diminui durante a madrugada do diestro e o qual termina durante a manhã desta fase (Figura 4). Este segundo pico de progesterona equivale, portanto, ao pico de progesterona lútea da mulher. A queda nos níveis deste hormônio corresponde àquela da fase pré-menstrual, quando ocorre a maioria dos distúrbios de humor típicos da Síndrome Pré-Menstrual.

Além das semelhanças no perfil do ciclo reprodutivo, a fácil manipulação destes animais durante os processos experimentais, bem como o curto período de duração de cada

ciclo reprodutivo (estral), tornam estes animais um bom modelo experimental para os estudos das alterações reprodutivas.

De fato, as ratas também apresentam um período de transição entre a vida reprodutiva e a não reprodutiva ao longo de seu envelhecimento, ou periostropausa (BESTETI et al., 1991; LU et al., 1979; NICOLA et al., 2016), na qual experimentarão os efeitos relacionados à desregulação do eixo reprodutivo, bem como flutuações hormonais resultantes dessa disruptura (WISE et al., 2002). No entanto, o envelhecimento natural (central) e o envelhecimento reprodutivo de roedores parecem ocorrer de forma assíncrona, sendo o contrário do observado nas mulheres (KERMATH, GORE, 2012; TE VELDE et al, 1998).

O modelo de menopausa cirúrgica obtida por meio da ovariectomia (remoção cirúrgica dos ovários) é amplamente utilizado nos estudos em que se pretende avaliar os efeitos da ausência dos hormônios ovarianos ou estudos de menopausa. No entanto, este modelo não nos permite avaliar o processo de transição para o envelhecimento reprodutivo nestes animais, uma vez que a ovariectomia promove a redução abrupta das concentrações hormonais (ver painel inferior da Figura 5), não reproduzindo o que ocorre em mulheres durante a perimenopausa (KERMATH, GORE, 2012). Deste modo, com a descoberta do reagente químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) foi possível o estabelecimento de um excelente modelo para os estudos da perimenopausa, uma vez que a exposição de fêmeas de roedores ao VCD favorece a falha precoce da função ovariana por acelerar a depleção dos folículos primordiais e primários e, portanto, acelerando o processo de envelhecimento reprodutivo. Além disso, são observadas alterações hormonais, bem como de ciclicidade, semelhantes às aquelas relatadas em mulheres na perimenopausa (ver quadro figura 5).

Figura 5. Comparação entre o modelo de ovariectomia (OVX) e de aceleração da depleção folicular ovariana induzida pelo VCD. A ciclicidade, os níveis de estrogênios e os níveis de FSH são semelhantes em roedores fêmeas induzidas por VCD e em mulheres durante a perimenopausa (retângulo preto). Fêmeas ovariectomizadas (OVX) perdem essa faixa de transição da perimenopausa, se dirigindo diretamente a pós-menopausa (ou seja, após diagnóstico da menopausa na mulher). Os valores para a menopausa induzida por VCD são relativos ao início do protocolo de injeção VCD de 15 dias (extraído de: JAX® NOTES™, 2005).

1.2.1 O Diepóxido de 4-vinilciclohexeno: VCD

O VCD é um metabólito do composto químico VHC (4-vinilciclohexeno) produzido durante a fabricação de borracha sintética, pneus, inseticidas, retardantes de fogo e diversos outros tipos de produtos plásticos. É utilizado como reagente químico diluente de epóxidos e diepóxidos em geral, como resinas de Bisfenol A e epicloridrina.

A principal característica toxicológica deste reagente é a de produzir dano seletivo aos folículos pré-antrais primordiais e primários contidos nos ovários, sendo a sua principal consequência a aceleração da depleção folicular ovariana (Figura 6), reduzindo o *pool* finito destes folículos. Assim, uma vez que o *pool* de folículos primordiais é esgotado, o resultado é a cessação da ovulação e o estabelecimento da senescência reprodutiva, ou seja, menopausa precoce e infertilidade (DEVINE, SIPES, HOYER, 2001; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1989).

Figura 6. Efeitos do composto químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) sobre os folículos primordiais e primários; e a atresia folicular induzida pelo VCD (Modificado de: BROOKS, POLLOW, HOYER, 2016).

Os primeiros efeitos do VCD foram reportados em mulheres que trabalhavam em indústrias de manufatura destes produtos, onde o contato dérmico ou a inalação crônica do composto acarretava na maior incidência de menopausa precoce nessas mulheres (SPRINGER et al, 1996). Além disso, diversos estudos tem sugerido que o principal mecanismo de ação do VCD é por meio da atuação em vias apoptóticas, as quais culminariam experimentalmente nas alterações endócrinas observadas em mulheres durante a perimenopausa e menopausa (HOYER et al, 2001; MARK-KAPPELER et al, 2011).

Uma vez que o número crítico de folículos ovarianos e não a idade da mulher parece ser o fator determinante do início do envelhecimento e da capacidade reprodutiva, o uso do VCD se torna um bom modelo para a execução de estudos translacionais sobre o envelhecimento reprodutivo progressivo sendo atualmente, o modelo que mais se aproxima ao que é observado em mulheres durante este período da vida reprodutiva (FADDY et al, 1992; KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2016).

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar os aspectos neuroendócrinos e comportamentais em modelo animal de perimenopausa induzida por VCD, a fim de estabelecer os mecanismos que regem este período e que, por muitas vezes, promovem importantes modificações na qualidade de vida das mulheres, conforme já destacado anteriormente.

Dada as semelhanças entre os ciclos reprodutivos das mulheres e das ratas, os estudos desenvolvidos neste modelo animal são realizados na fase do diestro do ciclo estral, como já mencionado anteriormente, por corresponder ao período de queda contínua das concentrações de progesterona lútea (Figura 4) e a qual, por muitas vezes, é responsável pelo

desencadeamento da síndrome pré-menstrual, período de elevada irritabilidade e de alterações de humor (LOVICK, 2012). Desta forma, nossos estudos são desenvolvidos no diestro com o propósito de avaliar as alterações neuroendócrinas e comportamentais características da transição da vida reprodutiva para a não reprodutiva.

De fato, o modelo animal de perimenopausa induzida por VCD desencadeia alterações nos parâmetros hormonais semelhantes aos descritos em mulheres neste período da vida, onde as concentrações de estradiol encontram-se normais ou erraticamente elevadas, enquanto que as concentrações de progesterona estão reduzidas, quando comparadas às suas controles. Além disso, já demonstramos haver aumento do comportamento do tipo ansioso (REIS et al, 2014), depressivo e agressivo (Weisheimer et al; Scafuto et al, dados não publicados) nos animais em periropausa. Assim, os resultados obtidos neste modelo experimental corroboram com o observado em mulheres demonstrando ser um bom modelo para o desenvolvimento de estudos de cunho translacional e nos permitindo investigar mais a fundo os mecanismos e as consequências que governam este período.

1.3 O sistema de estresse

A todo instante, fatores desestabilizadores provindos de diversas origens, podem ser ameaçadores para os seres vivos. Assim, os organismos desenvolveram a capacidade de gerar e modular, a partir da atividade de um sistema altamente conservado, respostas a estes fatores desestabilizadores. Esta modulação é deflagrada pela atividade de um sistema denominado “sistema de estresse”. Este sistema, que na realidade consiste na atividade orquestrada de uma gama de estruturas centrais e respostas periféricas, é capaz de articular respostas para permitir ao organismo se reestabelecer frente a um amplo espectro de estímulos, considerados ameaçadores de seu equilíbrio - da homeostasia. De maneira geral, estresse é tido como um estado de homeostasia ameaçada e sua resposta frente ao desequilíbrio é a resposta ao estresse (CHROUSOS, GOLD, 1992; NICOLAIDES et al, 2015).

O sistema de estresse é composto pela atividade coordenada de componentes centrais e periféricos. Os dois principais componentes centrais deste sistema incluem grupamentos neurais que se localizam no hipotálamo e tronco cerebral, os quais recebem informações oriundas de centros superiores do sistema nervoso central (SNC) e da periferia. Os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e o locus coeruleus (LC), localizado no tronco encefálico, são os principais componentes centrais do sistema de estresse e responsáveis pela secreção, respectivamente, de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e

noradrenalina (NA). Já os componentes periféricos incluem a adrenal, comandada pelo sistema hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA), em conjunto com o sistema eferente simpático (regulado pelo simpático central). Juntos, eles compõem as vias pelas quais o cérebro influencia todo o organismo em resposta às situações de estresse (Figura 7). Esses sistemas encontram-se interligados de maneira que a ativação de um pode desencadear a ativação do outro e vice-versa (ASSENMACHER et al, 1995; CHROUSOS, GOLD, 1992; PACÁK, PALKOVITS, 2001).

Figura 7. Representação esquemática dos componentes central e periférico do sistema de estresse (CRH/PVN e LC), suas inter-relações funcionais e suas interações com outros sistemas homeostáticos e moléculas envolvidas na resposta ao estresse. A ativação é representada por linhas sólidas e inibição por linhas tracejadas. POMC: Pro-opiomelanocortina; GABA: ácido γ -aminobutírico; BZD: benzodiazepina; NPY: neuropeptídeo Y; SP: substância P (Extraído de NICOLAIDES et al, 2015).

A ativação do eixo HPA é o principal evento relacionado à resposta ao estresse. O CRH produzido nos neurônios parvocelulares do PVN é liberado durante o estresse nos capilares do plexo primário da eminência mediana (EM). Por meio do sistema porta-hipofisário, o CRH liberado na EM alcança os corticotrofos localizados na adenohipófise, promovendo a liberação de corticotrofina (ACTH) por estas células. O ACTH por sua vez, é liberado na corrente sanguínea alcançando a córtex da adrenal, onde induz a síntese e secreção

de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) pela zona fasciculada da adrenal (HINSON, 1990; KALIL et al, 2013; RIVIER, PLOTSKY, 1986). As elevações nas concentrações plasmáticas dos glicocorticóides são detectadas minutos após o início da aplicação do estresse sendo estes considerados importantes marcadores da resposta ao estresse (HERMAN et al, 2016; MUNCK, GUYRE, HOLBROOK, 1984; VAHL et al, 2005). Assim, os glicocorticoides são os efetores finais do eixo HPA e participam do controle de toda a homeostase corporal e da resposta do organismo ao estresse.

A córtex da adrenal não somente libera glicocorticóides da zona fasciculada, mas também promove a secreção de progesterona sintetizada pela zona reticulada (SHORT, 1960; FAJER et al, 1971) e liberada em resposta ao estímulo do ACTH (HEAP, HOLZBAUER, NEWPORT, 1966; FAJER et al, 1971; BROWN et al, 1976; PLAS-ROSER, ARON 1981; BOEHM et al. 1982; BOEHM et al, 1982; BRUCE et al. 1984; SCHAEFFER et al, 1986; SCHAEFFER C, ARON C., 1987)

O efeito do estresse sobre a secreção de progesterona tem sido estudado em animais e em humanos. Foi demonstrado que a exposição a estímulos estressantes induz o aumento da secreção de progesterona de origem adrenal em ratos machos (DEIS et al, 1989; DUNCAN et al, 1998; ANDERSEN et al, 2004; ROMEO et al, 2005, 2006; KALIL et al, 2013) e em fêmeas (NEQUIN et al, 1975; PLAS-ROSER, ARON, 1981; BOEHM et al, 1982; DEIS et al, 1989; BRUCE et al, 1984; ROMEO et al, 2004; TRASLAVINÃ, FRANCI 2011; KALIL et al, 2013; KALÁSZ et al, 2014), bem como em homens (BREIER, BUCHANAN, 1992; ELMAN, BREIER, 1997; CHILDS et al, 2010) e em mulheres (CHILDS et al, 2010; HERRERA et al, 2016). Desta forma, a progesterona tem se mostrado um excelente marcador de estresse.

Além da ativação do eixo HPA, outro sistema ativado prontamente em resposta a diferentes tipos de estresses é o sistema noradrenérgico central, composto principalmente pelo LC (MORILAK et al, 2005; PACÁK, PALKOVITS, 2001). O LC consiste em um pequeno agrupamento de neurônios situado bilateralmente na ponte, ao lado do quarto ventrículo. Este núcleo foi assim denominado devido à sua coloração azul escura com que se apresenta em primatas. Ele é composto quase que totalmente de neurônios noradrenérgicos sendo o local do SNC mais rico em noradrenalina. Apesar do pequeno tamanho, ele se projeta difusamente para todo o SNC por meio de um padrão de ramificação característico onde apenas um único corpo celular pode, por emissão de colaterais de axônios, projetar-se para várias regiões do cérebro.

O LC dá origem a três vias principais: 1) uma via descendente para os núcleos bulbares e medula, 2) uma via lateral para o cerebelo e 3) uma via ascendente para o mesencéfalo, diencéfalo e telencéfalo (UNGERSTEDT, 1971). Pela via descendente o LC ativa o sistema simpático periférico, importante na modulação das respostas ao estresse. Entre inúmeros grupos neuronais que o LC inerva por meio da via ascendente, está o núcleo PVN, onde se encontram os neurônios produtores de CRH que controla a atividade do eixo HPA (SAWCHENKO, SWANSON, 1982b).

A liberação de NA que ocorre no SNC é, em parte, desencadeada pela ativação dos neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral induzida pelo CRH do PVN e, por sua vez, a NA parece aumentar a secreção de ACTH por estimular a liberação de CRH (ITOI et al, 1994).

Duas principais subdivisões parvocelulares do PVN são compostas por neurônios responsáveis pela modulação do sistema de estresse, em especial os neurônios CRH (BENEDETTI et al, 2008) e estão envolvidas no controle dessa modulação entre o PVN e o LC. Neurônios localizados na subdivisão parvocelular medial (PaMP) do PVN, enviam projeções para a eminência mediana estando mais envolvidos no controle hipotalâmico, enquanto que as projeções que partem de neurônios localizados na subdivisão parvocelular posterior (PaPo) são direcionadas ao tronco cerebral e medula espinhal, em especial para o LC e em menor grau para a eminência mediana (SAWCHENKO, SWANSON, 1982).

Assim, o PVN e os núcleos noradrenérgicos do tronco cerebral, especialmente os do LC, parecem exercer seus efeitos coordenando a resposta ao estresse de forma sinérgica.

1.3.1 Esteróides ovarianos e modulação do sistema de estresse

Ao longo do ciclo reprodutivo tem sido observado que as flutuações nos níveis dos esteroides ovarianos são capazes de deflagrar respostas fisiológicas variadas, dependentes de cada período do ciclo estral (FIGUEIREDO, DOLGAS, HERMAN, 2002). De fato, variações nos níveis de estradiol e progesterona, durante o ciclo reprodutivo, estão envolvidas em uma gama de efeitos neuroendócrinos (como comportamento sexual, alimentar, memória, entre outros), assim como na modulação da atividade do eixo HPA e, portanto, na resposta ao estresse (LAFLAMME et al, 1998; OYOLA, HANDA, 2017).

A observação de que há diferentes respostas do eixo HPA entre machos e as fêmeas de roedores, reforçam este contexto. A secreção de corticosterona em fêmeas estressadas é, de fato, maior do que a secreção do mesmo hormônio nos machos e variável ao longo do ciclo reprodutivo (FIGUEIREDO, DOLGAS, HERMAN, 2002).

Estudos tem demonstrado a atuação dos esteroides ovarianos em diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) relacionadas à deflagração da resposta ao estresse, em especial a do eixo HPA. Apesar do PVN ser considerado o principal núcleo de modulação da atividade do eixo HPA, o número de receptores para estradiol (ER) localizados nessa região é variado entre seus fenótipos, podendo ser expressos em neurônios CRH, vasopressinérgicos e ocitocinérgicos ao longo do PVN (LAFLAMME et al, 1998; SHUGHRUE, LANE, MERCHENTHALER, 1997; SUZUKI, HANDA, 2004). Diferente do observado na expressão de ER, a expressão de receptores para progesterona (PR) neste núcleo é significativamente reduzida em diversas espécies (CABA et al, 2003; GOLDSMITH, BOGGAN, THIND, 1997; NUMAN et al, 1999).

Além da modulação direta hipotalâmica, receptores de estradiol (ER) e de progesterona (PR) também são localizados em núcleos noradrenérgicos, em especial no LC (HELENA et al, 2006; SZAWKA et al, 2009). Considerando que estes dois sistemas encontram-se interligados, que a ativação de um pode desencadear a ativação do outro, e que os esteroides ovarianos são capazes de modular estes dois sistemas (direta ou indiretamente), reforça-se a participação destes hormônios na modulação do sistema HPA em resposta ao estresse.

1.4 A Perimenopausa e a percepção de estresse

A transição para a menopausa é caracterizada por alterações hormonais significativas que predisõem as mulheres a desajustes físicos e de humor, quando comparadas as outras fases da vida. Entre os diversos sintomas observados neste período, os transtornos de humor como a depressão, ansiedade e agressividade são, de fato, mais evidentes durante a perimenopausa (CIANO et al, 2017; INAYAT, DANISH, HASSAN, 2017; MATTHEWS, BROMBERGER, 2005; PRIOR, 1998; WOODS, MITCHELL, 2005).

Em humanos, embora diversos grupos de pesquisa tenham se dedicado a avaliar a relação entre a transição para a menopausa e o maior índice de estresse percebido pelas mulheres (considerando a possível desestabilização do eixo HPA nesta fase), os dados presentes na literatura parecem não apresentarem um consenso, sendo ainda pouco esclarecedores.

Enquanto alguns estudos demonstram que a perimenopausa está associada a níveis elevados de estresse e sofrimento emocional, principalmente quando relacionada a outros sintomas físicos, fatores socioeconômicos ou fatores pessoais desestabilizadores

(BROMBERGER et al, 2001), outros estudos demonstram que esse aumento na percepção ao estresse, não está relacionado a mudanças nos níveis de fibrinogênio, um importante marcador fisiológico de estresse (FALCONI, GOLD, JANSSEN, 2016). Ainda, algumas pesquisas mostram que a qualidade de vida e o bem-estar podem ser coadjuvantes na redução da ocorrência de transtornos de humor e de estresse (GUÉRIN et al, 2017). No entanto, os níveis de cortisol durante toda a perimenopausa parece não estar modificado, havendo um discreto aumento somente em algumas mulheres ao final deste período, indicando que este aumento poderia estar relacionado com o envelhecimento e não ao envelhecimento reprodutivo ou à percepção de estresse *per se* (WOODS et al, 2006, 2009).

De maneira semelhante, dados recentes de nosso laboratório desenvolvidos em modelo animal de perimenopausa induzida por VCD, tem demonstrado que os níveis de corticosterona basal destas ratas não diferem do observado em seu grupo controle (REIS et al, 2014; Arikawe et al, Weisheimer et al, dados não publicados), evidenciando uma semelhança ao que é observado em mulheres onde, na perimenopausa, a atividade basal do sistema de estresse parece não estar prejudicada. No entanto, ainda pouco se sabe a respeito da modulação da atividade do sistema de estresse durante este período da vida.

Assim, considerando 1) que os dados obtidos na literatura (em mulheres) apresentam escassas informações sobre a relação entre os aspectos neurobiológicos do sistema de estresse durante a perimenopausa, 2) que assim como em mulheres, os estudos desenvolvidos em modelos animais de perimenopausa evidenciaram não haver diferença na atividade do eixo HPA, por meio da avaliação da secreção basal de corticosterona, 3) que a perimenopausa é caracterizada por alterações hormonais e que os esteroides ovarianos são capazes de modular o sistema de estresse, 4) e que ratas em periostropausa apresentam comportamento do tipo depressivo, ansioso e agressivo, a hipótese do presente trabalho é a de que nas ratas em periostropausa, a atividade do eixo HPA em resposta a um estímulo estressante está alterada.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desta forma, os objetivos gerais deste trabalho foram os de avaliar, em modelo animal de perimenopausa induzida por VCD

- as respostas endócrinas e neuronais em resposta ao estresse e
- a influência da terapia hormonal sobre estas respostas.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram desenvolvidos para avaliar, em ratas em periostropausa, as respostas ao estresse por contenção, bem como a influência da terapia com estradiol, progesterona ou ambos os hormônios

- sobre a atividade da via endócrina (eixo HPA), por meio da avaliação das concentrações plasmática de corticosterona e progesterona e da análise do número de neurônios c-Fos positivos na subdivisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN),
- sobre a atividade do sistema noradrenérgico central de ratas em periostropausa, por meio da análise do número de neurônios c-Fos/TH (Tirosina Hidroxilase) positivos no locus coeruleus (LC).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Fêmeas Wistar com 21 dias de idade (idade de desmame) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, foram alojadas no Biotério I da Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto e mantidas em grupos de quatro animais por caixa plástica (40x32x17,8cm) até o período de experimento, ao redor dos 110 dias de idade (aproximadamente 350g). As ratas foram mantidas em um ambiente de temperatura ($24\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e luz (intensidade de aproximadamente 25lux; 12h claro/12h escuro; luzes acesas às 06:00h) controladas, com água e ração *ad libitum* e com 15 à 25 renovações de ar por hora.

3.2 Delineamento experimental

A partir de 28 dias de idade, os animais receberam diariamente uma injeção subcutânea de Óleo ou VCD (na dose de 160mg/kg) por 15 dias consecutivos. Aos quarenta dias após o início das injeções foi coletado o lavado vaginal diariamente no período da manhã, e o ciclo estral foi analisado. Somente as ratas que apresentaram de dois a três ciclos regulares consecutivos foram submetidas entre o 56º ao 66º dia após o início do tratamento com VCD ou Óleo, à cirurgia de implante de pellet hormonal (de liberação contínua de 20 dias) por via subcutânea, contendo: placebo (PL), 17 β -estradiol (E2), progesterona (P4) ou de pellet contendo uma combinação dos dois hormônios (E2+P4). Os experimentos foram realizados 80 $\pm$ 5 dias após o início das injeções de Óleo ou VCD (Figura 8). Este período foi eleito com base em dados do nosso laboratório que mostram que as concentrações de estradiol estão normais e as de progesterona e hormônio anti-mülleriano AMH baixas (como ocorre na perimenopausa) e as concentrações de FSH ainda estão normais, enquanto que 90 dias após o início do tratamento com VCD estas concentrações já estão altas, denunciando o final da desta fase de transição. Assim, o estudo foi desenvolvido na fase média da periostropausa. Nos animais que receberam pellets de hormônio, o experimento foi realizado 20 dias após a implantação do pellet, independente da fase do ciclo estral. Nos grupos em que foi implantado pellet contendo placebo, ou nos grupos que não receberam nenhum tipo de pellet, o experimento foi realizado na fase do diestro.

O experimento consistiu na exposição dos animais ao estresse de contenção por 30 minutos, entre as 09:00 e 10:00 horas da manhã. Imediatamente após o estresse de contenção (0 min), foi realizada a primeira coleta de amostra sanguínea obtida por pequeno corte na cauda do animal. Uma hora após o término do estresse de contenção, foi obtida a segunda

amostra sanguínea e, imediatamente após esta coleta, as ratas foram anestesiadas e perfundidas para o processamento do tecido cerebral e posterior realização de imunohistoquímica das áreas de interesse.

Figura 8. Desenho experimental. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol + progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h na fase de diestro ou 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. O sangue foi coletado imediatamente (0min) e 60 minutos após o final do estresse, quando as ratas foram anestesiadas e perfundidas.

Os grupos estudados são relacionados na tabela abaixo.

Tabela 1. Grupo1: Ratas tratadas com óleo (15 dias) que receberam 1 pellet de placebo. Grupo2: Ratas tratadas com VCD (15 dias) que receberam 1 pellet de placebo. Grupo3: Ratas tratadas com VCD (15 dias) que receberam 1 pellet de 17β-estradiol. Grupo4: Ratas tratadas com VCD (15 dias) que receberam 1 pellet de progesterona. Grupo5: Ratas tratadas com VCD (15 dias) que receberam um único pellet contendo 17β-estradiol e progesterona. Grupo6: Ratas tratadas com óleo (15 dias). Grupo7: Ratas tratadas com VCD (15 dias). Os animais grupo de 1-5 foram submetidos ao estresse de contenção. Os animais dos Grupos 6 e 7 não foram submetidos ao estresse de contenção.

Grupo	Injeção s.c 28º-43º dia de vida	Implante s.c de Pellet hormonal	Experimento de estresse (30 minutos)
1.	Óleo	Placebo	Sim
2.	VCD	Placebo	Sim
3.	VCD	Estradiol	Sim
4.	VCD	Progesterona	Sim
5.	VCD	Estradiol+Progesterona	Sim
6.	Óleo	-	Não
7.	VCD	-	Não

3.3 Tratamento com VCD

O composto químico VCD - diepóxido de 4-vinilciclohexeno (Sigma) - foi diluído em óleo de milho para 128 g/L e administrado por via subcutânea na dose de 160 mg/Kg, durante 15 dias. No grupo Óleo foi injetado volume equivalente apenas do diluidor puro.

3.4 Tratamento Hormonal

Ao redor do 56º dia após o início do tratamento com VCD as ratas dos grupos experimentais estressados foram anestesiadas, por via intraperitoneal (i.p.), com solução de xilazina (9,3mg/kg) e ketamina (53 mg/Kg) para posterior implante subcutâneo, de: a) um pellet contendo 17 β -estradiol (0,1mg/pellet) ou b) um pellet de progesterona (25mg/pellet) ou c) um pellet de 17 β -estradiol + progesterona (total de 26mg/pellet) ou d) um pellet placebo (25mg/pellet). Os pellets foram adquiridos da empresa “*Innovative Research of America*”. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais recebiam tratamento pós-operatório profilático de antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge; 0,2 mL/rata, i.m.) e anti-inflamatório (Banamine, Schering-Plough; 2,5 mg/Kg, s.c.).

3.5 Lavado vaginal

O ciclo estral foi verificado diariamente por meio de lavado vaginal realizado com o auxílio de uma pipeta contendo solução salina, por volta das 9h da manhã, e analisado a fresco ao microscópio óptico. Este procedimento visa determinar a regularidade do ciclo estral e seleção dos animais que apresentaram de 2 a 3 ciclos estrais consecutivos, para os experimentos.

3.6 Estresse agudo por contenção

O estresse de contenção tem sido classificado como um estresse psicossocial que produz estímulos não-nociceptivos. Em ratos, esse tipo de estresse é um dos mais eficazes em elevar a atividade do eixo HPA (BUECHEL et al., 2014; GLAVIN et al., 1994).

Para o desenvolvimento do seguinte estudo, as ratas foram introduzidas em tubos plásticos cilíndricos de PVC (tubo de aproximadamente 6.5 cm de diâmetro interno e 32 cm de comprimento) compatíveis com o peso e o tamanho dos animais. As extremidades

proximal e distal foram ocluídas com tampas de PVC torneado com orifício central de 3 cm, permitindo apenas a exteriorização do focinho e cauda do animal. Este orifício central permite ao animal respirar, mas o mesmo o impede de se movimentar, tanto para os lados, quanto em linha reta. A partir das 09:00 horas, as ratas submetidas a esse estresse permaneceram dentro do tubo de contenção por 30 minutos e, após o final do período de estresse foram retiradas e recolocadas em sua caixa individual, onde permaneceram até o momento da perfusão (1h e 30min após o início do estresse).

3.7 Coleta de amostras de sangue

A amostra de sangue foi coletada em dois momentos antes da eutanásia dos animais, por meio de um pequeno corte na cauda. A primeira amostra de sangue foi obtida imediatamente após o término do período de estresse por contenção (período denominado 0 minutos) e a segunda amostra coletada após 60 minutos do final do estresse, imediatamente antes do procedimento anestésico para eutanásia (aproximadamente 200 μ L de amostra sanguínea). As amostras foram centrifugadas e o plasma armazenado em freezer -20°C para posterior dosagem hormonal de corticosterona e progesterona, por radioimunoensaio (RIE).

3.8 Anestesia

Para a cirurgia de implante de pellet, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.p.) de solução contendo Ketamina, na dose de 53mg/Kg peso corporal (cloridrato de ketamina Agener, São Paulo) e Xilasina, na dose de 9,3mg/Kg de peso corporal (Coopazine®, Coopers, São Paulo). Para a perfusão, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.p.) de solução contendo Ketamina e Xilasina, nas doses de 106mg/Kg e 18,6mg/Kg de peso corporal, respectivamente.

3.9 Perfusão

As ratas foram perfundidas através da artéria aorta ascendente, com 50 ml de tampão fosfato salina, (PBS 0,01M; pH 7,4) contendo heparina (5 UI/mL) à temperatura ambiente, seguido de 300 mL de paraformaldeído 4 % (PFA; a 4°C, diluídos em tampão fosfato, PB 0,1 M). Após a perfusão, os cérebros foram removidos, pós-fixados em PFA 4 % por 2 horas a 4°C e crioprotetidos em sacarose 30 % diluída em PB 0,1 M. Após a crioproteção, os

cérebros foram congelados em isopentano (Riedel-deHaën, Seelze, Germany), a uma temperatura entre -45 e -50°C, por 1 min. Após o congelamento, o tecido foi armazenado a temperatura de -70 °C. Cortes coronais seriados de 30 µm de toda extensão rostro-caudal do PVN e LC foram obtidos em criostato, a -20°C, e mantidos em solução crioprotetora até o processamento imunohistoquímico para c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e c-fos e TH no locus coeruleus (LC).

3.10 Imunohistoquímica

As imunohistoquímicas apresentadas a seguir foram realizadas pelo método “free-floating”.

- Imunohistoquímica para c-Fos/TH no LC:

Os cortes coronais obtidos da região do LC foram lavados 3 vezes, por 5 minutos, em KPBS 0.01M para remoção da solução crioprotetora. Todos os passos da preparação do tecido foram realizados em temperatura ambiente, com soluções diluídas em KPBS 0,01M pH 7.2, intercalados por 3 lavagens com KPBS por 5 minutos cada. Após a lavagem inicial, os cortes foram incubados em solução contendo Triton X-100 (0,3%) e água oxigenada (H2O2 0,1%) por 30 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram lavados com KPBS até a eliminação da água oxigenada. Para bloquear as ligações inespecíficas, os cortes permaneceram incubados por 60 minutos em solução contendo albumina bovina (BSA 5%) e Triton X-100 (0,15%). Imediatamente após o final da etapa do bloqueio inespecífico, os cortes foram incubados em temperatura ambiente, por 24 horas, com anticorpo policlonal produzido em coelho: anti-c-Fos (1:10000; ab-5, Calbichem, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), em mesma solução bloqueio, agora, acrescida do anticorpo (solução de KPBS+). Para a etapa seguinte, após o período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados e incubados com um anticorpo secundário biotinilado, uma anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000, Vector), diluído 1:200 em solução bloqueio (KPBS+), durante 1 hora. Após as lavagens com KPBS, os cortes foram incubados em complexo Avidina-Biotina (ABC Elite Kit Vectastain), acrescida de Triton X-100 (0,3%) em temperatura ambiente, por 60 minutos. A seguir, foi adicionado o substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) intensificado com sulfato de níquel (0,1mg/mL DAB, Sigma; 10mg/mL NiSO4 1%, Riedel-de haën; e 0,5µL/mL de H2O2 30%) em KPBS; a reação foi interrompida após transferir os cortes para o KPBS. Para a segunda etapa do processamento imunohistoquímico, os cortes foram incubados, por 1 hora, em solução de bloqueio das

ligações inespecíficas, contendo albumina bovina (BSA 5%) e Triton X-100 (0,15%). Imediatamente após este bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo anti-TH (tirosina-hidroxilase), produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma), diluído 1:500000 em KPBS+, por 48 horas à 4°C. Depois de lavados, os cortes foram incubados com um segundo anticorpo biotinilado; uma anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (BA-2001, Vector), diluído 1:200 em KPBS+ por 90 minutos. Após as lavagens em KPBS, os cortes permaneceram incubados em complexo Avidina-Biotina 1:500 (ABC Elite Kit, Vectastain), por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado o DAB (0,25mg/mL DAB e 0,5µL/mL de uma solução de H₂O₂ 30%) em KPBS. A interrupção da reação ocorreu após a transferência dos cortes para o KPBS.

- **Imunohistoquímica para c-Fos no PVN:**

O processamento imunohistoquímico desta área foi realizado nas mesmas condições que o protocolo de incubação em c-Fos, utilizado na primeira etapa do processamento dos cortes do LC, como apresentado anteriormente.

Após a reação de revelação, os cortes imersos em KPBS foram montados em lâminas e, após a completa secagem do tecido na lâmina, estas foram cobertas com lamínulas utilizando-se Entelan (Merck); após secarem por algumas horas, foram guardadas para posterior análise.

3.11 Análise Quantitativa

As secções contendo o LC e o PVN, foram examinadas em um microscópio óptico (Axioskop 2 plus, Zeiss, Germany) associado a um sistema para análise de imagens (Axiovision 3.1, Zeiss, Germany). As imagens foram analisadas por meio do software de análise *ImageJ*. Para a quantificação de neurônios duplamente imunorreativos a TH que expressava c-Fos no LC, foi realizada a análise bilateral por toda a extensão rostro-caudal deste núcleo, sendo a contagem realizada de -9.48mm a -10.20mm do Bregma. Já para a quantificação do número de neurônios imunorreativos a c-Fos nas subdivisões parvocelulares medial e posterior do PVN, foi quantificada toda a extensão de -1.80 mm e -2.16 mm (Bregma), respectivamente. O atlas de Paxinos e Watson (2007) foi utilizado como referência para a identificação das áreas analisadas.

3.12 Dosagens Hormonais

A concentração plasmática de progesterona foi medida pelo método de radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo utilizando kits específicos fornecidos pela MP Biomedicals (Ohio, EUA). O coeficiente de variação intraensaio e o menor limite de detecção foram respectivamente de 5,9% e 0,02 ng/mL para progesterona. Para dosagem de corticosterona, o anticorpo primário foi obtido do Sigma Inc. (EUA) e o hormônio triciado da Perkin Elmer (EUA). Para este hormônio, o coeficiente de variação foi de 7,2% e o menor limite de detecção de 3,38 ng/mL. Todas as amostras foram medidas em duplicatas e, quando necessário, em diferentes diluições. Para evitar a variação interensaio, todas as amostras de um mesmo experimento foram processadas no mesmo ensaio. Para maiores detalhes dos procedimentos, ver Kalil et al, 2013.

3.13 Análise Estatística

A análise das diferenças estatísticas foi determinada usando o software do Prism-Graph 6.0 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

A diferença entre a secreção basal de corticosterona e progesterona plasmática em animais em periestrovia e seus controles (Óleo), foram determinadas por Teste-*T* seguido de correção de Welch. Para a avaliação do efeito do estresse sobre o número de neurônios imunorreativos ao c-Fos e TH no LC e ao c-Fos no PVN, bem como na concentração plasmática de corticosterona e progesterona, foi realizada análise de variância *Two-way* ANOVA. O efeito da terapia hormonal nas respostas ao estresse foi analisado por *One-way* ANOVA. Em ambas as análises, foram aplicadas o pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. A diferença entre as concentrações hormonais aos 0 minutos e 60 minutos após o estresse foi determinada por *One-way* ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett. O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da depleção folicular na secreção basal de corticosterona e progesterona plasmática

A secreção basal de corticosterona (Figura 9A) não foi diferente entre as ratas controle (Óleo) e na periestrospausa (VCD). Como esperado, a secreção basal de progesterona de ratas na periestrospausa induzida por VCD foi menor ($p=0,02$) do que a de seu grupo controle (Figura 9B).

Figura 9. Efeito da depleção folicular ovariana na secreção basal de corticosterona e de progesterona plasmática. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. O sangue foi coletado entre 09:00h e 10:00h na fase de diestro, de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por Teste-*t* com correção de Welch. Resultados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*). $n=8$ a 10.

Efeito da depleção folicular na resposta ao estresse

4.2 Secreção de corticosterona e de progesterona induzida pelo estresse.

O estresse agudo de contenção por 30 minutos aumentou em mais de 9 vezes a secreção de corticosterona das ratas controles (Óleo) tratadas com placebo, quando comparadas ao grupo Óleo não estressado. As ratas em periestrospausa tratadas com placebo (VCD+PL) também responderam ao estresse com aumento significativo de corticosterona plasmática, quando comparadas com seu grupo controle (VCD não estressado). No entanto, esta resposta foi atenuada em aproximadamente 72% quando comparada àquela do grupo controle estressado (Óleo+PL, Figura 10A).

O estresse agudo por contenção aumentou significativamente as concentrações de progesterona tanto nas ratas em periestrofapausa, quanto nas ratas controle (óleo), não havendo diferença estatística entre os grupos (Figura 10B).

Figura 10: Efeito da depleção folicular na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo placebo (PL). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h na fase de diestro, de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. O sangue foi coletado imediatamente (0min) após o final do estresse. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados com ANOVA Two-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. *: $p < 0,05$ em relação ao basal (barras brancas). #: $p < 0,05$ em relação ao grupo Óleo. $n = 10$ a 15.

4.3 Atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.

A figura 11A apresenta fotomicrografia representativa da PaMP do PVN. Os núcleos pretos (setas) representam neurônios ativados (c-Fos+). Na periestrofapausa, o número de neurônios c-Fos positivos expressos nessa subdivisão não diferiu do número do grupo controle (Figura 11B), e o estresse aumentou o número de neurônios ativados em ambos os grupos, embora esta resposta tenha sido levemente atenuada na periestrofapausa ($p < 0,08$).

A figura 11C apresenta fotomicrografia representativa da PaPo do PVN. Os núcleos pretos (setas) representam neurônios ativados (c-Fos+). Nessa subdivisão, embora o estresse também tenha provocado aumento de atividade neuronal em ambos os grupos, esta resposta

foi menos expressiva do que a observada na PaMP e, nas ratas em periestro-pausa, não houve atenuação da resposta (Figura 11D).

Figura 11. Efeito da depleção folicular na atividade dos neurônios (c-Fos) das subdivisões parvocelular medial (Fig. A, PaMP) e parvocelular posterior (Fig. C, PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo placebo (PL). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h na fase de diestro, de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. As ratas foram perfundidas 60 minutos após o final do estresse. Fotomicrografias representativas do PVN da subdivisão PaMP (A) e da PaPo (C) submetido à imunohistoquímica para c-Fos. As setas indicam neurônios imunorreativos para c-Fos. O número de neurônios c-Fos+ foram quantificados nas áreas delimitadas. 3V=3º ventrículo. Aumento de 10x. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados com ANOVA Two-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. *: $p < 0,05$ em relação ao basal (barras brancas). $n=6$.

4.4 Atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.

A figura 12A apresenta fotomicrografia representativa do LC com neurônios duplamente marcados para c-Fos e TH. Neurônios noradrenérgicos (TH+) apresentam citoplasma marrom claro. Os núcleos pretos (setas) representam neurônios ativados (c-Fos+).

Na periestro pausa, o número de neurônios noradrenérgicos ativos (c-Fos+) no LC não diferiu daquele do grupo controle (Figura 12B), e o estresse aumentou de forma semelhante o número de neurônios ativados em ambos os grupos.

Figura 12: Efeito da depleção folicular na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo placebo (PL). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h na fase de diestro, de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. As ratas foram perfundidas 60 minutos após o final do estresse. Fotomicrografia representativa do LC (A) submetido à imunohistoquímica para c-Fos e TH (Tirosina Hidroxilase). As setas indicam neurônios duplamente marcados para c-Fos e TH. 4V=4º ventrículo. Aumento de 10x. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados com ANOVA Two-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. . *: $p < 0,05$ em relação ao basal (barras brancas). n=9.

Efeito da terapia hormonal na resposta ao estresse

4.5 Efeito da terapia hormonal na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse.

A resposta da corticosterona ao estresse, já diminuída pela depleção folicular (ver Figura 10A ou a linha tracejada superior na figura 13A), foi ainda mais atenuada pelo tratamento com estradiol, associado ou não à progesterona, uma vez que não houve diferença estatística entre estes dois grupos em relação ao seu controle estressado (linha tracejada superior) e não estressado (linha tracejada inferior, figura 13A). Por outro lado, nas ratas tratadas com progesterona, as concentrações de corticosterona após o estresse mostraram-se mais elevadas que as do grupo VCD estressado (linha tracejada superior, $p<0,05$).

Todos os grupos que receberam algum tipo de terapia hormonal responderam ao estresse com aumento significativo de progesterona, quando comparados ao grupo VCD não estressado (linha tracejada inferior, $p<0,05$; Figura 13B). As ratas em periestrofa tratadas com estradiol apresentaram um aumento significativo na secreção de progesterona plasmática quando comparada às ratas estressadas tratadas com placebo (linha tracejada superior, $p<0,05$, Figura 13B). O tratamento com progesterona não alterou as concentrações pós-estresse de progesterona em relação ao seu grupo controle estressado (VCD+PL; linha tracejada superior, Figura 13B), mas atenuou o aumento induzido pelo estradiol.

Figura 13. Efeito da terapia hormonal na secreção de corticosterona e de progesterona induzida por estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol + progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h, 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. O sangue foi coletado imediatamente (0min) e 60 minutos após o final do estresse. As linhas tracejadas referem-se às médias das concentrações de corticosterona (A) e de progesterona (B) nos grupos indicados (dados da figura 10). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados com ANOVA One-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $p<0,05$. $n=9$ a 12 .

4.6 Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse.

Na PaMP, nenhum dos tratamentos hormonais modificou a atividade neuronal após o estresse (Figura 14A). Já na PaPo (Figura 14B), apesar de não ter sido observada diferença entre os efeitos dos três tipos de terapia hormonal nessa área, todos os tratamentos provocaram atenuação da resposta ao estresse, uma vez que o número de neurônios ativados nas ratas tratadas não diferiu daqueles das ratas VCD não estressadas (linha tracejada inferior), nem das estressadas (linha tracejada superior).

Figura 14. Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol + progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h, 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. As ratas foram perfundidas 60 minutos após o final do estresse. As linhas tracejadas referem-se às médias do número de neurônios ativados nos grupos indicados (dados da figura 11). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados com ANOVA One-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. $n=6$.

4.7 Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse.

Não houve diferença entre os efeitos dos três tipos de terapia hormonal na expressão basal de c-Fos/TH no LC (Figura 15). Por outro lado, todos os tratamentos bloquearam o aumento de atividade neuronal induzida pelo estresse neste núcleo, uma vez que o número de

neurônios ativados em ratas que receberam terapia hormonal, não diferiu daquele das ratas VCD não estressadas (linha tracejada inferior).

Figura 15. Efeito da terapia hormonal na atividade (c-Fos) dos neurônios noradrenérgicos (TH+) do locus coeruleus (LC) em resposta ao estresse. Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo placebo (PL), estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol + progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00h e 10:00h, 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. A perfusão foi realizada 60 minutos após o fim do estresse. As linhas tracejadas referem-se às médias do número de neurônios ativados nos grupos indicados (dados da figura 12). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados com ANOVA One-Way, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. $n = 7-9$.

4.5 Efeito do estresse, da depleção folicular e da terapia hormonal no período de recuperação pós-estresse

Uma hora após o final do estresse, as concentrações de corticosterona das ratas controles estressadas (Óleo+PL) ou não (Óleo), retornaram aos níveis basais (0 min) observados nas ratas não estressadas (Figura 16A). As ratas em periostropausa, estressadas (VCD+PL) ou não (VCD) apresentaram, 60 minutos após o final do período de estresse, concentrações de corticosterona menores quando comparadas às concentrações basais do grupo não estressado (0min), o que não foi alterado pelo tratamento hormonal com estradiol, progesterona ou ambos (Figura 16B).

As concentrações de progesterona das ratas controles estressadas (Óleo+PL) ou não (Óleo), foram iguais aos níveis basais pré-estresse (0 min; Figura 16C). As ratas em periostropausa estressadas (VCD+PL) e não estressadas (VCD) apresentaram, sessenta minutos após o final do estresse, concentrações de progesterona iguais aos níveis basais pré-estresse (Figura 16D). Nas ratas em periostropausa tratadas com estradiol, associado ou não à progesterona, os níveis de progesterona não retornaram aos basais, sendo estes níveis

significativamente maiores 1 hora após o fim do estímulo estressante. Por outro lado, nas ratas tratadas com progesterona as concentrações de progesterona retornaram aos níveis basais (Figura 16D).

Figura 16. Concentrações plasmáticas de corticosterona e de progesterona no período de recuperação (60 minutos após o estresse). Ratas receberam injeções s.c de Óleo ou VCD por 15 dias consecutivos, a partir do 28º dia de vida. Ao redor do 56º ao 66º dia do início da administração de Óleo ou VCD, as ratas dos grupos a serem estressados receberam implantes s.c. de um pellet contendo placebo (PL), estradiol (E2), progesterona (P4) ou estradiol + progesterona (E2P4). O estresse de contenção foi aplicado por 30 minutos entre 09:00 h e 10:00 h na fase de diestro (grupos Óleo, Óleo+PL, VCD e VCD + PL) ou 20 dias após o início da terapia hormonal (grupos VCD+E2, VCD+P4 e VCD+E2P4), de 75 a 85 dias após o início da administração de VCD / Óleo. O sangue foi coletado 60 minutos após o final do estresse. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados com ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Dunnett, sendo que todos os dados de 60 minutos após o estresse foram comparados com o seu respectivo basal (médias representadas pela linha tracejada). Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. $n = 9$ a 15 .

Analisados todos os dados em conjunto (Tabela 2), verifica-se que, quando se analisa o efeito do estresse e da terapia hormonal (comparações 3 a 5) com o efeito apenas do estresse (comparação 2), observa-se que as variações nas concentrações de progesterona e corticosterona são inversas. Da mesma forma, quando se analisa o efeito dos hormônios *per se* em animais estressados (comparações de 6 a 8), notamos também respostas inversas da terapia hormonal na secreção destes dois hormônios.

As alterações nas concentrações de corticosterona acompanharam aquelas observadas no número de neurônios ativados na subdivisão PaMP do PVN (comparações de 1-8), embora, em termos percentuais, as variações desta área tenham sido menores do que as concentrações de corticosterona.

Quando comparados os grupos estressados (em **negrito**) contra os grupos não estressados (comparações de 1 a 5), todos os parâmetros avaliados apresentam variações no mesmo sentido, ou seja, o estresse provocou aumento da secreção de corticosterona e de progesterona tanto nos animais controles (Óleo), como nos animais em periostropausa e este aumento na secreção hormonal foi acompanhado, guardadas as devidas proporções, pelo aumento da atividade de todos os grupos neuronais avaliados. No entanto, analisado o efeito dos hormônios *per se*, em animais estressados (comparações 6 a 8), a atividade da subdivisão PaPo do PVN e do LC parecem não guardar relação com a secreção de ambos os hormônios.

Tabela 2: Efeito do estresse, em percentuais de aumento (↑) ou queda (↓), na secreção de progesterona e corticosterona e na atividade neuronal das subdivisões parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do PVN, e do locus coeruleus (LC). Em **negrito**, grupos estressados.

Comparação entre grupos	Efeito do estresse (em %)				
	Progesterona	Corticosterona	PaMP	PaPo	LC
1. O X O+PL	↑ 165	↑ 846	↑ 185	↑ 54	↑190
2. VCD X VCD+PL	↑ 426	↑ 230	↑ 116	↑ 38	↑176
3. VCD X VCD+E2	↑ 1299	↑ 77	↑ 107	↑ 23	↑67
4. VCD X VCD+P4	↑ 286	↑ 474	↑ 147	↑ 26	↑24
5. VCD X VCD+E2P4	↑ 792	↑ 155	↑ 111	↑ 14	↑56
6. VCD +PL X VCD+E2	↑ 166	↓ 46	↓ 4	↓ 10	↓39
7. VCD +PL X VCD+P4	↓ 26	↑ 74	↑ 14	↓ 8	↓55
8. VCD +PL X VCD+E2P4	↑ 69	↓ 22	↓ 2	↓ 17	↓43

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A perimenopausa é caracterizada como o período de transição da vida reprodutiva para a não reprodutiva, que antecede a menopausa. É nesta fase que ocorre a maioria dos sintomas clínicos, como alterações neuroendócrinas e metabólicas, desencadeados pelo envelhecimento reprodutivo. Estas mudanças também são capazes de produzir alterações comportamentais e de humor, como sintomas de ansiedade, depressão e agressividade na maioria das mulheres. Apesar dos diversos estudos desenvolvidos acerca das manifestações destes sintomas durante a perimenopausa, ainda não há um consenso definido sobre as modificações na atividade do eixo HPA e da resposta ao estresse, durante este período (CIANO et al., 2017; INAYAT, DANISH, HASSAN, 2017; MATTHEWS, BROMBERGER, 2005; PRIOR, 1998; WOODS, MITCHELL, 2005).

A perimenopausa tem sido associada com o aumento nos níveis de estresse percebido. No entanto, os fatores socioeconômicos (como dificuldade financeira ou desemprego), relações pessoais e a percepção quanto à qualidade de vida parecem influenciar de forma significativa a identificação do estresse nesta fase, de modo que estas influências podem ser maiores do que a transição para a menopausa *per se* (BROMBERGER et al., 2001; WOODS, MITCHELL, 2011). De fato, embora o estudo desenvolvido por Falconi, Gold e Janssen (2016) tenha relatado haver um aumento na percepção ao estresse em mulheres durante a perimenopausa, o mesmo aumento não foi observado na análise dos níveis de marcadores endógenos produzidos durante a resposta ao estresse, ou seja, não foi encontrada nessas mulheres uma relação entre a resposta ao estresse produzida e a percebida. Assim, estes e outros estudos ainda não conseguiram afirmar se durante a perimenopausa há ou não de fato uma desestabilização da atividade do sistema de estresse, e o quanto este seria influenciado pelas alterações neurobiológicas características deste período.

No modelo animal de perimenopausa utilizado neste estudo, nós observamos que há um déficit na resposta da corticosterona (mas não de progesterona) ao estresse, o que foi parcialmente corrigido pela progesterona exógena (mas não pelo estradiol). Os dados também sugerem que a deficiência na resposta ao estresse tem origem na glândula adrenal, e não em outros níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário.

Secreção de corticosterona basal e induzida pelo estresse

5.1 Secreção basal de corticosterona

Já é bastante conhecido o fato de que com o envelhecimento, há um aumento da função basal do eixo HPA e, portanto, das concentrações de cortisol, e que este aumento independe do sexo (SAPOLSKY, 1991; PURNELL et al, 2004; SEEMAN et al, 2001; MURAKAMI et al, 1999; BELANGER et al, 1994), apesar de ser mais robusto em fêmeas (SEEMAN et al, 2001; WILKINSON, PESKIND, RASKIND, 1997). Em humanos, os níveis de cortisol, bem como a variabilidade no padrão circadiano de secreção deste hormônio, aumentam gradualmente na terceira década de vida (YEN, LAUGHLIN, 1998; LAUGHLIN, BARRETT-CONNOR, 2000). O aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol relacionado com a idade ocorre porque a diminuição de sua secreção, por *feedback* negativo, está diminuída em idosos (WILKINSON, PESKIND, RASKIND, 1997; BOSCARO et al, 1998; WILKINSON et al, 2001) em decorrência, em especial, da perda de seus receptores (GR) nos circuitos do hipocampo (SAPOLSKY, KREY, MCEWEN, 1986), que é a principal região de controle negativo da atividade do eixo HPA.

No que tange ao envelhecimento reprodutivo, alguns estudos desenvolvidos em mulheres têm demonstrado que a secreção basal de cortisol permanece semelhante desde o início da perimenopausa até o início da menopausa, havendo um pequeno aumento somente ao final da perimenopausa (WOODS et al, 2006, 2009). Estes dados sugerem que a idade biológica, e não o envelhecimento ovariano *per se*, parece ser o responsável pelo aumento na secreção de cortisol em mulheres.

Nossos dados demonstraram que, assim como relatado em mulheres, as concentrações basais de corticosterona não estão alteradas nesta fase de transição da vida reprodutiva, o que já havia sido observado em outros trabalhos do nosso laboratório (REIS et al, 2014; Arikawe et al, Weisheimer et al, dados não publicados). Há que se considerar que após 80 dias do início do tratamento com VCD, as ratas estão em fase anterior à perimenopausa tardia (Barros et al, dados não publicados do nosso laboratório), o que pode justificar não ter sido observado um aumento, por menor que fosse, nas concentrações de corticosterona. Ainda, uma vez que ambos os grupos são jovens, com a mesma idade (aproximadamente 110 dias de vida), a semelhança na concentração basal deste hormônio nos permite considerar que a falência ovariana gradual, induzida por VCD, parece não ser determinante para um desajuste no controle do eixo HPA neste período, reforçando a hipótese de que as alterações na secreção de cortisol parecem guardar uma estreita relação com o envelhecimento somático, mas não com

o reprodutivo.

5.2 Secreção de corticosterona induzida pelo estresse

A ativação do eixo HPA representa a resposta hormonal primária ao estresse, a qual resulta na secreção de glicocorticóides pela córtex adrenal. Esta ativação é comandada por sinais neurais que induzem a secreção de CRH do PVN que, por sua vez, induz a secreção de ACTH pelos corticotrofos da adenohipófise (HERMAN et al, 2016; MUNCK, GUYRE, HOLBROOK, 1984; VAHL et al, 2005; CHROUSUS, GOLD, 1992). O cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, secretados pela córtex adrenal em resposta ao ACTH, são hormônios amplamente conhecidos como os principais marcadores de estresse, uma vez que as concentrações plasmáticas destes glicocorticóides aumentam minutos após o início do estímulo. O estresse por contenção utilizado neste estudo, é um método amplamente utilizado em roedores, por ser capaz de produzir um pico de ACTH de 15-20 minutos e de corticosterona de 30 a 60 minutos após o início do estresse, terminando este último dentro de 2-3 horas após o início do estímulo (CHOI et al, 2007; VAHL et al, 2005; SOLOMON et al, 2015).

Não há consenso em relação à capacidade de responder ao estresse na senescência. Seeman et al, (2001) mostraram que o envelhecimento está associado não somente ao aumento dos níveis basais de cortisol mas também com um aumento das respostas do cortisol ao desafio cognitivo. Por outro lado, outros estudos concluíram que a capacidade de responder ao estresse não muda com a idade (SAPOLSKY, KREY, MCEWEN, 1984; HESS, RIEGLE, 1970). Ainda, alguns autores consideram que a capacidade de responder ao estresse parece estar diminuída na senescência (SELYE, TUCHWEBER, 1976). Esta ideia é reforçada quando são avaliados diferentes sistemas fisiológicos no idoso, nos quais se observa um funcionamento normal em condições basais, enquanto não respondem adequadamente frente a um desafio. Por exemplo, a temperatura corporal basal em humanos é semelhante entre jovens e idosos, mas quando são expostos a desafios, como frio ou calor, a capacidade de regulação da temperatura está prejudicada nos idosos (SHOCK, 1977).

Em mulheres, a relação entre a perimenopausa e as respostas ao estresse ainda não está bem estabelecida. Apesar de alguns estudos terem demonstrado que este período é classificado como estressante para uma população de mulheres, nenhum estudo conseguiu estabelecer relação entre o nível de estresse percebido e as respostas endócrinas características de estresse. Por exemplo, a severidade de alguns grupos de sintomas comuns durante a

perimenopausa, como as ondas de calor, não foram relacionados às alterações na secreção de cortisol neste período (WOODS et al, 2014). De maneira semelhante, o aumento da percepção ao estresse não foi correlacionado à secreção fisiológica de fibrinogênio, um importante marcador de estresse (FALCONI, GOLD, JANSSEN, 2016).

No presente estudo, embora as concentrações basais não tenham diferido entre ratas controles e na periostropausa, o aumento da secreção de corticosterona em resposta ao estresse observado nas ratas em periostropausa foi muito menor (230%) do que aquele observado no grupo controle (Óleo) estressado (846%). Essa variação na proporção da secreção de corticosterona plasmática entre os dois grupos submetidos ao estresse de contenção, nos sugere que a resposta do eixo HPA a um desafio estressante esteja diminuída durante a periostropausa.

Um fator importante a ser considerado é o de que as ratas utilizadas neste estudo são jovens, e a única variável inserida no grupo foi a depleção dos folículos ovarianos, de forma que o fator idade não pode ser considerado para justificar a diferença de resposta.

Outro fator importante é que as ratas utilizadas neste estudo não sofreram nenhum tipo de estresse até o momento do experimento, que não somente o transporte dos animais do biotério até a sala do experimento. Por outro lado, estudos do nosso laboratório com ratas em periostropausa submetidas a vários tipos de estresses prévios (cirúrgico e de isolamento social) e durante o experimento (contenção e coleta seriada de amostras de sangue), demonstraram que esses animais responderam ao estresse por contenção com aumento na secreção de corticosterona similar ao observado nas ratas controles, o que difere do observado neste estudo onde utilizamos ratas sem estresses prévios. Estes dados sugerem que as respostas ao estresse durante este período de transição podem ser afetadas pelas condições de vida da mulher, no que se refere aos estresses por elas experimentados no dia a dia.

Ainda, considerando que a progesterona é precursora da corticosterona, uma hipótese a ser considerada é a de que as menores concentrações de progesterona, exibida pelas ratas em periostropausa possam ser responsáveis pela menor síntese e secreção de corticosterona em resposta ao estresse agudo.

Secreção de progesterona basal e induzida pelo estresse

5.3 Secreção basal de Progesterona

Uma das principais alterações endócrinas observadas na mulher durante a perimenopausa é a queda contínua das concentrações de progesterona, que parece estar

associada à depleção progressiva dos folículos primordiais e primários e a diminuição da reserva folicular ovariana (PRIOR, 2011; SANTORO et al, 1996). Estudos utilizando nosso modelo de perimenopausa induzida por VCD também constataram um perfil semelhante ao observado nas mulheres: concentrações plasmáticas de progesterona menores em animais na periostropausa induzida pelo VCD, quando comparados ao grupo controle (PESTANA-OLIVEIRA et al, 2018; REIS et al, 2014). Os dados deste estudo corroboram aqueles acima citados uma vez que também foi observado menor concentração de progesterona nas ratas em periostropausa.

5.4 Secreção de progesterona induzida pelo estresse

Além dos glicocorticóides, a progesterona tem se mostrado um excelente marcador de estresse. Assim como a corticosterona, sua secreção aumenta prontamente frente a uma variedade de estresses (NEQUIN, ALVAREZ, CAMPBELL, 1975; WELSH, JONHSON, 1981; FENSKE, 1986; ANDERSEN et al, 2004; TRASLAVIÑA, FRANCI, 2011; KALIL et al, 2013). A progesterona secretada em resposta ao estresse é de origem adrenal, e segue o padrão da secreção dos glicocorticóides (KALIL et al, 2013; HERRERA et al, 2016). O neurometabólito ativo da progesterona, a allopregnanolona, tem sido considerado como regulador central das respostas ao estresse por meio da modulação de receptores GABA-A e consequente inibição da liberação de CRH do PVN e de NA do LC (ASTON-JONES et al., 1991; PURDY et al., 1991; FRYE, 2007).

A secreção de progesterona induzida pelo estresse também é observada em homens e mulheres (CHILDS et al, 2010; HERRERA et al, 2016). No entanto, não há na literatura estudos sobre esta resposta durante a perimenopausa.

Em nosso estudo, a magnitude do aumento de progesterona em resposta ao estresse foi de 426%, enquanto que em ratas controle (Óleo) foi de 165%; no entanto, os níveis máximos de progesterona após o estresse foram semelhantes nos dois grupos. Esta diferença no percentual de aumento se deve ao fato das ratas em periostropausa partirem de um nível basal ligeiramente mais baixo do que o observado nas ratas controles, e por terem atingido, no pico do estresse níveis ligeiramente mais altos. Esta resposta difere, portanto, da secreção de corticosterona em resposta ao estresse, que foi bem menor nas ratas em periostropausa.

Em relação à hipótese da baixa resposta da corticosterona na periostropausa estar relacionada com as menores concentrações da sua precursora, a progesterona, poderíamos questionar porque a secreção de corticosterona não aumentou adequadamente em resposta ao

estresse uma vez que o estresse aumentou em muito a secreção de progesterona. Neste contexto, é necessário ser considerado que o aumento de progesterona em resposta ao estresse ocorre ao mesmo tempo que o aumento da corticosterona, o que não permitiria a utilização deste precursor na síntese rápida para secreção imediata de corticosterona.

Uma vez que tanto a secreção de progesterona, como a de corticosterona em resposta ao estresse é induzida pelo ACTH, estes dados sugerem que, possivelmente, níveis do eixo HPA acima da adrenal (hipófise ou hipotálamo), a sensibilidade periférica ao ACTH, assim como a esteroidogênese na zona reticulada da adrenal estejam funcionando adequadamente neste modelo animal. Desta forma, a deficiência observada nos animais em periestro-pausa, em secretar níveis adequados de corticosterona em resposta ao estresse, não poderia ser justificada por hipofunção do eixo HPA. Assim, a avaliação da atividade dos componentes centrais que modulam o funcionamento do eixo HPA, pode esclarecer esta hipótese, e será discutida a seguir.

Atividade dos componentes centrais do sistema de estresse

5.5 Atividade basal e induzida por estresse dos neurônios parvocelulares do PVN

Neste estudo analisamos a atividade de duas subdivisões parvocelulares do PVN: a subdivisão parvocelular medial (PaMP) e a parvocelular posterior (PaPo).

Neurônios localizados na PaMP se projetam principalmente para a eminência mediana, estando envolvidos no controle hipotalâmico, e em menor grau para o tronco cerebral e medula espinhal. Por outro lado, a maioria das projeções que partem da PaPo são direcionadas ao tronco cerebral e medula espinhal, e em menor grau para a eminência mediana (SAWCHENKO, SWANSON, 1982a).

Além disso, tanto a PaMP como a PaPo são compostas por neurônios responsáveis pela modulação do sistema de estresse, em especial os neurônios CRH. Apesar de não termos identificado o fenótipo deste tipo de neurônio, sabe-se que nestas subdivisões do PVN existe um grande número de corpos celulares de neurônios CRH (BENEDETTI et al, 2008). Assim, a avaliação da expressão da proteína c-Fos nestas subdivisões do PVN pode refletir possíveis alterações na atividade dos neurônios CRH localizados nesta área, uma vez que esta proteína é uma importante marcadora da atividade neuronal e transcricional de circuitos responsivos a estímulos externos, como o estresse (KOVÁCS, 1998).

Neste estudo, a atividade basal nas duas subdivisões do PVN foi semelhante entre as ratas controles e em periestro-pausa, assim como o observado na secreção basal de

corticosterona e progesterona, o que sugere não haver comprometimento da atividade deste componente central do eixo HPA, durante a periestrofpausa.

Por outro lado, o estresse foi capaz de aumentar a expressão de c-Fos em ambas as subdivisões do PVN, tanto em ratas controles quanto na periestrofpausa. É interessante notar que houve uma tendência à média do número de neurônios ativados na PaMP ser menor nas ratas em periestrofpausa (161,66), quando comparado às ratas controles (204,66). Da mesma forma, quando analisada a magnitude de resposta destes neurônios ao estresse, observa-se que o aumento da atividade da PaMP nas ratas em periestrofpausa foi de 116% contra 185% observado nas ratas controles. Esta diferença de resposta da PaMP ao estresse entre os grupos acompanha aquelas observadas na resposta da corticosterona em resposta ao estresse. No entanto é importante lembrar que estas variações de atividade na PaMP não foram estatisticamente significantes.

Assim, considerando que a atividade da PaMP, assim como a secreção de progesterona em resposta ao estresse está normal na periestrofpausa, consideramos mais provável a hipótese de que a atividade do eixo HPA não esteja comprometida na periestrofpausa, e que a ineficiência da síntese e secreção de corticosterona em resposta ao estresse, poderia indicar alguma alteração de função na própria adrenal.

Há no entanto que se considerar que os neurônios neurosecretórios de PVN podem não representar o único regulador da ativação do eixo HPA. Por exemplo, grandes lesões do PVN não bloqueiam completamente a liberação de ACTH em resposta ao estresse (MAKARA et al, 1981). Além disso, camundongos *knockout* para o CRH respondem, ainda que fracamente, ao estresse (JACOBSON et al, 2000). Ainda, outros moduladores centrais podem regular a atividade do eixo HPA, como por exemplo a vasopressina, que tem se mostrado um importante hormônio liberador de ACTH (FAMILARI et al, 1989).

Por fim, é igualmente importante considerar que as concentrações plasmáticas de glicocorticóides não necessariamente refletem a resposta do eixo HPA ao estresse. Por exemplo, em homens, o estresse cirúrgico pode resultar em uma secreção aumentada de cortisol a longo prazo mesmo na ausência de um aumento correspondente na secreção de ACTH (GIBBISON et al, 2015). De maneira semelhante, uma atividade normal do eixo hipotálamo/hipófise, com níveis normais de ACTH pode ainda resultar em menor secreção de glicocorticóides, se houver uma menor sensibilidade adrenal ao ACTH mascarando, portanto, o grau de ativação do eixo em resposta ao estresse (FIGUEIREDO et al, 2007).

Esta dissociação entre a secreção de ACTH e a liberação de glicocorticóides já foi descrita em várias espécies (BORNSTEIN et al, 2008). Em roedores, há evidências de que o

sistema simpático pode potencializar a liberação de corticosterona induzida pelo ACTH, o que é mediado pelos nervos esplâncnicos. Esta modulação simpática da eficácia do ACTH é evidente durante a fase ativa do ciclo circadiano e após a exposição ao estresse agudo (JASPER, ENGELAND, 1997; ULRICH-LAI, ENGELAND, 2002). Uma vez que o LC é um importante núcleo central que regula a atividade do sistema simpático periférico, ele será discutido a seguir.

5.6 Atividade basal e induzida por estresse dos neurônios noradrenérgicos do LC

Além do PVN/CRH, outro importante componente central do sistema de estresse é o sistema noradrenérgico do LC. Assim como o eixo HPA, este sistema é ativado prontamente em resposta a diferentes tipos de estresses (MORILAK et al, 2005; PACÁK; PALKOVITS, 2001). Quando estimulado, o LC libera noradrenalina de uma forma difusa em todo o cérebro resultando no aumento da atenção, vigilância e da ansiedade. Os sistemas LC/NA e PVN/CRH compõem uma alça de *feedback* reverberante de forma que a ativação de um dos sistemas resulta na ativação do outro, ou seja, CRH ativa os neurônios do LC assim como a NA do LC ativa os neurônios CRH do PVN (MORILAK et al, 2005; PACÁK, PALKOVITS, 2001 ITOI et al, 1994; VALENTINO, FOOTE, ASTON-JONES, 1983 CHROUSOS GP, GOLD PW, 1992). De fato, lesões do LC diminuem o pico de ACTH e de corticosterona em resposta ao estresse agudo (ZIEGLER, CASS, HERMAM, 1999). Assim, o PVN e os núcleos noradrenérgicos do tronco cerebral, especialmente os do LC, parecem exercer seus efeitos coordenando a resposta ao estresse de forma sinérgica.

Além da modulação central do eixo HPA, o LC pode também modular a atividade da cortex adrenal. A ativação do LC em resposta ao estresse leva à ativação da via descendente medular, que por sua vez ativa as vias simpáticas periféricas por meio dos nervos esplâncnicos. Vários estudos demonstram que o nervo esplâncnico regula a sensibilidade da córtex adrenal ao ACTH. De fato, a secção deste nervo diminui a resposta adrenal ao ACTH (EDWARDS, JONES, BLOOM, 1986; EDWARDS, JONES, 1987a) enquanto sua estimulação aumenta esta resposta (EDWARDS, JONES, 1987b; ENGELAND, GANN, 1989). Por outro lado, experimentos *in vitro* de perfusão da adrenal e manutenção do nervo esplâncnico evidenciaram que a estimulação deste nervo provocou a liberação de adrenalina, noradrenalina, cortisol e aldosterona; de maneira semelhante, a perfusão da adrenal com adrenalina ou noradrenalina aumentou a secreção de cortisol e aldosterona (BORNSTEIN et al, 1990). Este estudo demonstra que o sistema simpato-adrenal não apenas aumenta a

sensibilidade adrenal ao ACTH como também induz a liberação dos esteróides adrenais independentemente do ACTH hipofisário. Esta ação é provavelmente mediada pela liberação de neurotransmissores locais das terminações nervosas ou de células da medula adrenal (DOROVINI-ZIS, ZIS, 1991).

Em animais não estressados, o grau de ativação dos neurônios noradrenérgicos (c-Fos/TH positivos) do LC não diferiu entre os animais em periestrospausa e os controles. Este dado corrobora os resultados observados na atividade dos neurônios parvocelulares do PVN, bem como nas concentrações basais de corticosterona e progesterona, nos quais não foram observadas alterações significantes entre animais controles e na periestrospausa. De fato, em nosso laboratório, não temos observado alterações na atividade basal deste núcleo bem como no conteúdo de noradrenalina em várias áreas estudadas do SNC em animais em periestrospausa (PESTANA-OLIVEIRA et al., 2018). Assim, nesta fase da vida reprodutiva, ao contrário do observado no sistema serotoninérgico, no qual há uma diminuição da atividade basal, do número de neurônios TPH positivos no núcleo dorsal da rafe e do conteúdo de serotonina em áreas alvo (PESTANA-OLIVEIRA et al., 2018), o sistema noradrenérgico parece não estar comprometido.

Da mesma forma, observamos que as ratas em periestrospausa respondem ao estresse de forma semelhante às ratas controles, ou seja, com similar aumento no número de neurônios noradrenérgicos ativados, o que demonstra também que este sistema não está comprometido neste período de transição da vida reprodutiva, no que tange à sua capacidade de responder a estímulos estressantes.

Uma vez que nossas ratas são adultas jovens (aproximadamente 110 dias de vida) era esperado que a resposta ao estresse fosse diferente da observada em animais idosos, onde o envelhecimento parece atenuar a atividade noradrenérgica central (OLPE, STEINMANN, 1982), embora outros autores não tenham visto uma redução no número de neurônios localizados neste núcleo (GOLDMAN, COLEMAN, 1981).

A atividade normal dos componentes centrais em resposta ao estresse (PVN e LC), bem como a resposta preservada da estimulação da síntese e secreção de progesterona durante a periestrospausa, reforçam a hipótese de que a menor secreção de corticosterona em resposta ao estresse, observada nas ratas em periestrospausa, deve estar relacionada às alterações intrínsecas na adrenal. De fato há uma variedade de neuropeptídeos (opioides, calcitonina, VIP, NPY, CRH e Substância P), neurotransmissores (dopamina, adrenalina e noradrenalina), fatores de crescimento e citocinas (BORNSTEIN, CHROUSOS, 1999; ENGELAND, 1998) que afetam a função da adrenal. Estes circuitos reguladores intra-adrenal, que funcionam de

forma a adaptar a função desta glândula à diferentes situações, poderiam estar alterados nesta fase de transição da vida reprodutiva. Além disso, é possível que as cascatas de produção da corticosterona, em resposta à um estímulo, estejam prejudicadas durante a peri menopausa. Estas possíveis alterações poderiam comprometer a esteroidogênese adrenal em passos posteriores à produção de progesterona, limitando assim a síntese e secreção de corticosterona em situações que sua produção rápida é requerida, como em resposta ao estresse agudo. No entanto, esta hipótese exige novos estudos para ser confirmada.

Efeito da terapia hormonal na resposta ao estresse

No decorrer do ciclo reprodutivo das fêmeas, a influência dos esteroides ovarianos no organismo vai além da promoção da ovulação e capacitação do sistema reprodutor para uma possível concepção. Tanto os estrogênios como a progesterona podem promover respostas fisiológicas variadas, como as relacionadas ao desenvolvimento e manifestação de comportamentos, que são passíveis de mudança de acordo com as suas concentrações no decorrer das fases do ciclo reprodutivo (FIGUEIREDO, DOLGAS, HERMAN, 2002).

Desta forma, considerando que diversas regiões cerebrais como a amígdala, córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo (em especial o PVN) estão relacionadas à modulação do sistema de estresse, e que nessas regiões existem receptores para estrogênios e progesterona (ERs e PRs), a influência hormonal predominante em cada fase do ciclo reprodutivo é, portanto, também capaz de modular a atividade do eixo HPA (FIGUEIREDO, DOLGAS, HERMAN, 2002; OYOLA, HANDA, 2017; VIAU, MEANEY, 1991). No entanto, a modulação do sistema de estresse por estes hormônios é um assunto bastante controverso, como veremos abaixo.

Influência da terapia hormonal na secreção de corticosterona e progesterona

5.7 Terapia com estradiol sobre a secreção de corticosterona e progesterona

A ação do estradiol em aumentar a secreção basal de corticosterona é bem estudada. Fêmeas tem concentrações plasmáticas basais de corticosterona mais altas que machos (CRITCHLOW et al, 1963; KALIL et al, 2013; PIGNATELLI et al., 2006) e durante o ciclo estral, na fase do proestro, quando as concentrações de estradiol são as mais altas, as concentrações de corticosterona também estão mais altas do que nas outras fases do ciclo reprodutivo (HAIM et al., 2003), bem como a secreção de ACTH e a expressão de FOS no

PVN e LC (LARKIN et al, 2010). Da mesma forma, o estradiol aumenta a secreção basal de corticosterona de ratas ovariectomizadas (SEROVA et al, 2010; KALIL et al, 2013). No entanto, em humanos, não foi encontrada diferença na secreção basal de cortisol entre homens e mulheres (SEEMAN et al, 2001).

No que se refere ao efeito do estradiol na secreção de glicocorticóides em resposta ao estresse, os dados são mais controversos. Há vários trabalhos na literatura demonstrando que a resposta do eixo HPA ao estresse também é maior em fêmeas do que em machos (HANDA et al, 1994; KALIL et al, 2013), bem como na fase do proestro, quando os picos de ACTH e de corticosterona, induzidos pelo estresse de contenção, são maiores do que os observados nas fases de estro e diestro (VIAU, MEANEY, 1991). Esta diferença intersexual foi atribuída tanto a diferenças nas vias de síntese na adrenal (KITAY, 1963; GASKEN, KITAY, 1971) como também a diferenças na secreção de ACTH (BURGESS, HANDA, 1992; HANDA et al, 1994). Por outro lado, em um estudo desenvolvido sobre a secreção de cortisol ao longo da vida, foi observado que homens jovens respondem mais ao estresse psicossocial do que mulheres da mesma faixa etária, enquanto que em sujeitos idosos, esta resposta é maior nas mulheres (SEEMAN et al, 2001).

A maioria dos trabalhos sobre o efeito estimulador do estradiol na secreção de corticosterona em resposta ao estresse é desenvolvida em animais ovariectomizados (WEISER, HANDA, 2009; BURGESS, HANDA, 1992; HANDA, WEISNER 2014; GREEN, MARCOLIN, MCCORMICK, 2018). Foi demonstrado que a ovariectomia reduz a secreção de corticosterona induzida por estresse (LESNIEWSKA, NOWAK, MALENDOWICZ, 1990) e diminui os níveis de CRH no PVN, bem como a frequência e a amplitude dos pulsos de corticosterona (SEALE et al, 2004), o que é revertido pelo estradiol. Além disso, o pico de ACTH induzido pelo estresse é amplificado pelo estradiol em ratas ovariectomizadas (VIAU, MEANEY, 1991).

Apesar da gama de trabalhos evidenciando os efeitos positivos do estradiol sobre a secreção de corticosterona basal e induzida pelo estresse, efeitos opostos aos descritos anteriormente, também tem sido demonstrados, de forma a correlacionar o aumento do estradiol com a inibição da atividade do eixo HPA.

Em ratas ovariectomizadas, o tratamento crônico (3 semanas) com estradiol diminui o conteúdo de CRH no hipotálamo, via inibição da síntese de CRH (HASS, GEORGE; 1989). Neste mesmo modelo foi demonstrado que o estradiol administrado sozinho ou concomitante à progesterona, atenua a secreção de corticosterona em resposta ao estresse (FERREIRA-SILVA et al., 2009), dado semelhante àquele por nós obtidos em modelo animal de

perimenopausa, o qual evidenciou que a administração crônica de estradiol, assim como a sua combinação com a progesterona, não modificou, e até mesmo atenuou a secreção de corticosterona em resposta ao estresse de contenção.

Este efeito negativo do estradiol sobre a secreção de corticosterona também tem sido observado em mulheres. Foi demonstrado que em mulheres ciclando regularmente, a resposta do cortisol ao estresse psicossocial é menor na fase folicular tardia, quando as concentrações de estradiol são altas, (KIRSCHBAUM et al, 1999) e maior no início da fase folicular, quando as concentrações de estradiol estão baixas, (MAKI et al., 2015) do que em outras fases do ciclo. Este efeito do estradiol em inibir o eixo HPA também foi observado em estudos de ressonância magnética o qual evidenciou que, em mulheres ciclando regularmente, houve um aumento da atividade do hipocampo em resposta ao estresse psicossocial, bem como um menor *score* de distress após o estímulo na fase ovulatória do ciclo menstrual, quando as concentrações de estradiol são as mais altas do ciclo, enquanto que em baixos níveis de estradiol (início da fase folicular) o resultado foi o oposto (ALBERT, PRUESSNER, NEWHOUSE, 2015). Importante ressaltar que a maior ativação do hipocampo acima citada (com altos níveis de estradiol) resulta na inibição do eixo HPA, diminuindo assim a liberação de CRH, ACTH e cortisol. Por outro lado, foi observado que durante a fase lútea, diferentes tipos de estresses provocaram maior secreção de cortisol, do que no início da fase folicular (KIRSCHBAUM et al., 1999).

Durante a perimenopausa (45-52 anos), a administração de estradiol por oito semanas também foi capaz de atenuar a secreção de ACTH, glicocorticóides e catecolaminas, em resposta ao estresse psicológico (KOMESAROFF, 1999). Dessa forma, os estudos acima citados sugerem que tanto em mulheres na pré-menopausa como na perimenopausa, o estradiol exerce um efeito limitador das respostas da corticosterona ao estresse. Estes dados corroboram os nossos resultados que, apesar de serem diferentes de muitos estudos desenvolvidos em animais, parece se assemelhar ao que foi descrito tanto em mulheres jovens como também neste período de transição da vida reprodutiva, o qual é o foco do nosso trabalho.

Nos animais em periostropausa induzida por VCD a terapia hormonal com estradiol, associada ou não à progesterona, foi capaz de elevar a concentração de progesterona plasmática nos animais estressados. Este efeito do estradiol exógeno em elevar as concentrações plasmáticas de progesterona, também foi observado em estudos recentes desenvolvidos em nosso laboratório, em ratas em periostropausa não estressadas (PESTANA-OLIVEIRA et al., 2018; Barros et. al., dados não publicados). De fato, este efeito do estradiol,

per se, é observado após o período de recuperação.

O efeito positivo do estradiol sobre a secreção de progesterona pode ser explicado com base na sua ação na esteroidogênese. O estradiol exógeno aumenta a atividade da enzima 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase (3- β HSD), facilitando a conversão de pregnenolona em progesterona, e diminui a atividade da enzima 17-hidroxilase (17-OH), que metaboliza a progesterona. Assim, o estradiol é capaz de induzir o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona por aumentar sua síntese e reduzir sua degradação (MUNABI et al, 1983). Este efeito do estradiol não se limita ao aumento dos níveis periféricos de progesterona. A incubação de astrócitos hipotalâmicos com estradiol induz aumento na concentração de neuroprogesterona no meio de incubação (MICEVYCH, SINCHAK, 2008).

Neste desenho experimental, não é possível separar o efeito do estradiol na esteroidogênese e na resposta ao estresse. No entanto, parece ser mais provável que a secreção elevada de progesterona, induzida pelo estradiol, esteja relacionada mais diretamente ao efeito da terapia estrogênica *per se* na modulação da esteroidogênese adrenal, do que à modificação da resposta ao estresse.

Considerando que a síntese de progesterona é etapa precursora essencial para a síntese e secreção de corticosterona, poderíamos levantar outra hipótese: a de que neste período de transição da vida reprodutiva, os mecanismos de controle da síntese e secreção de corticosterona estejam comprometidos especificamente em situações de estresse. É possível que a metabolização da progesterona em corticosterona esteja prejudicada neste modelo animal uma vez que, apesar do aumento crônico das concentrações de progesterona induzido pela terapia estrogênica, a secreção de corticosterona em resposta ao estresse não somente não foi corrigida, como foi atenuada.

Uma vez que a terapia estrogênica por 21 dias, que resulta em níveis cronicamente elevados de progesterona, não corrigiu a menor resposta da corticosterona ao estresse, a hipótese levantada anteriormente de que as menores concentrações de progesterona na periostropausa poderiam ser responsáveis pela menor resposta da corticosterona ao estresse não seria suportada por nossos dados.

5.8 Terapia com progesterona sobre a secreção de corticosterona e progesterona

O efeito da progesterona sobre a secreção de corticosterona não é muito estudado. Alguns poucos trabalhos tem descrito uma ação antagônica da progesterona sobre o efeito positivo do estradiol no eixo HPA. Em macacas ovariectomizadas, foi demonstrado que o

tratamento com estradiol, o qual simula a fase folicular, aumenta os níveis de RNAm para o CRH no PVN enquanto que a progesterona preveniu este efeito (ROY et al, 1999). Em ratas, a progesterona também inibiu o efeito positivo do estradiol sobre a liberação de ACTH, bem como na secreção de corticosterona induzida pelo estresse (VIAU, MEANEY, 1991). Os efeitos antagônicos da progesterona sobre a ação positiva do estradiol também foram observados em ovelhas (KELLER-WOOD, 1998).

No presente estudo, a concentração de corticosterona após o estresse aumentou de 19,8 para 187ng/ml nas ratas controles, enquanto que em ratas em periostropausa, esta resposta foi menor, de 22 para 73ng/mL. O tratamento com progesterona recuperou parcialmente a capacidade da adrenal de responder ao estresse, de forma que os níveis de corticosterona atingiram 127ng/mL imediatamente após o estresse. Este efeito positivo da progesterona em induzir a síntese e secreção de corticosterona foi antagonizado pelo estradiol. Assim, enquanto os trabalhos acima mostram que a progesterona antagoniza os efeitos positivos do estradiol, nós observamos que o estradiol antagoniza os efeitos positivos da progesterona.

Um dado que chama a atenção é o de que o tratamento com progesterona não resultou em aumento nos níveis plasmáticos deste hormônio. Tanto imediatamente após o estresse como após o período de recuperação, os níveis de progesterona plasmática de ratas tratadas com este hormônio não foram diferentes daquele observado nas ratas em periostropausa que não receberam terapia hormonal (VCD+PL estressado). No entanto, ambos os grupos (tratados ou não com progesterona) responderam ao estresse de maneira diferente na secreção de corticosterona, de forma que a secreção de corticosterona aumentou nos animais tratados com progesterona. Este resultado nos mostra que a terapia com progesterona favoreceu de alguma forma a síntese e secreção de corticosterona em resposta ao estresse, a qual poderia estar prejudicada na periostropausa.

Na literatura há vários estudos sobre os efeitos das progestinas (progesteronas sintéticas) na secreção de glicocorticóides em mulheres, e os resultados têm demonstrado efeitos contraditórios. Considera-se que a diferença na estrutura das moléculas utilizadas possa influenciar os resultados. Por exemplo, alguns estudos mostram que a administração do acetato de medroxiprogesterona (MPA) (AMATAYAKUL et al, 1988) bem como outras progestinas (AMATAYAKUL et al, 1988; DE LEO et al, 2007; GASPARD et al, 1983; OLSSON, ODLIND, HAMMOND, 1987), **não alteram** ou mesmo **aumentam** (WIEGRATZ et al., 2003; WIEGRATZ, KUHL, 1995) a secreção de cortisol. Por outro lado, muitos outros estudos evidenciaram que o tratamento de mulheres saudáveis (AEDO et al, 1981, JONES, DELROSARIO, SORIERO, 1974) ou com câncer de mama (BLOSSEY et al., 1984;

HELLMAN et al., 1976; LANG et al., 1990; PAPALEO et al, 1984; VAN VEELLEN et al, 1984) com MPA, assim como com outras progestinas, (TOPPOZADA et al, 1997; BECK et al.,1972; AMATAYAKUL et al, 1988) **diminui** a concentração sérica de cortisol.

Como já citado anteriormente, nós observamos que ratas em periostropausa expostas à estresses prévios exibiram resposta da corticosterona ao estresse igual à do grupo controle (Arikawe et al, dados não publicados). Sabendo-se que estresses provocam aumento na secreção de progesterona, a hipótese de que a exposição prévia à este hormônio seja pela terapia hormonal crônica ou por estresses prévios tenha facilitado a síntese de corticosterona para posterior secreção durante o estresse agudo, parece aceitável. De fato, nós observamos um efeito facilitador da progesterona exógena na resposta da corticosterona ao estresse. No entanto, as concentrações plasmática de progesterona não estavam altas. Uma hipótese é a de que a progesterona exógena tenha sido utilizada para a síntese de corticosterona, a qual foi liberada em resposta ao estresse.

Esta hipótese poderia ser reforçada com base na interferência da progesterona exógena sobre a esteroidogênese adrenal. Já foi demonstrado, que a administração de progesterona reduz a atividade da enzima 3- β hidroxisteróide desidrogenase (3- β HSD) no ovário reduzindo a conversão da pregnenolona em progesterona (MUNABI et al., 1983). O resultado, portanto, é uma queda na produção endógena da progesterona. Por outro lado, a etapa seguinte da conversão da progesterona pela 21 β -hidroxilase gera a 11-desoxicorticosterona, precursora da corticosterona. Se de fato a produção endógena de progesterona estivesse reduzida por estes mecanismos, a secreção de corticosterona também estaria prejudicada. No entanto, em nossos animais, é muito provável que a administração de progesterona tenha de algum modo fornecido substrato necessário para a síntese de corticosterona a ser secretada em resposta ao estresse. Os mecanismos pelos quais a progesterona exógena pode facilitar a síntese e a secreção de corticosterona ainda precisam ser elucidados.

Diferentemente do efeito positivo da progesterona na resposta da corticosterona ao estresse, a terapia com progesterona não alterou a resposta da progesterona ao estresse.

Há poucos trabalhos na literatura demonstrando o efeito da terapia com progesterona na secreção deste mesmo hormônio. Em mulheres, um único trabalho estudou o efeito de progestinas nos níveis de progestogênios, o qual foi observado que o tratamento de mulheres ciclando normalmente, com acetato de medroxiprogesterona (MPA, progesterona sintética) por 16 dias, diminui os níveis de progesterona e de 17-OH progesterona (AEDO, LANDGREN, DICZFALUSY, 1981). Em ratos, foi observado que a secreção de

progesterona induzida pelo FSH pode aumentar ou diminuir dependendo da dose administrada de MPA, (PRIDJIAN, SCHMIT, SCHREIBER, 1987).

Estes efeitos foram também observados com a administração de progestinas. Em peixes, o levonorgestrel diminui a expressão de 3β HSD e da 17-OH (OVERTURF et al, 2014) diminuindo a produção e a metabolização de progesterona e da pregnenolona em 17OH-Progesterona e 17-OHPregnenolona, respectivamente, como precursores do cortisol. Em ratos, o levonorgestrel também inibiu a atividade das mesmas enzimas (ARAKAWA et al., 1989). Em uma linhagem de células de carcinoma adrenocortical, a Drospirenona também reduziu a atividade da 3β HSD e da 17-OH (LOUW-DU TOIT et al, 2017; TOIT et al, 2016).

Como discutido acima, foi demonstrado em ovários de ratas que a administração de progesterona reduz a atividade da 3β HSD e da 17-OH e, conseqüentemente, reduzindo a síntese de progesterona endógena (MUNABI et al, 1983). Apesar de este estudo ter sido realizado em ovários, o mesmo efeito da progesterona em diminuir a atividade desta enzima ocorre na esteroidogênese adrenal (para revisão ver LOUW-DU TOIT et al, 2017).

Considerando todos os estudos desenvolvidos em animais e em mulheres, é possível considerar que em nossos animais em periostropausa tratados com progesterona, a atividade da 3β HSD também esteja diminuída, de modo a reduzir a síntese de progesterona endógena, enquanto que, de alguma forma, a administração deste hormônio possa ter sido utilizada para a síntese de corticosterona.

Os dados deste estudo sugerem que durante a periostropausa, apesar da secreção basal de corticosterona estar normal, a capacidade da zona fasciculada da adrenal de elevar rapidamente a síntese e liberação de corticosterona em situações de estresse agudo, esteja diminuída. Esta deficiência na resposta é parcialmente corrigida pela progesterona exógena, mas não por aumento da endógena.

Efeito da terapia hormonal na resposta central ao estresse: PVN e LC

5.9 PVN

Os neurônios do PVN são alvo das ações dos esteróides ovarianos. No entanto, a descrição dos locais de expressão de receptores para o estradiol e progesterona no PVN é controversa. Alguns trabalhos relatam que há um número escasso de receptores de estradiol do tipo alfa ($ER\alpha$) e de receptores de progesterona (PRs), enquanto que os receptores de estradiol do tipo beta ($ER\beta$) estão localizados por todo o núcleo, em especial nas subdivisões parvocelulares, bem como em neurônios CRH (HANDA, WEISER, 2014; LAFLAMME et al,

1998; SUZUKI, HANDA, 2004, 2005). Por outro lado, outros estudos relatam que a sobreposição na expressão de CRH e ER β no PVN é pequena (ALVES et al, 1998). Estas diferenças podem ser justificadas pelos diferentes métodos de análise utilizados nos estudos, como imunohistoquímica, hibridização *in situ*, PCR, ou mesmo pelo modelo experimental.

Os efeitos do estradiol no PVN também são controversos. Em ratas (BOHLER et al, 1990; HAAS, GEORGE, 1988; PATCHEV et al, 1995) e em macacas rhesus (ROY, REID; VAN VUGT, 1999), o estradiol estimula a síntese de CRH no PVN. No entanto, este efeito parece não ocorrer via ER β , uma vez que a síntese de CRH no PVN induzida pelo estradiol é semelhante entre camundongos *knockout* para ER- β e selvagens (NOMURA et al, 2002), o que sugere pouca importância destes receptores na síntese de CRH, nesta área. Por outro lado, foi demonstrado que agonistas ER β ou compostos com afinidade por este mesmo receptor, reduzem a secreção de ACTH e de corticosterona em ratas ovariectomizadas (LUND, HINDS, HANDA, 2006), bem como a expressão de c-Fos no PVN (WEISER, WU, HANDA, 2009) em resposta ao estresse, sugerindo que este receptor para estradiol possa modular a atividade do eixo HPA de forma negativa, ou seja, diminuindo sua atividade.

Diferente da ação dos ER β , os ER α parecem modular positivamente o eixo HPA. A ativação destes receptores amplifica, enquanto a ativação do ER β reduz, a reatividade do eixo HPA ao estresse (LUND, HINDS, HANDA, 2006; WEISER, WU, HANDA; 2009). Este aumento da atividade do eixo parece ocorrer pela diminuição do *feedback* negativo dos glicocorticoides no eixo HPA, o qual é prejudicado pelo estradiol nestes receptores e por agonistas ER α (WEISER, HANDA, 2009). Além disso, o estradiol diminui a expressão de ER β (HANDA, WEISER, 2014; SUZUKI, HANDA, 2004), reduzindo a modulação inibitória causada pela ativação destes receptores.

Além dos receptores de estradiol, os receptores para progesterona (PR) podem estar presentes em diversas regiões cerebrais, inclusive no hipotálamo e no LC (CAMACHO-ARROYO, GUERRA-ARAIZA, CERBÓN, 1998; HELENA et al, 2006). No entanto, a expressão desse receptor é baixa no PVN de diversas espécies, incluindo em ratas (BLAUSTEIN et al, 1988; CABA et al., 2003; GOLDSMITH, BOGGAN, THIND, 1997; NUMAN et al, 1999; ROMEO, BELLANI, MCEWEN, 2005). Foi demonstrado em ratas que embora a expressão de PR no PVN seja baixa, a progesterona parece atuar de forma indireta no PVN, via neurônios que se projetam para este núcleo. (PAUL, 1992; THOMAS et al, 1999). Ainda, como discutido anteriormente, a progesterona pode atuar via ALLO, modulando neurônios GABA-A e inibindo a atividade do eixo HPA (ASTON-JONES et al, 1991; PURDY et al, 1991; FRYE, 2007).

A expressão deste receptor é variável ao longo do ciclo estral, uma vez que os esteróides ovarianos atuam aumentando ou diminuindo sua expressão (SIMERLY et al, 1996). Em ratas no diestro, o conteúdo de PR no hipotálamo é baixo, enquanto que na área pré-óptica há um aumento das duas isoformas destes receptores (PR-A e PR-B). Em ratas ovariectomizadas, a terapia com estradiol aumenta, enquanto a progesterona diminui a síntese de ambas as isoformas no hipotálamo (GUERRA-ARAIZA et al, 2003).

Algumas ações da progesterona em seus receptores dependem da presença do estradiol, uma vez que este hormônio tem uma importante ação de induzir a expressão de PRs (CAMACHO-ARROYO, GUERRA-ARAIZA, CERBÓN, 1998; FURUTA et al, 2010; ROMANO, KRUST, PFAFF, 1989).

Apesar dos dados da literatura sobre a modulação da atividade do PVN pelos esteróides ovarianos, em nosso modelo animal de perimenopausa induzida por VCD, a terapia com estradiol, com progesterona ou a associação destes dois hormônios não foi capaz de modificar a atividade dos neurônios do PVN em resposta ao estresse, nas duas subdivisões analisadas, embora tenha sido observado uma atenuação na subdivisão PaPo.

É interessante observar que estas respostas centrais foram diferentes das observadas periféricamente, principalmente em relação à secreção de progesterona e corticosterona em animais em periostropausa sob terapia hormonal. Esta observação sugere que somente o componente periférico do eixo HPA esteja alterado, muito provavelmente pelo papel direto dos hormônios na esteroidogênese adrenal.

Como visto na tabela 2, nos animais em perimenopausa tratados com progesterona, a secreção de corticosterona em resposta ao estresse foi maior do que a do grupo estressado tratado com placebo, o que foi acompanhado por um pequeno aumento (não significativo) da atividade dos neurônios da região PaMP do PVN. Por outro lado, o estradiol atenuou a resposta da corticosterona ao estresse bem como o número de neurônios ativados na subdivisão PaMP do PVN. Por fim, quando o estradiol foi associado à progesterona, esta atenuação foi menor tanto na resposta da corticosterona como no número de neurônios ativados na PaMP do PVN. O mesmo paralelismo foi observado quando ratas estressadas sob terapia hormonal são comparadas com ratas VCD não estressadas, ou seja, a maior resposta ao estresse da corticosterona, por efeito da progesterona, foi acompanhada por uma tendência a maior atividade da PaMP enquanto atenuações destas respostas ao estresse, por efeito do estradiol, ocorreram também em paralelo (ver Tabela 2 e Figura 5).

Considerando que a maioria das alterações foi bastante discreta e não significativa, estes dados sugerem uma dissociação entre a atividade do PVN, que parece preservada, e da

adrenal.

De fato, os efeitos dos hormônios sobre a secreção de corticosterona nem sempre são correlacionados com as alterações centrais do eixo HPA. Por exemplo, foi observado que em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, o aumento da resposta da corticosterona ao estresse foi acompanhado por uma diminuição da expressão do gene c-fos no PVN bem como da secreção de ACTH (FIGUEIREDO et al, 2007). Em outro estudo, apesar do estradiol aumentar a expressão de FOS no PVN e no LC em resposta ao etanol, ele diminui a secreção de ACTH (LARKIN et al, 2010).

Diversos estudos tem se preocupado em avaliar a influência da terapia hormonal, em especial a estrogênica na modulação do eixo HPA. No entanto, a variedade de achados sobre o efeito deste hormônio nos componentes centrais e periféricos deste sistema, evidencia que o tipo de terapia estrogênica, a duração da exposição ao hormônio, bem como o modelo animal e o tipo de estresse aplicado, são fatores que aumentam a variedade de resultados encontrados. Até então, somos o primeiro trabalho a demonstrar, em modelo animal de perimenopausa, o efeito da terapia hormonal na resposta ao estresse.

Assim, uma vez que todas as alterações nas respostas ao estresse, com ou sem terapia hormonal, não foram acompanhadas por modificações na atividade dos neurônios das subdivisões parvocelulares do PVN, estes resultados novamente apoiam a hipótese de que o componente central do eixo HPA parece não estar comprometido na periostropausa e que os efeitos da terapia hormonal estejam ocorrendo periféricamente, na adrenal.

5.10 LC

Os neurônios do LC são também alvos para os esteróides ovarianos. No entanto, diferente do observado no PVN, os receptores para estradiol e para progesterona são amplamente expressos no LC (HELENA et al, 2009, 2006). Neste núcleo, enquanto o estradiol aumenta a expressão de PR e diminui a expressão de ER α , ele não modifica a expressão de ER β em camundongos fêmeas adultas (HELENA et al, 2009). No entanto, na periostropausa, o estradiol não modificou a expressão de PR e de ER β no LC. Além disso, o menor número de neurônios que expressam TH, observados neste modelo animal, não foi corrigido pelo estradiol (dados nossos não publicados).

A atividade dos neurônios do LC é modulada pelos esteróides ovarianos e intimamente envolvida com o processo reprodutivo. No proestro, a defraglação do pico pré-ovulatório de LH é precedida por um aumento da atividade dos neurônios do LC (HELENA, FRANCI,

ANSELMO-FRANCI, 2002; MARTINS-AFFÉRI et al, 2003). Durante a fase folicular, o estradiol aumenta a síntese de NA no LC (SEROVA, NAKASHIMA, SABBAN, 2002), mas inibe a sua liberação por inibir a atividade dos neurônios localizados nesse núcleo, enquanto que a progesterona tem papel indutor da atividade do LC e da liberação de NA (SZAWKA et al, 2009, 2013). Este efeito estimulador da progesterona sobre a liberação de NA e de LH somente ocorre no momento de deflagração do pico de LH, uma vez que cronicamente ou mesmo logo após o pico de LH, sua ação passa a ser inibitória (BANKS, FREEMAN, 1978; BARRACLOUGH et al, 1971).

No presente estudo, a terapia crônica com estradiol, progesterona ou ambos os hormônios reduziu o número de neurônios c-Fos/TH no LC para valores próximos aos observados em estado basal. Este efeito demonstra uma regulação negativa de ambos os hormônios sobre a atividade deste núcleo, de modo a reduzir a responsividade central ao estresse.

Interessante observar que enquanto se observou um certo paralelismo entre as concentrações de corticosterona e a atividade da PaMP, isto não foi observado com a PaPo. Por outro lado, a atenuação da expressão de c-Fos na PaPo, induzida pelos três tipos de terapia hormonal, foi semelhante à observada no LC, embora neste núcleo o efeito negativo tenha sido significativo. É possível que a inibição da atividade neuronal do LC, induzida pelos três esquemas de terapia hormonal, tenha sido refletida na PaPo ou vice-versa, uma vez que há conexões recíprocas entre o LC e a PaPo (SAWCHENKO, SWANSON, 1982a, 1982b; VALENTINO, FOOTE, ASTON-JONES, 1983). Desta forma, uma vez que os neurônios da PaPo do PVN se projetam preferencialmente à núcleos no tronco encefálico, como o LC, é provável que as pequenas alterações na atividade desta área e as claras alterações na atividade do LC, se reflitam na atividade da via descendente medular do LC, para modificar a atividade do sistema simpático periférico. De fato, vários estudos clínicos sugerem que os esteróides sexuais podem regular o sistema autonômico em resposta ao estresse, mas a maioria destes estudos avalia apenas o efeito do estrogênio.

Poucos estudos abordam os efeitos da terapia crônica com progesterona. Durante a fase lútea, quando as concentrações deste hormônio encontram-se mais elevadas que as do estradiol, foi observado que a frequência cardíaca, o débito cardíaco e a pressão arterial sistólica foram menores em resposta ao estresse psicossocial e por frio (SITA, MILLER, 1996). Nós também já demonstramos em macacas que o tratamento crônico com progesterona aumenta as aferências β -endorfinérgicas no LC, as quais, por sua vez, inibem a atividade deste núcleo (LIMA et al, 2017).

Por outro lado, a grande maioria dos estudos aborda os efeitos dos estrogênios no LC. Em geral, eles demonstram que estes hormônios diminuem o tônus simpático enquanto aumentam o tônus parassimpático (para revisão ver KAJANTIE, PHILLIPS, 2006).

No sistema simpático, o estradiol aumenta a densidade e a função dos receptores α_2 adrenérgicos pré-sinápticos (JANES et al, 1983; MORITA et al, 1987) diminuindo o tônus simpático. Mulheres na pré-menopausa apresentam níveis de NA basais mais baixos do que mulheres na pós-menopausa, quando os níveis de estradiol são baixos. No entanto, quando essas mulheres na pós-menopausa são submetidas a estímulos estressantes, exibem um aumento nas concentrações plasmáticas de NA e maior resposta pressórica, efeitos que são atenuados pelo tratamento com estrogênios por 6 semanas (LINDHEIM et al, 1992).

De maneira oposta, no sistema parassimpático os estrogênios potenciam a atividade colinérgica no SNC. Enquanto a ovariectomia reduz a atividade da colina acetiltransferase e o conteúdo da acetilcolina no SNC (LUINE, 1985), o estradiol aumenta estes dois parâmetros (KAUFMAN, VADASZ, LAJTHA, 1988).

Em ratas, injeções de estrogênios em diversos núcleos autonômicos centrais, diminuíram os níveis da pressão arterial, frequência cardíaca e o tônus simpático, enquanto aumentaram o tono parassimpático (SALEH et al, 2000; SALEH, CONNELL, 2003). Além disso, enquanto a ovariectomia reduz a atividade parassimpática cardíaca, a terapia estrogênica a aumenta (MCCABE, PORGES, CARTER, 1981).

Os estrogênios também atenuam as respostas a estresses. Na pós-menopausa as mulheres exibem um aumento na pressão arterial após um teste psicossocial (OWENS et al, 1993) e vários outros tipos de estresses, o que é atenuado pela terapia estrogênica (LINDHEIM et al, 1992). No entanto, há também estudos desenvolvidos em mulheres nesta fase, que não encontraram variação na frequência cardíaca e nas respostas catecolaminérgicas após 2 semanas de tratamento com estradiol (KUDIELKA et al, 1999).

Em resumo, a grande maioria dos trabalhos avalia o efeito da terapia estrogênica em situações de deficiência estrogênica, como em ratas ovariectomizadas ou em mulheres na pós-menopausa, nas quais este hormônio é repostado. No entanto, é interessante ressaltar que os estrogênios parecem exercer seus efeitos mesmo em condições normoestrogênicas, como na perimenopausa. Em ratas na periostropausa, sem deficiência estrogênica, a terapia com estradiol foi eficiente em restaurar o número de neurônios serotoninérgicos e a expressão de ER β em núcleos cerebrais, que encontram-se diminuídos neste período de transição (PESTANA-OLIVEIRA et al, 2018).

No presente estudo, observamos um efeito inibitório de ambos os hormônios, estradiol e progesterona, na atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC, um importante modulador do sistema simpático por meio da via descendente medular. Embora não tenhamos avaliado a atividade simpática em nossos animais, é possível sugerir que as terapias hormonais utilizadas tenham atenuado a resposta destes neurônios ao estresse. De fato, foi demonstrado em mulheres que na perimenopausa a terapia com estrogênios também foi capaz de atenuar as concentrações totais de NA corporal (SUDHIR et al, 1997), da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, bem como a secreção de adrenalina e NA após um desafio de aritmética mental, classificado como um estímulo estressante (KOMESAROFF et al, 1999).

Outra possível consequência dos efeitos dos esteróides ovarianos no LC pode estar relacionada ao comportamento de ansiedade. Embora este comportamento não tenha sido avaliado neste estudo, sabe-se que os neurônios do LC respondem fortemente ao estresse com aumento de sua atividade tônica (VALENTINO, VAN BOCKSTAELE, 2008) o qual induz comportamento do tipo ansioso, enquanto o bloqueio desta atividade neuronal suprime a ansiedade induzida pelo estresse (MCCALL et al, 2015). A foto-estimulação das projeções do LC para a amígdala basolateral induz liberação de NA nesta área, a qual se projeta para regiões ansiogênicas do cérebro, produzindo assim, comportamentos preditivos de ansiedade (MCCALL et al, 2017). O LC parece, portanto, ser um mediador crítico da ansiedade aguda induzida pelo estresse. Por sua vez, tem sido demonstrado que os esteróides ovarianos exercem efeitos ansiolíticos (DE JESÚS-BURGOS et al, 2016; FERNÁNDEZ-GUASTI, PICAZO, 1990). Desta forma, é possível que a diminuição da atividade dos neurônios do LC induzida pelo estradiol e pela progesterona nas ratas em periostropausa, tenha contribuído para diminuir a ansiedade, uma característica já demonstrada neste modelo animal (Reis et al, 2014).

5.11 Efeito do estresse, da depleção folicular e da terapia hormonal no período de recuperação pós-estresse

Enquanto diversos tipos de estresses agudos desencadeiam a ativação do eixo HPA e secreção de cortisol, os mecanismos de *feedback* terminam esta resposta. A fase de queda nas concentrações de glicocorticóides é marcada por um desligamento rápido da liberação de ACTH, seguido por um retorno mais gradual às suas concentrações basais. Tanto a fase rápida como a lenta é consequência da inibição, por *feedback* do eixo HPA, por meio dos receptores de glicocorticóides (HERMAN et al, 2016). Na fase rápida de desligamento da atividade do

eixo HPA, a ação dos glicocorticóides se dá nos neurônios CRH do PNV, reduzindo a atividade destes neurônios por meio de queda na liberação de glutamato (DI et al., 2003; EVANSON et al., 2010) e aumento de GABA (HERMAN et al, 2002), entre outros. O hipocampo e o córtex pré-frontal, que expressam grande quantidade de receptores para os glicocorticóides (GR) e mineralocorticóides (MR) (HERMAN, 1993) também participam deste *feedback* negativo.

Em animais idosos, a capacidade de responder ao estresse com secreção apropriada de corticosterona é intacta; no entanto, sua capacidade de terminar esta resposta está dramaticamente comprometida. Enquanto em animais jovens, as concentrações de corticosterona retornam aos níveis basais por volta de 60 minutos após o final do estresse, nos idosos, estas concentrações permanecem elevadas até 24 horas após o término do estímulo, devido à secreção continuada deste hormônio (SAPOLSKY, KREY, MCEWEN, 1983, 1984; IDA et al, 1984).

As ratas utilizadas neste estudo eram jovens e, portanto, as concentrações de progesterona e corticosterona, na maioria dos grupos, retornaram aos níveis basais 60 minutos após o final do estresse. Neste período, as concentrações basais de corticosterona foram ao redor de 7ng/mL em 4 dos 5 grupos estressados, e iguais aos grupos controles (tratado com Óleo ou VCD) não estressados, o que sugere que os níveis basais deste hormônio foram restabelecidos, uma vez que os grupos controles de estresse permaneceram em repouso por todo o período, até a coleta da amostra sanguínea. O único grupo estressado a apresentar níveis mais altos (cerca de 20ng/mL) de corticosterona, após 60 minutos do final do estresse, foi o grupo Óleo+PL. É possível que, uma vez que este grupo foi o que respondeu mais intensamente ao estresse (187,4ng/mL imediatamente após o estresse), o seu período de recuperação tenha sido mais longo, de forma que 60 minutos após o final do estímulo, as concentrações de corticosterona ainda estavam ligeiramente maiores que a dos outros grupos. No entanto, esta diferença é insignificante devido sua concentração, mesmo que maior do que a dos outros grupos ser muito baixa.

A recuperação completa dos animais tratados com veículo e estradiol, associado ou não à progesterona, também foi demonstrado por outros autores, os quais observaram que aos 45 e 90 minutos após o estresse não havia mais diferença nas concentrações de corticosterona entre os três grupos (GREEN, MARCOLIN, MCCORMICK, 2018; KALIL et al, 2013). Assim, nas ratas em periostropausa, a capacidade de recuperação após o estresse se mostrou conservada.

Os grupos controles (óleo e VCD) não estressados apresentaram concentração de

corticosterona de cerca de 20ng/mL na primeira coleta (0 min-basal). Em roedores, para se obter concentrações basais de corticosterona e ACTH, a amostra de sanguínea deve ser colhida em até 3 minutos ou 20 segundos após o estresse, respectivamente (HARVEY et al, 2007, 2008). Assim, considerando que as concentrações de corticosterona retornam aos seus níveis basais 60 minutos após o final do estresse, e que no presente estudo a primeira coleta destas amostras foi realizada 30 minutos após o deslocamento dos animais do biotério para a sala de experimentação, é muito provável que estas concentrações representem ainda, o período de recuperação da resposta ao estresse provocado pelo deslocamento destes animais.

As concentrações plasmáticas de progesterona, após o período de recuperação de 60 minutos, foram iguais àsquelas observadas antes do período de estresse (0 min) tanto nas ratas controles como na periestro-pausa. No entanto, as ratas em periestro-pausa tratadas com estradiol sozinho ou associado à progesterona apresentaram concentrações de progesterona mais altas após o período de recuperação. Considerando a ação do estradiol de induzir a síntese e a secreção de progesterona, estes níveis mais altos muito provavelmente representam valores basais e não a uma alteração no processo de recuperação do estresse.

De modo geral, podemos concluir que a capacidade de recuperação do estresse, no que se refere tanto à secreção de corticosterona como de progesterona, parece estar preservada na periestro-pausa.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O conjunto de dados do presente estudo demonstrou que na peri menopausa, embora a secreção de progesterona em resposta ao estresse esteja preservada, a capacidade da adrenal de secretar corticosterona está reduzida. Esta redução parece não estar associada à deficiência na função do eixo HPA, mas sim à disfunções na esteroidogênese adrenal, que foram parcialmente corrigidas pela progesterona exógena mas não por aumento na produção de progesterona induzida por estresse ou estradiol. Ainda, a capacidade de recuperação pós-estresse se mostrou preservada na peri menopausa. Os esteróides ovarianos não alteraram a atividade dos neurônios do PVN, mas diminuíram a atividade neuronal do LC, sugerindo uma possível atenuação do tônus simpático. Os próximos desafios para essa abordagem serão desvendar os mecanismos pelos quais a secreção de corticosterona em resposta ao estresse está diminuída durante a peri menopausa, bem como a interação da progesterona exógena em corrigir parcialmente esta resposta.

7. REFERÊNCIAS

AEDO AR, LANDGREN BM, DICZFALUSY E. Studies on ovarian and adrenal studies at different phases of the menstrual cycle. IV. The effect of dexamethasone suppression and subsequent ACTH stimulation at different phases of the menstrual cycle and following the administration of 150 mg of depot-medroxy-progesterone acetate (DMPA). *Contraception*, 24(5):543-58, 1981.

ALVES SE, LOPEZ V, MCEWEN BS, WEILAND NG. Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6):3281-3286, 1998.

AMATAYAKUL K, PETPOO W, RATANAWANANUKUL N, TANTHAYAPHINANT O, TOVANABUTRA S, SURIYANON V. A study of adrenocortical function and its reserve activity in long-acting injectable contraceptives. *Contraception* 37(5):483-92, 1988.

ANDERSEN ML, BIGNOTTO M, MACHADO RB, TUFIK S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 37(6): 791-797, 2004.

ARAKAWA S, MITSUMA M, IYO M, OHKAWA R, KAMBEGAWA A AND OKINAGA S. Inhibition of Rat Ovarian 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3β -HSD), 17α -Hydroxylase and $17,20$ Lyase by Progestins and Danazol.. *Endocrinol. Japon.* 36 (3):387-394, 1989.

ASSENMACHER I, BARBANEL G, GAILLET S, GIVALOIS L et al. Central Regulation of ACTH Release in Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771(1):41-53, 1995.

ASTON-JONES G, SHIPLEY, M. T., CHOUVET, G., ENNIS, M., VAN BOCKSTAELE, E., PIERIBONE, V et al. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Progress in Brain Research*, 88 47-75, 1991.

BANKS A. FREEMAN ME The temporal requirement of progesterone on proestrus for extinction of the estrogen-induced daily signal controlling luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology*, 102(2):426-432, 1978.

BARRACLOUGH CA, CHARLES A, ROBERT C, RENATO M, LUCIANO M. Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentrations in the rat: Effects of nembutal and exogenous gonadotropins. *Endocrinology*, 88(6):1437-1447, 1971.

BECK RP, MORCOS F, FAWCETT D, WATANABE M. Adrenocortical function studies during the normal menstrual cycle in women receiving norethindrone with and without mestranol. *Am J Obstet Gynecol*, 112(2):364-8., 1972.

BELANGER A, CANDAS B, DUPONT A, CUSAN L, DIAMOND P, GOMEZ JL, LABRIE F. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab*, 79 1086–1090, 1994

BENEDETTI M, RORATO R, CASTRO M, MACHADO BH, ANTUNES-RODRIGUES J, ELIAS LLK. Water deprivation increases Fos expression in hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons induced by right atrial distension in awake rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295 R1706–R1712, 2008.

BESTETI GE, REYMOND MJ, BLANC FO, BOUJON CE, FURRER B,ROSSI²³, GIOVANNI L. Functional and Morphological Changes in the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis of Aged Female Rats. *Biology of reproduction*, 45 221-228, 1991.

BLAUSTEIN JD, KING JC, TOFT DO, TURCOTTE J. Immunocytochemical localization of estrogen-induced progesterin receptors in guinea pig brain. *Brain Research*, 474(1):1–15, 1988.

BLOSSEY HC, WANDER HE, KOEBBERLING J, NAGEL GA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for the treatment of metastatic breast cancer with high-dose medroxyprogesterone acetate. *Cancer*, 54(6):1208–15, 1984.

BOEHM N, PLAS-ROSER S, ROOS M & ARON C. How different procedures of blood removal affect blood progesterone concentration in the cyclic female rat. *J Steroid Biochem* 16 339-342, 1982.

BOHLER HCL, THOMAS ZR, KING JC, RUBIN BS, WEBER R, MERRIAM GR. Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Molecular Brain Research*, 8(3):259–262, 1990.

BORNSTEIN SR, EHRHART-BORNSTEIN M, SCHERBAUM WA, PFEIFFER EF, HOLST JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology* 127(2)900–906, 1990.

BORNSTEIN SR, ENGELAND WC, EHRHART-BORNSTEIN M, HERMAN JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab*, 19(5)175–180, 2008.

BORNSTEIN SR, CHROUSOS GP. Adrenocorticotropin (ACTH)-and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(5), 1999.

BOSCARO M, PAOLETTA A, SCARPA E, BARZON L, FUSARO P, FALLO F, SONINO N. Age-related changes in glucocorticoid fast feedback inhibition of adrenocorticotropin in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 1380–1383, 1998.

BREIER A1, BUCHANAN RW. The effects of metabolic stress on plasma progesterone in healthy volunteers and schizophrenic patients. *Life Sci*, 51(19):1527-1534, 1992.

BRINTON RD, Yao J, Yin F, Mack WJ, Cadenas E. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(7):393–405, 2015.

BROMBERGER JT, MEYER PM, KRAVITZ HM, SOMMER BC, POWELL L, GANZ PA, SUTTON-TYRRELL K. Psychologic distress and natural menopause: A multiethnic community study. *American Journal of Public Health*, 91(9):1435–1442, 2001.

BROOKS HL, POLLOW DP, HOYER PB. The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology*, 31(4):250–257, 2016.

BROWN G, COURTNEY G, MAROTTA S. Progesterone secretion by adrenal glands of hamsters and comparison of ACTH influence in rats and hamsters. *Steroids*, 28 275–282, 1976.

BRUCE W, WILLCOX DL, MEYER G & WADDELL BJ. Effects of handling anesthesia, ovariectomy and adrenalectomy on serial measurements of plasma progesterone in 16-day pregnant rats. *J Endocrinol*, 100 189-193, 1984.

BUECHEL, HM, POPOVIC J, STAGGS K, ANDERSON KL, THIBAUT O, et al. Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: implications for psychosocial stress in aging. *Frontiers in aging neuroscience*, doi: 10.3389, 2014.

CABA M, ROVIROSA MJ, BEYER C, GONZÁLEZ-MARISCAL G. Immunocytochemical detection of progesterone receptor in the female rabbit forebrain: Distribution and regulation by oestradiol and progesterone. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(9):855–864, 2003.

CAMACHO-ARROYO I, GUERRA-ARAIZA C, CERBÓN MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport*, 9(18):3993–3996, 1998.

CHILDS E, DLUGOS A, DE WIT H. Cardiovascular, hormonal, and emotional responses to the TSST in relation to sex and menstrual cycle phase. *Psychophysiology*, 47 550–559, 2010.

CHOI DC, FURAY AR, EVANSON NK, OSTRANDER MM, ULRICH-LAI YM, HERMAN JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci*, 27 2025–2034, 2007.

CHROUSOS GP, GOLD PW. The Concepts of Stress and Stress System Disorders Overview of. *Jama*, 267 1244–1252, 1992.

CIANO C, KING TS, WRIGHT RR, PERLIS M, SAWYER AM. Longitudinal Study of Insomnia Symptoms Among Women During Perimenopause. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 46(6):804–813, 2017.

CRITCHLOW V, LIEBELT RA, BAR-SELA M, MOUNTCASTLE W, LIPSCOMB HS. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol*, 205(5):807-815, 1963.

DE JESÚS-BURGOS MI, GONZÁLEZ-GARCÍA S, CRUZ-SANTA Y, PÉREZ-ACEVEDO NL. Amygdalar activation of group I metabotropic glutamate receptors produces anti- and pro-conflict effects depending upon animal sex in a sexually dimorphic conditioned conflict-based anxiety model. *Behavioural Brain Research*, 302 200–212, 2016.

DE LEO V, MORGANTE G, PIOMBONI P, MUSACCHIO MC, PETRAGLIA F, CIANCI A. Evaluation of effects of an oral contraceptive containing ethinylestradiol combined with drospirenone on adrenal steroidogenesis in hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 88(1):113–117, 2007.

DEECHER D, ANDREE TH, SLOAN D, SCHECHTER LE. From menarche to menopause: Exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. *Psychoneuroendocrinology*, 33(1):3–17, 2008.

DEIS R, LEGUIZAMON E, JAHN G. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *J. Endocrinol*, 120 37–43, 1989.

DEVINE PJ, SIPES IG, HOYER PB. Effect of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Dosing in Rats on GSH Levels in Liver and Ovaries. *Toxicological sciences*, 62 315–320, 2001.

DI S, MALCHER-LOPES R, HALMOS KC, TASKER JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23 4850–4857, 2003.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch*, 465(5):601–626, 2013.

DOROVINI-ZIS KM, ZIS AP. Innervation of the zona fasciculata of the human adrenal cortex: a light and electron microscopic study. *J Neural Transm* 84(1-2):75–84, 1991.

DUNCAN GE, KNAPP DJ, CARSON SW, BREESE GR. Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress-and fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 285 579–587, 1998.

EDWARDS AV, JONES CT. The effect of splanchnic nerve section on the sensitivity of the adrenal cortex to adrenocorticotrophin in the calf. *J Physiol (Lond)*, 390 23–31, 1987a.

EDWARDS AV, JONES CT. The effect of splanchnic nerve stimulation on adrenocortical activity in conscious calves. *J Physiol*, 382:385–396, 1987b.

EDWARDS AV, JONES CT, BLOOM SR. Reduced adrenal cortical sensitivity to ACTH in lambs with cut splanchnic nerves. *J Endocrinol* 110:81–85, 1986.

ELMAN I, BREIER A. Effects of acute metabolic stress on plasma progesterone and testosterone in male subjects: relationship to pituitary-adrenocortical axis activation. *Life Sci*, 61 1705–1712, 1997.

ENGELAND W.C. Functional Innervation of the Adrenal Cortex by the Splanchnic Nerve. *Horm. Metab. Res*, 30 311–314, 1998.

ENGELAND WC, GANN DS. Splanchnic nerve stimulation modulates steroid secretion in hypophysectomized dogs. *Neuroendocrinology*, 50 124–131, 1989.

EVANSON NK, TASKER JG, HILL MN, HILLARD CJ, HERMAN JP. Fast Feedback Inhibition of the HPA Axis by Glucocorticoids Is Mediated by Endocannabinoid Signaling. *Endocrinology*, 151 4811–4819, 2010.

FADDY MJ, GOSDEN RG, GOUGEON A, RICHARDSON SJ, NELSON JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, 7(10):1342–1346, 1992.

FAJER AB, HOLZBAUER M, NEWPORT HM. The contribution of adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *J Physiol*, 214(1):115–26, 1971.

FALCONI AM, GOLD EB, JANSSEN I. The Longitudinal Relation of Stress during the Menopausal Transition to Fibrinogen Concentrations: Results from the Study of Women's Health Across the Nation Public Access. v. 23, n. 5, p. 518–527, 2016.

FALCONI AM, GOLD EB, JANSSEN I. The Longitudinal Relation of Stress during the Menopausal Transition to Fibrinogen Concentrations: Results from the Study of Women's Health Across the Nation Public Access. *Menopause*, 23(5): 518–527, 2016.

FAMILARI M, SMITH AI, SMITH R, FUNDER JW. Arginine vasopressin is a much more potent stimulus to ACTH release from ovine anterior pituitary cells than ovine corticotropin-releasing factor 1. In vitro studies. *Neuroendocrinology*, 50(2):152-157, 1989.

FARNHAM AM. Uterine Disease as a Factor in the Production of Insanity. *Alienist and Neurologist (1880-1920)*, 8(4):532, 1887.

FENSKE M. Adrenal function in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): influence of confinement stress upon glucocorticoid, progesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and androstenedione plasma levels, adrenal content and in-vitro secretion. *Exp Clin Endocrinol* 87(1):15–25, 1986.

FERNÁNDEZ-GUASTI A, PICAZO O. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37(1):77-81. 1990.

FERREIRA LB, CRISTINA DE NICOLA A, ANSELMO-FRANCI JA, CÁSSIA R, DORNELLES M. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. *Experimental Gerontology*, 72 157–161, 2015.

FIGUEIREDO HF, ULRICH-LAI YM, CHOI DC, HERMAN JP. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 E1173–E1182, 2007.

FIGUEIREDO HF, DOLGAS CM, HERMAN JP. Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus. *Endocrinology*, 143(7):2534–2540 2002.

FREEMAN EW, SAMMEL MD, LIN H, NELSON DB. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. *Archives of general psychiatry*, 63(4):375–382, 2006.

FRITZ MA, SPEROFF L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. *Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins*, book 1488pgs, 2011.

FRYE CA. Progestin influence motivation, reward, conditioning, stress and/or response to drug of abuse. *Pharmacol Biochem Behav*, 86(2):209–19, 2007.

FURUTA M, FUKUSHIMA, A, CHIBA, S, SANO, A, AKEMA, T, KIMURA, F, FUNABASHI, T. Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. *NeuroReport*, 21(11):777–781, 2010.

GASKIN JH, KITAY JI. Adrenocortical function in the hamster. Sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology*, 87(4):779-86, 1970.

GASPARD UJ, ROMUS MA, GILLAIN D, DUVIVIER J, DEMEYPOUSART E, FRANCHIMONT P. Plasma-hormone levels in women receiving new oral-contraceptives containing ethinyl estradiol plus levonorgestrel or desogestrel. *Contraception*, 27(6):577-590, 1983.

GIBBISON B, SPIGA F, WALKER JJ, RUSSELL GM, STEVENSON K, KERSHAW Y, ZHAO Z, HENLEY D, ANGELINI GD, LIGHTMAN SL. Dynamic Pituitary-Adrenal Interactions in Response to Cardiac Surgery. *Crit Care Med*, 43(4):791-800, 2015.

GLAVIN GB, PARE WP, SANDBAK T, BAKKE HK, MURISON R. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*, 18(2):223-249, 1994.

GOLDMAN G, COLEMAN PD. Neuron numbers in locus coeruleus do not change with age in fisher 344 rat. *Neurobiology of Aging*, 2(1):33-36, 1981.

GOLDSMITH PC, BOGGAN JE, THIND KK. Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Neuroendocrine and Related Neurons of the Pubertal Female Monkey Hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 65(5):325-334, 1997.

GREEN MR, MARCOLIN ML, MCCORMICK CM. The effects of ovarian hormones on stressor-induced hormonal responses, glucocorticoidreceptor expression and translocation, and genes related to receptor signaling in adult femalerats. *Stress*, 21(2):90-100, 2018.

GUÉRIN E, BIAGÉ A, GOLDFIELD G, PRUD'HOMME D. Physical activity and perceptions of stress during the menopause transition: A longitudinal study. *Journal of Health Psychology*, DOI: 10.1177/1359105316683787, 2017.

GUERRA-ARAIZA C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *Journal of neuroendocrinology*, 15(10):984-990, 2003.

HAAS DA, GEORGE SR. Estradiol or ovariectomy decreases CRF synthesis in hypothalamus. *Brain Res Bull*, 23(3):215-8, 1989.

HAAS DA, GEORGE SR. Gonadal regulation of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in hypothalamus. *Brain Res Bull*, 20(3) 361-367, 1988.

HAIM S, SHAKHAR G, ROSSENE E, TAYLOR AN, BEN-ELIYAHU S. Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5-day estrous cycles in Fischer 344 rats and their stimulation in ovariectomized females. *Journal of Endocrinological Investigation*, 26(10):1013–1022, 2003.

HALE GE, LECTURE CA, BURGER HG. Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*, 23 7–23, 2009.

HANDA RJ, BURGESS LH, KERR JE, O'KEEFE JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav*, 28 464–476, 1994.

HANDA RJ, WEISER MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(2):197–220, 2014a.

HEAP RB, HOLZBAUER M, NEWPORT HM. Adrenal secretion rates of C-19 and C-21 steroids before and after hypophysectomy in the pig and the dog. *J. Endocr*, 36 159–176, 1966.

HELENA CV, GUSTAFSSON JA, KORACH K, PFAFF D, ANSELMO-FRANCI JÁ, OGAWA S. Effects of estrogen receptor α and β gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the locus coeruleus in female mice. *Endocrine*, 36(1):169–177, 2009.

HELENA CV, POLETINI M, SANVITTO GL, HAYASHI S, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA. Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 188 155–165, 2006.

HELENA CVV, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Research*, 955(1–2):245–252, 2002.

HELLMAN L, Yoshida K, Zumoff B, Levin J, Kream J, Fukushima DK. The effect of medroxyprogesterone acetate on the pituitary-adrenal axis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 42(5):912–917, 1976.

HERMAN JP, CULLINAN WE, ZIEGLER DR, TASKER JG. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci*, 16 381–385, 2002

HERMAN JP. Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol*, 13(4):349–72, 1993.

HERMAN M, JESSICA M, GHOSAL S, KOPP B, WULSIN A, MAKINSON R, SCHEIMANN J, MYERS B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2):603–621, 2016.

HERRERA AY, NIELSEN SE, MATHER M. Stress-induced increases in progesterone and cortisol in naturally cycling women. *Neurobiology of Stress*, 3 96-104, 2016.

HESS G, RIEGLE G. ADRENOCORTICOL RESPONSIVENESS TO STRESS AND ACTH IN AGING RATS. *J GERONTOL*, 25 354, 1970.

HINSON JP. Paracrine control of adrenocortical function: A new role for the medulla? *Journal of Endocrinology*, 124(1):7–9, 1990.

HOYER PB, DEVINE PJ, HU X, THOMPSON KE, GLENN IS. Ovarian Toxicity of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide: A Mechanistic Model. *Toxicologic pathology*, 29(1):91–99, 2001.

IDA Y, TANAKA M, TSUDA A, KOHNO Y, HOAKI Y, NAKAGAWA R, IIMORI K, NAGASAKI N. Recovery of stress-induced increases in noradrenaline turnover is delayed in specific brain regions of old rats. *Life Sci*, 34(24):2357-63, 1984.

INAYAT K, DANISH N, HASSAN L. Symptoms of menopause in peri and postmenopausal women and their attitude towards them. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 29(3):477–80, 2017.

ITOI K, SUDA T, TOZAWA F, DOBASHI I, OHMORI N, SAKAI Y, ABE K, DEMURA H. Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. *Endocrinology*, 135(5):2177–2182, 1994.

JACOBSON L, MUGLIA LJ, WENINGER SC, PACAK K, MAJZOUN JA. CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors. *Neuroendocrinology*. 71 79–87, 2000.

JANES SB, BYLUND DB, RIESER CA, SHEKIM WO, BYER JA, CARR GW. α_2 - Receptor binding in human platelets: alterations during the menstrual cycle. *Clin Pharmacol Ther*, 34 90-96, 1983.

JASPER MS, ENGELAND WC. Splanchnicotomy increases adrenal sensitivity to ACTH in nonstressed rats. *Am J Physiol*, 273 E363–E368, 1997.

JAX® NOTESTM. A hormonally relevant model for human menopause. Disponível em: <<https://www.jax.org/news-and-insights/2005/january/a-hormonally-relevant-model-for-human-menopause>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

JONES JR, DELROSARIO L, SORIERO AA. Adrenal function in patients receiving medroxyprogesterone acetate. *Contraception*, 10(1):1–12, 1974.

KAJANTIE E, PHILLIPS DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 31 151–178, 2006.

KALÁSZ J, TÓTH EP, BÓDI B, FAGYAS M, TÓTH A, PAL BH, VARI SG, BALOG M, BLAŽETIĆ S, HEFFER M, PAPP Z, BORBÉLY A. Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats. *Croat Med J*. 55(3):239-49, 2014.

KALIL B, LEITE CM, CARVALHO-LIMA M, ANSELMO-FRANCI JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*, 16(4):452–460, 2013.

KAUFMAN H, VADASZ C, LAJTHA A. Effects of estradiol and dexamethasone on choline acetyltransferase activity in various rat brain regions. *Brain Res*; 453 389-392, 1988.

KELLER-WOOD, M. ACTH responses to hypotension and feedback inhibition of ACTH increased by chronic progesterone treatment. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(1)R81-R87, 1998.

KERMATH BA, GORE AC. Neuroendocrine control of the transition to reproductive Neuroendocrinology senescence: Lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinology*, 96(1):1–12, 2012.

KIRSCHBAUM C, KUDIELKA BM, GAAB J, SCHOMMER NC, HELLHAMMER DH. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom. Med*, 61 154-162, 1999.

KITAY JI. Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadaltormone replacement. *Endocrinology*, 73 253-60, 1963.

KOEBELE SV, BIMONTE-NELSON HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, 87 5–17, 2016.

KOMESAROFF PA. Estrogen Supplementation Attenuates Glucocorticoid and Catecholamine Responses to Mental Stress in Perimenopausal Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(2):606–610, 1999.

KOVÁCS KJ. c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4):287–297, 1998.

KUDIELKA BM, SCHMIDT-REINWALD AK, HELLHAMMER DH, KIRSCHBAUM C. Psychological and endocrine responses to psychosocial stress and Dex-CRF in healthy postmenopausal women and young controls: the impact of age and two-week estradiol treatment. *Neuroendocrinology*, 70 422–430, 1999.

LAFLAMME N, NAPPI RE, DROLET G, LABRIE C, RIVEST S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of neurobiology*, 36(3):357–378, 1998.

LANG I, ZIELINSKI CC, TEMPL H, SPONA J, GEYER G. Medroxyprogesterone acetate lowers plasma corticotropin and cortisol but does not suppress anterior pituitary responsiveness to human corticotropin releasing factor. *Cancer*, 66(9):1949–1953, 1990.

LARKIN JW, BINKS SL, LI Y, SELVAGE D. The role of oestradiol in sexually dimorphic hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to intracerebroventricular ethanol administration in the rat. *J Neuroendocrinol*, 22 24–32, 2010.

LAUGHLIN GA, BARRETT-CONNOR E. Sexual dimorphism in the influence of advanced aging on adrenal hormone levels: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 3561–8, 2000.

LESNIEWSKA B, Nowak M, Malendowicz LK. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol-replaced rats. *Horm. Metab. Res.* 22(7):378–381, 1990.

LIMA FB, LEITE CM, BETHEA CL, ANSELMO-FRANCI JA. Progesterone increased β -endorphin innervation of the locus coeruleus, but ovarian steroids had no effect on noradrenergic neurodegeneration. *Brain Research*, 1663 1–8, 2017.

LINDHEIM SR, LEGRO RS, BERNSTEIN L, et al. Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *Am J Obstet Gynecol*, 167 1831–1836, 1992.

LOUW-DU TOIT R, PERKINS MS, SNOEP JL, STORBECK KH, AFRICANDER D. Fourth generation Progestins Inhibit β 3hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and Modulate the Biosynthesis of Endogenous Steroids. *PLoS One*, 11(10):e0164170, 2016.

LOUW-DU TOIT R, STORBECK KH, CARTWRIGHT M, CABRAL A, AFRICANDER D. Progestins used in endocrine therapy and the implications for the biosynthesis and metabolism of endogenous steroid hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441 () 31-45, 2017.

LOVICK, T. A. Estrous cycle and stress: Influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4):314–320, 2012.

LU KH, HOPPER BR, VARGO TM, YEN SSC. Chronological Changes in Sex Steroid, Gonadotropin, and Prolactin Secretion in Aging Female Rats Displaying Different Reproductive States. *Biology of Reproduction*, 21 193–203, 1979.

LUINE VN. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol*, 89 484-490, 1985.

LUND TD, HINDS LR, HANDA RJ. The Androgen 5 α -Dihydrotestosterone and Its Metabolite 5 α -Androstan-3 β , 17 β -Diol Inhibit the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Response to Stress by Acting through Estrogen Receptor β -Expressing Neurons in the Hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 26(5):1448–1456, 2006.

MAKARA GB, STARK E, KÁRTESZI M, PALKOVITS M, RAPPAY G . Effects of paraventricular lesions on stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Am J Physiol*, 240(4):E441-6, 1981

MARK-KAPPELER CJ, SEN N, LUKEFAHR A, MCKEE L, SIPES IG, KONHILAS J, HOYER PB. Inhibition of Ovarian KIT Phosphorylation by the Ovotoxicant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Rats. *Biology of reproduction*, 85 755–762, 2011.

MARTINS-AFFÉRI MP, FERREIRA-SILVA IA, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA. LHRH release depends on Locus Coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. *Brain Research Bulletin*, 61(5):521–527, 2003.

MATT DW, LEE J, SARVER PL, JUDD HL, LU JKH. Chronological Changes in Fertility, Fecundity and Steroid Hormone Secretion during Consecutive Pregnancies in Aging Rats'. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 34 478–487, 1986.

MATTHEWS KA, BROMBERGER JT. Does the menopausal transition affect health-related quality of life? *American Journal of Medicine*, 118 Suppl 12B:25-36, 2005.

MCCABE, PM, PORGES SW, CARTER CS. Heart period variability during estrogen exposure and withdrawal in female rats. *Physiol Behav*, 26 535-538, 1981.

MCCALL JG, BHATTI DL, LAWSON LA, MCELLIGOTT ZA, STUBER GD, BRUCHAS MR. Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife*, 6 e18247, 2017.

MCCALL JG, AL-HASANI R, SIUDA ER, HONG DY, NORRIS AJ, FORD CP, BRUCHAS MR. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron*. 87(3):605-20, 2015.

MICEVYCH P, SINCHAK K. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1-2): 44–50, 2008.

MORILAK DA, BARRERA G, ECHEVARRIA DJ, GARCIA AS, HERNANDEZ A, MA S, PETRE CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8):1214–1224, 2005.

MORITA T, LATIFPOUR J, O'HOLLAREN B, WHEELER MA, WEISS RM. Sex differences in function and distribution of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ adrenoceptors in rabbit urethra. *Am J Physiol*, 252:F1124-1128, 1987

MUNABI AK, CASSORLA FG, PFEIFFER DG, ALBERTSON BD, LORIAUX DL. The effects of estradiol and progesterone on rat ovarian 17-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Steroids*, 41(1):95–98, 1983.

MUNCK A, GUYRE PM, HOLBROOK NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 5(1):25–44, 1984.

MURAKAMI K, NAKAGAWA T, SHOZU M, UCHIDE K, KOIKE K, INOUE M. Changes with aging of steroidal levels in the cerebrospinal fluid of women. *Maturitas*, 33 71–80, 1999.

MURRAY CJL, BARBER RM, FOREMAN KJ, OZGOREN AA. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: Quantifying the epidemiological transition. *The Lancet*, 386(10009):2145–2191, 2015.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in f344/n rats and b6c3f1 mice (dermal studies), 1989.

NEQUIN LG, ALVAREZ JA, CAMPBELL CS. Alterations in steroids and gonadotropin release resulting from surgical stress during the morning of proestrus in 5-day cyclic rats. *Endocrinology*, 97(3):718–24, 1975.

NICOLA AC, LEITE CM, NISHIKAVA MMB, DE CASTRO JCB, ANSELMO-FRANCI JA, DORNELLES RCM. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. *Experimental Gerontology*, 81 19–27, 2016.

NICOLAIDES NC, KYRATZI E, LAMPROKOSTOPOULOU A, CHROUSOS GP, CHARMANDARI E. Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1–2):6–19, 2015.

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. *Molecular brain research*, 109(1–2):84–94, 2002.

NUMAN M, ROACH JK, DEL CERRO MCR, GUILLAMÓN A, SEGOVIA S, SHEEHAN TP, NUMAN MJ. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Research*, 830(2):358–371, 1999.

OLPE HR, STEINMANN MW. Age-related decline in the activity of noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Research*, 251(1):174–176, 1982.

OLSSON SE, ODLIND V, HAMMOND G. Plasma levels of cortisol and corticosteroid binding globulin during use of norplantr-2 implants. *Contraception*, 35(4):353–361, 1987.

OLVERA-HERNÁNDEZ S, CHAVIRA R, FERNÁNDEZ-GUASTI A. Sex- and endocrine-stage-differences in middle-aged rats in an animal model of OCD. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 44 81–87, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Investigaciones sobre la menopausa en los anos noventa. OMS, Série de informes técnicos, 1996.

OVERTURF MD, OVERTURF CL, CARTY DR, HALA D, HUGGETT DB. Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquatic Toxicology*, 148 152–161, 2014.

OWENS JF, STONEY CM, AND MATTHEWS KA. Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. *Circulation*, 88 2794–2802, 1993.

OYOLA MG, HANDA RJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*, 20(5):476–494, 2017.

PACÁK K, PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22(4):502–548, 2001.

PAPALEO C, CARELLA C, ZITO GA, FIGLIA A, CAPUANO F, AMATO G. ACTH and cortisol plasma levels in cancer patients treated with medroxyprogesterone acetate at high dosages. *Chemioterapia*, 3(4):220–222, 1984.

PATCHEV VK, HAYASHI S, ORIKASA C, ALMEIDA OF. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(5):419–23, 1995.

PAUL SPR. Neuroactive Steroids. *The FASEB Journal*, 6(6):2311–2322, 1992.

PESTANA-OLIVEIRA N, KALIL B, LEITE CM, OLIVEIRA R, CAROLINO G, DEBARBA LK, LEICO L, ELIAS K, ANTUNES-RODRIGUES J, ANSELMO-FRANCI J. Effects of estrogen therapy on the serotonergic system in an animal model of perimenopause induced by 4-vinylcyclohexen diepoxide (VCD). *ENeuro*, 5(1):0247–17, 2018.

PIGNATELLI D, XIAO F, GOUVEIA AM, FERREIRA JG, VINSON GP. Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology*, 191(1):301–308, 2006.

PLAS-ROSER S, ARON C. Stress related effects in the control of sexual receptivity and in the secretion of progesterone by the adrenals in cyclic female rats. *Physiol Behav*, 27(2):261–4, 1981.

PRIDJIAN G, SCHMIT V, SCHREIBER J. Medroxyprogesterone acetate: receptor binding and correlated effects on steroidogenesis in rat granulosa cells. *J. Steroid Biochem*, 26 313–319, 1987.

PRIOR JC. Perimenopause: The complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocrine Reviews*, 19(4):397–428, 1998.

PRIOR JC. The endocrinology of perimenopause: need for a paradigm shift Jerilynn C Prior, Christine L Hitchcock. *Frontiers in Bioscience*, 474–486, 2011.

PURDY RH, MORROW AL, MOORE PH, PAUL SM. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10):4553–4557, 1991.

PURNELL JQ, BRANDON DD, ISABELLE LM, LORIAUX DL, SAMUELS MH. Association of 24-hour cortisol production rates, cortisol-binding globulin, and plasma-free cortisol levels with body composition, leptin levels, and aging in adult men and women. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 281–287, 2004.

REHMAN HU, MASSON EA. Neuroendocrinology of female aging. *Gender Medicine*, 2(1): 41–56, 2005.

REIS FMCV, PESTANA-OLIVEIRA N, LEITE CM, LIMA FB, BRANDÃO ML, GRAEFF FG, DEL-BEN CM, ANSELMO-FRANCI JA. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 49(1):130–140, 2014.

RIVIER CL, PLOTSKY PM. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohypophysial hormone secretion. *Annual review of physiology*, 48 475–494, 1986.

ROMANO GJ, KRUST A, PFAFF DW. Expression and Estrogen Regulation of Progesterone Receptor mRNA in Neurons of the Mediobasal Hypothalamus: An in Situ Hybridization Study. *Molecular Endocrinology*, 3(8):1295–1300, 1989.

ROMEO RD, KARATSOREOS IN, MCEWEN BS. Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm. Behav*, 50 463–468, 2006.

Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology*, 80 387–393, 2004.

ROMEO RD, BELLANI R, MCEWEN BS. Stress-induced progesterone secretion and progesterone receptor immunoreactivity in the paraventricular nucleus are modulated by pubertal development in male rats. *Stress*, 8(4):265–271, 2005.

ROY BN, REID RL, VAN VUGT DA. The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology*, 140(5):2191–8, 1999.

SALEH CM, CONNELL BJ, AND SALEH TM. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res*, 879 105–114, 2000.

SALEH TM, CONNELL BJ. Estrogen-induced autonomic effects are mediated by NMDA and GABA_A receptors in the parabrachial nucleus. *Brain Res*. 973 161–170, 2003.

SANTORO N, BROWN JR, ADEL T, SKURNICK JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(4):1495–1501, 1996.

SANTORO N. Perimenopause: From Research to Practice. *Journal of Women's Health*, 25(4):332–339, 2016.

SAPOLSKY R, KREY L, MCEWEN B. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol* 18:55, 1983.

SAPOLSKY R, KREY L, MCEWEN B. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc natl Acad Sci USA*, 81:6174, 1984.

SAPOLSKY RM, KREY LC, MCEWEN BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 7 284–301, 1986.

SAPOLSKY RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging*, 13 171–174, 1991.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 205(3):260–272, 1982a.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Research Reviews*, 4(3):275-325, 1982b.

SCHAEFFER C, ARON C. Stress-related effects on the secretion of progesterone by the adrenals in castrated male rats presented to stimulus males. Involvement of oestrogen. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 114(3):440–5, 1987.

SCHAEFFER C, CHABLI A, ARON C. Endogenous progesterone and lordosis behavior in male rats given estrogen alone. *J Steroid Biochem*, 25(1):99-102, 1986.

SCHMIDT PJ, HAQ N, RUBINOW DR. A longitudinal evaluation of the relationship between reproductive status and mood in perimenopausal women. *The American journal of psychiatry*, 161(12):2238–2244, 2004.

SCHOTT-BAER D, KOTAL B. Frequency and effectiveness of self-care actions and menopause symptoms of middle-aged working women. *Research for practice*, 9(6), 2000.

SEALE JV, WOOD SA, ATKINSON HC, HARBUZ MS, LIGHTMAN SL. Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J. Neuroendocrinol*, 16(12):989-98, 2004.

SEEMAN TE, SINGER B, WILKINSON CW, MCEWEN B. Gender differences in age-related changes in HPA axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 26 225–240, 2001.

SELYE H, TUCHWEBER B. Stress in relation to aging and disease. in: Everitt A, Burgess J (eds) *Hypothalamus, Pituitary and Aging*, Charles C Thomas, Springfield, IL, pp 557-573, 1976.

SEROVA L, NAKASHIMA A, SABBAN L. Estradiol Stimulates Gene Expression of Norepinephrine Biosynthetic Enzymes in Rat Locus coeruleus. *Neuroendocrinology*, 10595 193–200, 2002.

SHOCK N. Systems integration. In: Finch C, Hayflick L (eds) *Handbook of the Biology of Aging*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1977.

SHORT R. The secretion of sex hormones by the adrenal gland. *Biochem. Soc. Symp*, 18 59-84, 1960.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *Journal of ComparativeNeurology*, 388(4):507–525, 1997.

SIMERLY RB, CARR AM, ZEE MC, LORANG D. Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 8(1):45–56, 1996.

SITA A, MILLER SB. Estradiol, progesterone and cardiovascular responses to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 21: 339–346, 1996.

SOLOMON MB, LOFTSPRING M, DE KLOET AD, GHOSAL S, JANKORD R, FLAK JN, et al. Neuroendocrine Function After Hypothalamic Depletion of Glucocorticoid Receptors in Male and Female Mice. *Endocrinology*, 156 2843–2853, 2015.

SPRINGER LN, FLAWS JA, SIPES IG, HOYER PB. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reproductive Toxicology*, 10(2):137–143, 1996.

SU HI, FREEMAN EW. Hormone changes associated with the menopausal transition. *Minerva Ginecologica*, 61(6):483–489, 2009.

SUDHIR K, ELSER MD, JENNINGS GL, KOMESAROFF PA. Estrogen supplementation decreases norepinephrine-induced vasoconstriction and total body norepinephrine spillover in perimenopausal women. *Hypertension*, 30(6):1538–43, 1997.

SUZUKI S, HANDA RJ. Estrogen receptor- β , but not estrogen receptor- α , is expressed in prolactin neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nuclei: Comparison with other neuropeptides. *Journal of Comparative Neurology*, 484(1):28–42, 2005.

SUZUKI S, HANDA RJ. Regulation of estrogen receptor-beta expression in the female rat hypothalamus: differential effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology*, 145(8):3658–3670, 2004.

SZAWKA RE, RODOVALHO GV, MONTEIRO PM, CARRER HF, ANSELMO-FRANCI JA. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: Involvement in luteinising hormone regulation. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(7):629–639, 2009.

SZAWKA RE, POLETINI MO, LEITE CM, BERNUCI MP, KALIL B, MENDONÇA LBD, CAROLINO ROG, HELENA CVV, BERTRAM R, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. *Endocrinology*, 154(1):363–374, 2013.

TE VELDE ER, SCHEFFER GJ, DORLAND M, BROEKMANS FJ, FAUSER BCJM. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145 67–73, 1998.

THOMAS A, SHUGHRUE PJ, MERCHENTHALER I, AMICO JA. The effects of progesterone on oxytocin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the female rat can be altered by the administration of diazepam or RU486. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 11, n. 2, p. 137–144, 24 dez. 1999.

TOIT RL Du, PERKINS MS, SNOEP JL, STORBECK KH, AFRICANDER D. Fourth-generation progestins inhibit 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and modulate the biosynthesis of endogenous steroids. *PLoS ONE*, 11(10):e0164170, 2016.

TOPPOZADA MK, RAMADAN M, EL-SAWI M, MEHANNA MT, KHAMIS Y, MARZOUK S. Effect of Norplant implants on the pituitary-adrenal axis function and reserve capacity. *Contraception*, 55 7-10, 1997.

TRASLAVIÑA GA, FRANCI CR. The CRH-R1 receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. *Brain Res* 1421:11–19, 2011.

TWISS JJ, WEGNER J, HUNTER M, KELSAY M, RATHE-HART M, SALADO W. Perimenopausal symptoms, quality of life, and health behaviors in users and nonusers of hormone therapy. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 19(11): 602–613, 2007.

ULRICH-LAI YM, ENGELAND WC. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology*, 76 79–92, 2002.

UNGERSTEDT U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, 367 1-48, 1971.

VAHL TP, ULRICH-LAI YM, OSTRANDER MM, DOLGAS CM, ELFERS EE, SEELEY RJ, D'ALESSIO DA, HERMAN JP, OSTRANDER MM. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289 E823–E828 2005.

VALENTINO RJ, VAN BOCKSTAELE E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3):194-203, 2008.

VALENTINO RJ, FOOTE SL, ASTON-JONES G. Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Research*, 270 363–367, 1983.

VAN VEELLEN H, WILLEMSE PHB, SLEIJFER DT, PRATT JJ, SLUITER WJ, DOORENBOS H. Adrenal suppression by oral high-dose medroxyprogesterone acetate in breast cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 12(2):83–86, 1984.

VIAU VJ, MEANEY MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, 129(5):2503-11, 1991.

WEISER MJ, HANDA RJ. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159(2):883–895, 2009.

WEISER MJ, WU TJ, HANDA RJ. Estrogen receptor- β agonist diarylpropionitrile: Biological activities of R- And S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress. *Endocrinology*, 150(4):1817–1825, 2009.

WELSH TH, JONHSON BH. Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone and testosterone in bulls. *Endocrinology*, 109(1):185–90, 1981.

WIEGRATZ I, KUTSCHERA E, LEE JH, MOORE C, MELLINGER U, WINKLER UH, KUHL H. Effect of four oral contraceptives on thyroid hormones, adrenal and blood pressure parameters. *Contraception*, 67(5):361–366, 2003.

WIEGRATZ I, KUHL H. Effect of Two Oral Contraceptives Binding Proteins. *Endocrinology And Metabolism*, 7824(95):1–6, 1995.

WILKINSON CW, PESKIND ER, RASKIND MA. Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity to cortisol feedback inhibition in human aging. *Neuroendocrinology*, 65 79–90, 1997.

WILKINSON CW, PETRIE EC, MURRAY SR, COLASURDO EA, RASKIND MA, PESKIND ER. Human glucocorticoid feedback inhibition is reduced in older individuals: evening study. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 545–550, 2001.

WISE PM, SMITH MJ, DUBAL DB, WILSON ME, RAU SW, et al. Neuroendocrine Modulation and Repercussions of Female Reproductive Aging. *The Endocrine Society*, 57 235-256, 2002.

WOODS NF, CRAY L, MITCHELL ES, HERTING JR. Endocrine biomarkers and symptom clusters during the menopausal transition and early postmenopause: Observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Menopause*, 21(6):646–652, 2014.

WOODS NF, CARR MC, TAO EY, TAYLOR HJ, MITCHELL ES. Increased urinary cortisol levels during the menopausal transition. *Menopause*, 13(2):212–21, 2006.

WOODS NF, MITCHELL ES, PERCIVAL DB, SMITH-DIJULIO K. Is the menopausal transition stressful? Observations of perceived stress from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Menopause*, 16(1):90–7, 2009.

WOODS NF, MITCHELL ES. Symptom interference with work and relationships during the menopausal transition and early postmenopause. *Menopause*, 18(6):654–661, 2011.

WOODS NF, MITCHELL ES. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. *The American Journal of Medicine*, 118(12B):14S–24S, 2005.

YEN SS, LAUGHLIN GA. Aging and the adrenal cortex. *Exp Gerontol*, 33 897–910, 1998.

YEN JY, YANG MS, WANG MH, LAI CY, FANG MS. The associations between menopausal syndrome and depression during pre-, peri-, and postmenopausal period among Taiwanese female aborigines: Regular Article. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 63(5):678–684, 2009.

ZIEGLER DR, CASS WA, HERMAN JP. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol*, 11(5):361-9, 1999.