UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NATHÁLIA DE AZEVEDO CAMIN

Controle do sistema de estresse em ratas Wistar adultas submetidas ao bloqueio dos receptores mineralocorticoide ou glicocorticoide após estresse na pré-puberdade

Ribeirão Preto
2016

NATHÁLIA DE AZEVEDO CAMIN

Controle do sistema de estresse em ratas Wistar adultas submetidas ao bloqueio dos receptores mineralocorticoide ou glicocorticoide após estresse na pré-puberdade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Ribeirão Preto
2016

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.

Camin, Nathália de Azevedo

Controle do sistema de estresse em ratas Wistar adultas submetidas ao bloqueio dos receptores mineralocorticoide ou glicocorticoide após estresse na pré-puberdade. Ribeirão Preto, 2016.

54 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Franci, Celso Rodrigues.

1. Espironolactona 2. RU-486. 3. Corticosterona. 4. CRH. 5. Adolescência.

Nome: CAMIN, Nathália de Azevedo

Título: Controle do sistema de estresse em ratas Wistar adultas submetidas ao bloqueio dos receptores mineralocorticoide ou glicocorticoide após estresse na pré-puberdade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre
Área de Concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci Instituição: Universidade de São Paulo
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues Instituição: Universidade de São Paulo
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.ª Dr.ª Fernanda Klein Marcondes Instituição: Universidade Estadual de Campinas
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus por seu amor incondicional. Pela força, aprendizado e por proporcionar meu querer em tentar sempre me tornar uma pessoa melhor. Da mesma forma, o dedico à Ana, minha mãe, por todo seu amor, apoio e compreensão. Sua fortaleza, palavras e ânimo me fizeram chegar até aqui. Igualmente, o dedico ao Leonardo, meu companheiro, amor, alicerce, braços, coração e ouvidos. Por acompanhar toda a trajetória deste trabalho e sempre me lembrar em persistir. Resultante dessas motivações, transparece toda dedicação e afeição presente nesta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, essência e alicerce da minha vida. Por nessa etapa, ter me ensinado que não sou ser, sem viver nos pilares da fé, esperança e amor. E que sem dúvida, o maior e mais importante deles é o amor. O que recebo Dele e que tento distribuir aos que me rodeiam. Fazer as coisas com amor, sem dúvida foi meu maior aprendizado. Quando fazemos algo com amor, espalhando tal sentimento, mesmo para aqueles que não retribuem, tudo se torna mais leve e fácil. Tanto que nos enche, de tal forma que dificuldades são apenas pequenos problemas e, as pessoas, com suas importantes opiniões, não te afetam porque não há mais espaço para ser preenchido. Esse entendimento, muitas vezes no dia-a-dia, ainda tem me faltado, mas eu tenho aprendido e tenho muito a aprender. Obrigada por seu amor e proteção.

Da mesma maneira, agradeço à minha mãe, Ana, que de todas as formas têm me apoiado. Por se preocupar com cada dificuldade e proferir palavras de auxílio e ânimo. Sem ela, não teria chegado à esta etapa profissional e espero sempre corresponder às suas expectativas. É com muito amor que te dedico esta e todas as outras conquistas da minha vida. Não tenho outra mensagem a não ser te agradecer por tudo. Igualmente, expresso estas palavras e meus agradecimentos ao meu pai, Plácido (*in memoriam*). Guardo comigo suas lembranças e seu amor. Sei que sempre estará comigo e olhando por mim.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Celso Rodrigues Franci, por todo o direcionamento neste trabalho e por me proporcionar aprendizado e crescimento profissional. Sou muito grata a ele por ter aberto as portas de seu laboratório, ter acreditado e me confiado esta oportunidade em ser sua aluna. Espero ter correspondido às suas expectativas. Adquiri novos conhecimentos em uma área na qual era completamente inexperiente e isso foi extremamente importante para minha construção profissional. Conquistei um pouco mais de maturidade, segurança e paciência, características que ao meu ver são essenciais na carreira científica. Muito obrigada por ter contribuído tanto em minha formação.

Aos membros da banca examinadora, Dr. José Antunes Rodrigues e Dr.ª Fernanda Klein Marcondes pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, e ao Departamento de Fisiologia pela oportunidade proporcionada assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

A todos os integrantes do Laboratório de Neuroendocrinologia e Reprodução. Em especial à Marina não apenas pelo apoio técnico e por transmitir seus ensinamentos e experiência, mas também por sua amizade e colaboração. Igualmente, ao Guillermo e Procópio, que foram essenciais contribuindo com seu conhecimento e ajuda no desenvolvimento deste projeto. Sou imensamente grata. Sem o auxílio de vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Dr. José Antunes Rodrigues e à Dra. Lucila Leico Kagohara Elias por possibilitarem a realização dos experimentos comportamentais em seu laboratório, meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Daniela Gerardin, primeira mentora, e quem considero como "mãe científica". Tenho muito orgulho em dizer que fui sua aluna, pois essa professora, que representa todo o significado que essa palavra tem, me ensinou conceitos que eu carrego comigo para a minha vida. Ainda hoje colho os frutos do trabalho em seu laboratório, mas não só por isso sou grata. E sim, por me mostrar como ter um olhar crítico sobre as coisas, a ser mais objetiva, resolver sozinha as adversidades que encontrar no caminho da minha pesquisa (pois sempre surgirão). Enfim, me proporcionou todo o suporte para estar pronta para realmente iniciar a carreira acadêmica, o mestrado. Mesmo se não havia tempo, ele se tornava secundário quando me surgiam dúvidas e lhe agradeço, pois esses momentos foram o que mais me fizeram aprender e admirá-la. Te agradeço por aflorar em mim o respeito, esforço, coletividade e sobretudo, a dedicação, que é o seu sobrenome. Muito obrigada.

Às minhas grandes amigas Cíntia, Caroline, Alice e Gláucia. Obrigada por todo carinho, consideração, apoio e, principalmente, compreensão. Sinto muito orgulho por ter construído essa amizade tão verdadeira pois não é fácil manter a sintonia e o companheirismo mesmo com o tempo e a distância. Vocês são muito especiais para mim.

Quero agradecer a toda a minha família. Margarida e Joaquim, meus queridos tios e padrinhos, ou melhor meus segundos pais, muito obrigada por tudo que vocês fazem por mim. Vocês são minha base e meus exemplos de vida. Kellen, obrigada por ser minha irmã mais velha, sempre me ensinar, aconselhar, ser companheira, divertir e por sempre me apoiar. Meus

sobrinhos, Lorena e Diego, tão pequenos, mas que me movem e despertam em mim sempre o melhor. Amo muito vocês todos!

Ademais, gostaria de agradecer ao Leonardo, meu amor. Na verdade nem consigo ter palavras para expressar toda a minha gratidão e tudo o que eu sinto. Você entrou na minha vida pra me ensinar a amar de verdade. A mostrar o real significado da palavra companheirismo. Ainda, sentimentos como cuidado, proteção, carinho, amizade... Tento todos os dias retribuí-los para quem sabe um dia ser digna de te merecer. Parece ser tão pouco resumir todas essas emoções, mas o sentimento que melhor expressa, com toda a força do seu significado, é o amor que sinto por você.

Meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte desta conquista e fazem parte da minha vida. Muito obrigada!

"Abra seus braços para mudanças, mas não abra mão de seus valores".

Dalai Lama

RESUMO

CAMIN, N. A. **Controle do sistema de estresse em ratas Wistar adultas submetidas ao bloqueio dos receptores mineralocorticoide ou glicocorticoide após estresse na pré-puberdade**. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A adolescência é um período crítico para o desenvolvimento dos indivíduos. Durante esta fase várias estruturas cerebrais responsáveis pelo controle das respostas estressoras atingem sua maturidade. Assim, estressores agudos ou crônicos podem repercutir negativamente e alterar a resposta de estresse bem como o comportamento na vida adulta. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) integra o sistema do estresse, cujo controle inibitório está regulado pelos glicocorticoides, os quais agem em receptores dos tipos mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR). É desconhecido o papel destes receptores nos efeitos de longa duração induzidos pelo estresse na pré-puberdade em modelos animais. O objetivo deste trabalho foi verificar se o bloqueio dos receptores MR ou GR após o estresse na pré-puberdade previne suas alterações sobre o comportamento exploratório e o controle do eixo HPA, em ratas adultas. Desta forma, ratas pré-púberes, com 26 dias de idade, foram submetidas a uma ou sete sessões diárias de contenção e, em seguida, à administração dos antagonistas MR (Espironolactona) ou GR (RU-486). Na fase adulta, aos 60 dias de idade, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado e, no dia seguinte, submetidos novamente à contenção, concomitantemente com coleta seriada de sangue para avaliar a resposta do eixo HPA. Subsequentemente, realizou-se a perfusão do cérebro assim como a coleta das adrenais e timo. Efetuou-se a dosagem de corticosterona por radioimunoensaio e analisou-se a expressão e atividade dos neurônios CRH na região parvocelular medial do núcleo paraventricular do hipotálamo, por imuno-histoquímica. O estresse crônico na pré-puberdade causou redução no peso corporal, atraso na puberdade e diminuição da expressão de CRH e Fos em resposta ao estresse agudo na vida adulta. Não houve efeitos sobre o peso do timo e parâmetros comportamentais. Contudo, RU-486 promoveu aumento da corticosterona e adrenais. O estresse agudo ocasionou avanço da puberdade e associado com RU-486 ou Espironolactona também diminuiu a atividade dos neurônios CRH em resposta ao mesmo estressor na vida adulta. Estes resultados demonstram que a administração de Espironolactona pode ser uma estratégia promissora para atenuar os efeitos centrais a longo prazo decorrentes do estresse agudo na pré-adolescência.

Palavras-chave: Espironolactona. RU-486. Corticosterona. CRH. Adolescência.

ABSTRACT

CAMIN, N. A. **Stress system control in Wistar adult female rats subjected to the blockade of the mineralocorticoid or glucocorticoid receptors after stress in prepuberty**. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Adolescence is a critical period to the individual's development. Several brain structures responsible for the control of stressful responses reach maturity during this phase. Thus, acute or chronic stressors can have a negative effect and alter the stress response as well as behavior in adulthood. The hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) is part of the stress system, whose inhibitory control is regulated by glucocorticoids through mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors. It is unknown the role of these receptors in the long-term effects induced by stress in the prepuberty in animals models. The aim of this study was determine whether MR or GR receptor blockade after stress in prepuberty prevents their changes on exploratory behavior and control of the HPA axis in adult female rats. Thus, prepuberty female rats, at 26 days old, were submitted to one or seven daily restraint sessions followed by administration of MR (Spironolactone) or GR (RU-486) antagonists. In adulthood, at 60 days old, the animals were evaluated in the elevated plus maze. In the next day, they were subject again to restraint concurrently with serial blood sampling to evaluate the HPA axis response. Subsequently, it was performed the brain perfusion as well as the collection of the adrenal glands and thymus. It was conducted the dosage of corticosterone by radioimmunoassay and analyzed the expression and activity of CRH neurons in the medial parvocellular subdivision of the paraventricular nucleus of the hypothalamus by immunohistochemistry. Chronic stress in prepuberty reduced the body weight, delayed the puberty and decreased the CRH and Fos expression in response to acute stress in adulthood. There was no effect on thymus weight and behavioral parameters. However, RU-486 increased the corticosterone secretion and adrenal glands weight. Acute stress caused advancement of puberty and associated with RU-486 or Spironolactone also reduced the activity of CRH neurons in response to the same stressor in adulthood. These results demonstrate that Spironolactone administration may be a promising strategy to attenuate the central long-term effects resulting from acute stress in prepuberty.

Keywords: Spironolactone. RU-486. Corticosterone. CRH. Adolescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do protocolo experimental.....23
Figura 2 – Evolução do peso corporal.....31
Figura 3 – Probabilidade cumulativa da abertura vaginal.....32
Figura 4a – Número de entradas na execução de uma sessão no labirinto em cruz elevado.....33
Figura 4b – Tempo gasto nos braços abertos na execução de uma sessão no labirinto em cruz elevado.....33
Figura 5 – Peso do timo.....34
Figura 6 – Peso das adrenais.....35
Figura 7 – Secreção de corticosterona em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas.....36
Figura 8 – Área sob a curva da secreção de corticosterona em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas.....37
Figura 9a – Expressão de Fos no PVN de ratas adultas em resposta ao estresse por contenção.....38
Figura 9b – Ativação de neurônios CRH no PVN de ratas adultas em resposta ao estresse por contenção.....38
Figura 10 – Fotomicrografias ilustrativas da dupla marcação de Fos-CRH em neurônios da região parvocelular medial (PaMP) do PVN.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Respostas comportamentais de ratas adultas com 60 dias de idade no teste do labirinto em cruz elevado.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AVP	Vasopressina
CA	Califórnia
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAB	Tetracloridrato de 3, 3'-diaminobenzidina
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GR	Receptor glicocorticoide
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
I.P.	Intraperitoneal
I.C.V.	Intracerebroventricular
KPBS	Salina tamponada com fosfato de potássio
LH	Hormônio luteinizante
NIH	National Institutes of Health
NC	Carolina do Norte
MD	Maryland
MR	Receptor mineralocorticoide
mRNA	RNA mensageiro
MPOA	Área preóptica medial
PB	Tampão fosfato
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PR	Receptor de progesterona
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIE	Radioimunoensaio
S.C.	Subcutânea
USP	Universidade de São Paulo
V.O.	Via oral
WI	Wisconsin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVO GERAL 21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
3. MATERIAL E MÉTODOS 22
3.1. ANIMAIS 22
3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 23
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS 24
3.4. PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA PRÉ-PUBERDADE 24
3.4.1. Estresse de contenção 24
3.4.2. Antagonistas dos receptores MR e GR 25
3.4.3. Determinação da abertura vaginal 25
3.5. PROCEDIMENTOS REALIZADOS DURANTE A VIDA ADULTA 25
3.5.1. Ciclo estral 26
3.5.2. Avaliação comportamental 26
3.5.3. Implantação de cateter na jugular 26
3.5.4. Estresse de contenção 27
3.5.5. Coleta de amostras de sangue 27
3.5.6. Coleta de órgãos responsivos ao estresse 28
3.5.7. Imuno-histoquímica 28
3.5.8. Dosagem hormonal por radioimunoensaio (RIE) 29
4. ANÁLISE DOS DADOS 30
5. RESULTADOS 30
5.1. PESO CORPORAL 30
5.2. INÍCIO DA PUBERDADE 31
5.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL 32
5.4. PESO DE ÓRGÃOS RESPONSIVOS AO ESTRESSE 34
5.5. DOSAGEM HORMONAL 35
5.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA 37
6. DISCUSSÃO 40
7. CONCLUSÃO 46
8. REFERÊNCIAS 46

1. INTRODUÇÃO

A puberdade e a adolescência são termos usados frequentemente e de forma alternada como sinônimos. Para especialistas, no entanto, a puberdade refere-se à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que culmina na maturação testicular ou ovariana (GRABER; BROOKS-GUNN, 1998). Por outro lado, a adolescência é um período transitório da infância para a vida adulta no qual ocorre a maturação do comportamento social e cognitivo (SISK; FOSTER, 2004). Desta forma, a adolescência é o momento em que se manifesta a interação social típica observada nos adultos e a participação em atividades que envolvem riscos, como consumo de substâncias psicoativas, prática sexual sem proteção, entre outros. No entanto, há diferenças marcantes no comportamento dos adolescentes em relação aos adultos uma vez que jovens apresentam uma busca maior por novidade e impulsividade além de marcada redução de estresse e ansiedade em resposta à novidade (ADRIANI et al., 2003).

Em humanos, existem padronizações diferentes de intervalos etários que definem o período da adolescência: a Organização Mundial da Saúde (2001) a classifica entre 11 e 19 anos; já o Estatuto da Criança e do Adolescente (1990), no período de 12 a 18 anos. Entretanto, biologicamente e comportamentalmente é difícil caracterizar com exatidão o início e o final deste processo. Marcadores físicos são utilizados como estimativa do início da puberdade em humanos e roedores. O primeiro indício da puberdade em humanos é o aumento testicular, que antecede o surgimento de pelos pubianos e a ejaculação, e o início do desenvolvimento mamário, seguido pelo crescimento de pelos pubianos e, posteriormente, pela menarca (NEINSTEIN, 2002). Dada sua semelhança com humanos, os ratos são um dos mais relevantes modelos animais para pesquisa sobre processos fisiológicos (SUCKOW; WEISBROTH; FRANKLIN, 2005). Um indicador em ratos machos é a separação bálano prepucial, que ocorre por volta dos 40 dias de idade e precede a mobilidade espermática e o pico de testosterona, o qual acontece em torno dos 65 dias (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977). Em ratas, um marcador é a abertura vaginal que ocorre aproximadamente aos 35 dias de idade e precede o estro e a ovulação (EVANS, 1986). No entanto, há uma variação significativa na literatura para o dia da abertura vaginal (32 a 38 dias), mesmo quando se considera a mesma linhagem. Esta diferença em parte é devida às variações nas práticas de avaliação, além de fatores ambientais e de desenvolvimento, como a dieta, manipulação diária, exposição a glicocorticoides e idade materna (VAN GROEN; WYSS, 1990; LEWIS et al., 2002). Embora tais marcadores estejam ligados ao aumento nas

concentrações plasmáticas de hormônios gonadais, a puberdade também pode ser caracterizada por mudanças comportamentais e cerebrais (SPEAR, 2000). Algumas alterações cerebrais durante a puberdade, observadas em estudos com modelos experimentais e humanos, são independentes de ação hormonal como a neurogênese, apoptose, crescimento neuronal, mielinização, proliferação dendrítica e sinaptogênese (SISK; ZEHR, 2005). Assim, existe uma variabilidade em termos da idade usada para definir a adolescência. Um sistema geral de classificação da adolescência para o roedor apresenta três fases: pré-puberdade ou adolescência inicial, compreendendo um período entre 21 e 34 dias de idade (ratos são desmamados geralmente com 21 dias de vida); adolescência média, entre 34 e 46 dias de idade, e adolescência tardia, entre 46 e 59 dias de idade (TIRELLI; LAVIOLA; ADRIANI, 2003). A partir dos 60 dias de vida, é comum considerar o começo da idade adulta, visto que os animais alcançaram maturidade física e sexual (SPEAR, 2000).

Entre humanos, a maioria dos adolescentes atravessa este período sem grandes dificuldades. Porém, mesmo aqueles adolescentes que não têm problemas significativos de índole pessoal ou de necessidades especiais de saúde, enfrentam tensões momentâneas e precisam de ajuda para fazer adequadamente a transição para a vida adulta (BARKER, 2007). A puberdade representa um período de desenvolvimento associado com aumento da vulnerabilidade a vários transtornos relacionados ao estresse, tais como ansiedade e depressão (KINSEY-JONES et al., 2010). Estressores físicos, psicológicos e sociais fazem desta fase um ponto crítico contra os quais uma resposta inadequada pode aumentar as chances de consequências patológicas na fase adulta. Esta susceptibilidade também está relacionada ao gênero, uma vez que mulheres são duas vezes mais propensas que homens ao desenvolvimento de psicopatologias relacionadas ao estresse (WULSIN et al., 2016). Transtornos depressivos, suicídios (GREYDANUS; BACOPOULOU; TSALAMANIOS, 2009), estresse pós-traumático (CHEMTOB et al., 2011), transtornos alimentares (GONZALEZ; KOHN; CLARKE, 2007) e abuso de substâncias químicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001) apresentam-se com frequência maior na adolescência. A negligência no cuidado com a saúde durante esta faixa etária incrementa o aparecimento de deficiências nos campos cognitivos (atenção, memória, orientação), psicossocial e laboral na vida adulta (GRANT et al., 2003; KIM et al., 2013). Estes eventos patológicos traduzem-se em aumento no gasto do sistema saúde levando também à incapacidade e à diminuição da força laboral. Na Europa e nos Estados Unidos, estima-se que o custo anual da depressão é em torno de 150 e 83 bilhões de dólares, respectivamente (SOBOCKI et al., 2006; BIRNBAUM

et al., 2010), tornando-se a doença que causa a maior inabilidade funcional (WHITEFORD et al., 2013). Estes fatores indicam a necessidade da melhor compreensão dos mecanismos neuronais e hormonais responsáveis por alterações patológicas na fase adolescente, que se manifestam de imediato ou em idade futura, para assim, desenvolver medidas preventivas e intervenções terapêuticas a serem aplicadas precocemente na adolescência a fim de atenuar tais enfermidades na vida adulta.

O sistema de estresse é a designação dada ao conjunto de componentes do organismo mobilizados para adaptação às situações de estresse induzidas por diferentes estímulos estressores. Esses componentes são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), sistema nervoso vegetativo, sistemas aminérgicos centrais, sistema límbico cortical e subcortical, além do sistema imune (ASSENMACHER et al., 1995; PACAK, 2001). A atividade do eixo HPA é controlada pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de vasopressina (AVP) produzidos no hipotálamo, que ativa a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise e, em consequência, a secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) pelo córtex da adrenal. Esses neuro-hormônios são produzidos por corpos celulares neuronais, principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (LIGHTMAN, 2008). Os glicocorticoides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o próprio eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição da secreção de ACTH pela hipófise e de CRH pelo hipotálamo, configurando um mecanismo de retroalimentação negativa (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). A regulação do eixo HPA pelos glicocorticoides é mediada por dois subtipos de receptores intracelulares: receptor mineralocorticoide (MR) e receptor glicocorticoide (GR) (OITZL et al., 2010). O primeiro está limitado ao septo lateral e hipocampo, com uma maior concentração no subículo dorsal, região CA_1 assim como no giro denteado (REUL; DE KLOET, 1985). Possui afinidade elevada por corticosteroide endógeno, por esse motivo, durante o ciclo circadiano, concentrações baixas desse hormônio permitem sua ativação, para manter a atividade do eixo HPA em condições basais (SPENCER et al., 1998). Em contraste com o MR, o GR tem uma maior amplitude de distribuição no cérebro. Apresenta maiores concentrações no septo lateral, giro denteado, núcleo do trato solitário e amígdala central. São numerosos no núcleo paraventricular e locus coeruleus e presentes em quantidades baixas nos núcleos da rafe, subículo dorsal bem como região CA_1 (REUL; DE KLOET, 1985). Possui uma afinidade menor por corticosteroide endógeno e afinidade alta por dexametasona (REUL; VAN DEN BOSCH; DE KLOET, 1987). Logo, durante o pico circadiano ou estresse agudo, as

concentrações elevadas de corticosteroide ativam progressivamente os receptores glicocorticoides, o que permite a retroalimentação do eixo HPA (DE KLOET et al., 1998; SPENCER et al., 1998; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005) . Além disso, a ativação do receptor MR parece possuir uma ação relevante modulando os efeitos mediados por GR (SPENCER et al., 1998).

A resposta do sistema de estresse tem sido extensamente estudada em modelos de estresse pré-natal, pós-natal e idade adulta. Entretanto, durante a adolescência várias estruturas responsáveis pelo controle da resposta estressora (hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal), ainda estão em desenvolvimento (SPEAR, 2000) e podem ser as responsáveis por alterações comportamentais e hormonais observadas na idade adulta, o que demanda a necessidade de mais estudos nessa fase do ciclo de vida (MCCORMICK; MATHEWS, 2007). Basicamente dois modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar os efeitos do estresse na adolescência inicial dos roedores. Um primeiro, comparando adolescentes e adultos submetidos a diferentes paradigmas de estresse agudo ou crônico. E um segundo, acompanhando os adolescentes submetidos a estresse até a vida adulta e observando as consequências hormonais e cognitivas. Assim, por exemplo, machos adolescentes expostos ao éter por 1,5 ou 3 min (GOLDMAN et al., 1973; VÁZQUEZ; AKIL, 1993) ou submetidos à contenção por 30 minutos (ROMEO et al., 2004, 2006) responderam com produção maior e mais prolongada de corticosterona, quando comparados aos adultos. Em fêmeas, existem dados realizando tal comparação, que descrevem aumento (ROMEO; LEE; MCEWEN, 2004) ou diminuição (VIAU et al., 2005) da concentração de corticosterona em resposta a 30 minutos de contenção. Diferentemente do que ocorre na idade adulta, quando o estresse foi repetido, ratos jovens apresentaram secreções elevadas de corticosterona após contenção por 30 minutos durante 7 dias, em comparação com animais submetidos a 1 dia de estresse (ROMEO et al., 2006). Em modelos de acompanhamento até a fase adulta, os ratos submetidos a estresse agudo, crônico, ou a estresse moderado crônico mostraram resultados divergentes. Aumento (ISGOR et al., 2004), diminuição (GOLISZEK et al., 1996) ou ausência de efeitos na resposta do eixo HPA, analisada na fase adulta, foram descritos. Na avaliação comportamental dos animais adultos submetidos a estresse na adolescência, houve comprometimento ou melhoria (AVITAL; RICHTER-LEVIN, 2005) no desempenho das tarefas do aprendizado espacial, assim como na exploração do labirinto em cruz (MCCORMICK et al., 2010). Os estudos sobre alterações das principais estruturas envolvidas durante a resposta estressora são insuficientes para entender as alterações hormonais e comportamentais observadas. A análise da expressão da proteína Fos (marcador de atividade

neuronal) indicou que a resposta maior de machos adolescentes após contenção foi restrita ao PVN, diferente dos adultos em que várias regiões são ativadas (KELLOGG; AWATRAMANI; PIEKUT, 1998). Após estresse imunológico, a expressão de Fos no PVN foi maior em ratos adultos quando comparados com adolescentes (GOBLE et al., 2011). Viau e colaboradores (2005) observaram, após 30 minutos de estresse de contenção, aumento na expressão de RNAm para CRH no PVN de ratos com 60 dias comparados aos de 30 dias, diferentemente da expressão do RNA heteronuclear para AVP, maior no grupo de 30 dias do que no grupo de 60 dias.

Como relatado anteriormente, existe uma diversidade grande na literatura sobre as respostas comportamentais e neuro-hormonais de longa duração decorrentes do estresse na adolescência. Para tentar compatibilizar alguns destes modelos animais, nosso laboratório desenvolveu um protocolo de estresse na adolescência inicial para ratos machos e fêmeas Wistar (TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014). Foram avaliados os efeitos sobre a exploração do labirinto em cruz e a resposta do eixo HPA na fase adulta, após aplicação de estresse aos 26 dias de vida. A duração e a natureza do estressor foram estudadas em grupos diferentes. Os estímulos estressores de contenção, de hipoglicemia ou de infecção aguda ou crônica demonstraram afetar diferentemente o comportamento e a atividade do eixo HPA, em ratos adultos. Foi demonstrado claramente que existe especificidade nas consequências a longo prazo do estresse aplicado na adolescência. Estes eventos são mediados pelo sexo, pela natureza e pela duração do estressor. A contenção e a infeção produziram as maiores alterações nas variáveis estudadas. Além disso, as fêmeas foram mais sensíveis à natureza do estressor e os machos, à duração do mesmo. O sistema nervoso simpático, o sistema aminérgico central e/ou a alteração na sensibilidade da glândula adrenal ao ACTH são possíveis mecanismos envolvidos, visto que a atividade dos neurônios CRH e AVP no PVN não foi modificada. No entanto, as vias e os locais específicos responsáveis por estes efeitos não foram identificados.

O desenvolvimento de ações terapêuticas para reverter ou atenuar os efeitos adversos do estresse na adolescência e a identificação dos mecanismos neuro-hormonais envolvidos ainda não foram explorados. Neste campo, existem possíveis candidatos que incluem antidepressivos, ansiolíticos, inibidores da síntese de glicocorticoides, antagonistas dos receptores do CRH, assim como antagonistas dos receptores MR e GR. Dentro destes últimos, dois compostos sobressaem na literatura que envolve o estudo do eixo HPA e o estresse. A Espironolactona é um antagonista competitivo dos receptores MR. Seu mecanismo envolve

diminuição da bomba Na^+ K^+-ATPase no túbulo distal, além de possuir efeitos antiandrogênicos leves (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2008). Este medicamento é extensamente usado na área clínica para tratamento de doenças que envolvem ascite, hipertensão portal bem como coadjuvante na terapêutica de hirsutismo e acne. Nas últimas décadas, tornou-se uma ferramenta importante no estudo da atividade dos receptores MR e do controle do eixo HPA, além de possuir efeitos terapêuticos no tratamento de doenças psicoafectivas, tais como transtorno bipolar (JURUENA et al., 2009; CORNELISSE; JOËLS; SMEETS, 2011). Por outro lado, o composto RU-486 (Mifepristona), compete efetivamente com a progesterona e os glicocorticoides pela ligação com os seus receptores PR e GR, respectivamente (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2008). Após sua síntese em 1981, seu principal uso foi para interromper a gravidez, dado seu efeito anti-progesterona. No entanto, seu uso estendeu-se para o estudo da atividade dos receptores GR no controle da secreção dos glicocorticoides, assim como durante e após a resposta ao estresse (BAULIEU, 1997; MOLDOW et al., 2005). Em ratos Sprague-Dawley, resultados mostram que o bloqueio de GR durante o estresse impediu o aumento da concentração plasmática basal de corticosterona nos dias subsequentes à exposição inevitável ao choque, o que sugere a hipótese de que a ativação desse receptor sob tais condições pode ser a circunstância necessária para alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (MOLDOW et al., 2005). Além disso, existe a possibilidade desse estímulo sobre GR modificar MR já que esses receptores se colocalizam como também se heterodimerizam. Dessa forma, o desequilíbrio entre ambos poderia alterar a atividade do eixo HPA (MOLDOW et al., 2005). Apesar do grande uso destes compostos, verifica-se na literatura científica, que ainda não foram testados em modelos que envolvam o bloqueio de receptores depois de finalizado o estímulo estressor. Neste contexto, novos protocolos poderiam ter um impacto significativo num possível uso clínico para prevenção de efeitos de longo prazo, como são alguns efeitos observados em adultos, decorrentes de estresse ocorrido na adolescência.

2. OBJETIVO GERAL

Considerando que alguns modelos de estresse durante a adolescência em animais provocam alterações comportamentais e do eixo HPA a longo prazo (MCCORMICK et al., 2010); a natureza e a duração do estressor são fatores determinantes na resposta deste eixo

(PACAK, 2001); o estresse de contenção na adolescência afeta o comportamento e a resposta estressora de machos e fêmeas (TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014); a atividade de eixo HPA é controlada por neurônios CRH e AVP no PVN e pela secreção de glicocorticoides que agem através dos receptores MR e GR (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005), o objetivo principal deste projeto foi verificar se alterações de respostas comportamentais e de atividade do eixo HPA, observadas em animais adultos submetidos ao estresse agudo ou crônico na pré-puberdade, poderiam ser prevenidas pelo bloqueio dos receptores MR ou GR em sequência ao estímulo estressor.

2.1. Objetivos específicos

Em fêmeas, submetidas ao bloqueio dos receptores MR ou GR após estresse de contenção agudo ou crônico na pré-puberdade (adolescência inicial), analisou-se:

- a instalação da puberdade verificada por meio da abertura vaginal;
- a evolução ou variação do peso corporal no decorrer do protocolo experimental;

Na vida adulta:

- o nível de ansiedade, avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado;
- o peso da glândula adrenal e timo
- a identificação das fases do ciclo estral;
- a atividade do eixo HPA por meio da secreção de Corticosterona e da expressão CRH e Fos em neurônios da região parvocelular do PVN;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os procedimentos realizados em animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), de acordo com o protocolo nº 125 / 2014.

Foram utilizadas ratas Wistar com 21 dias de idade e provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto - USP. Mantidas no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, foram alocadas em gaiolas coletivas de acrílico (com dimensões de 50x32x17 cm e limite de 5 animais por caixa) durante 4 dias para aclimatação sob condições padronizadas (ciclo claro/escuro de 12:12 h, no qual as luzes eram ligadas às 06:00 h, temperatura de 22±1ºC e acesso livre à ração balanceada e água).

3.2. Protocolo experimental

O esquema abaixo (Figura 1) resume o desenho experimental empregado nesse trabalho.

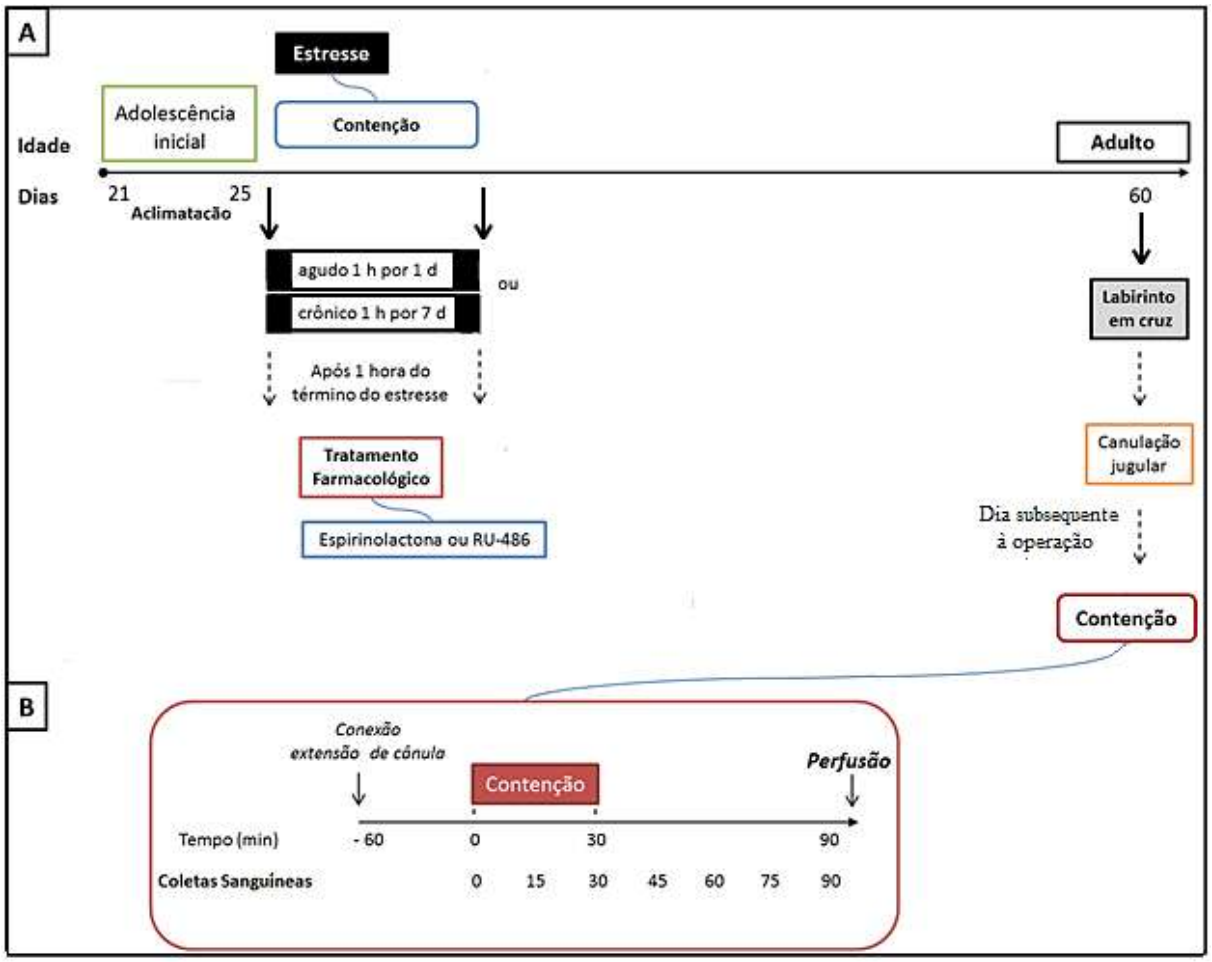

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental. Gráfico A mostra os procedimentos e o tempo no qual as intervenções foram feitas. Gráfico B indica os tempos das coletas sanguíneas e do estresse de contenção (30 min) no adulto. d (dias)

Realizou-se o acompanhamento do peso corporal, semanalmente, durante todo o protocolo experimental, ou seja, da chegada dos animais (21 dias de idade) até a idade adulta (61 dias de idade).

3.3. Grupos experimentais

Após aclimatação por 4 dias, fêmeas pré-púberes foram distribuídas em grupos para a realização de estresse agudo ou crônico por contenção assim como controles, os quais não foram submetidos ao estímulo estressor. Tais grupos foram subdivididos naqueles que receberam injeção subcutânea de Espirinolactona, RU-486 ou veículo (em 1% de Tween 80) após 1h de finalizado o estímulo estressor e obedecendo sempre à mesma rotina de horários de aplicação (entre 9:00 e 10:00 h). Desta forma, foi estabelecido o total de 9 grupos (n=8-15 animais por grupo), descritos a seguir:

- Grupo não submetido a estresse que recebeu veículo;
- Grupo não submetido a estresse que recebeu Espironolactona;
- Grupo não submetido a estresse que recebeu RU-486;
- Grupo submetido a estresse agudo que recebeu veículo;
- Grupo submetido a estresse agudo que recebeu Espironolactona;
- Grupo submetido a estresse agudo que recebeu RU-486;
- Grupo submetido a estresse crônico que recebeu veículo;
- Grupo submetido a estresse crônico que recebeu Espironolactona;
- Grupo submetido a estresse crônico que recebeu RU-486;

3.4. Procedimentos realizados na pré-puberdade

3.4.1. Estresse de contenção

A partir dos 26 dias de vida, os animais foram submetidos a uma ou sete sessões de uma hora diária de contenção (entre 07:00 e 8:00 h da manhã), na qual foram colocados em

um tubo plástico cilíndrico (15 cm de comprimento x 3 cm de diâmetro) com aberturas para suprimento de ar.

3.4.2. Antagonistas dos receptores MR e GR

Após 1 h de finalizado cada evento de contenção na pré-puberdade, os animais receberam injeção subcutânea de Espirinolactona (Sigma), ou RU-486 (Sigma) em doses de 20mg/kg, volume 2ml/kg, previamente testadas (AVITAL; SEGAL; RICHTER-LEVIN, 2006; SPYRKA; DANIELEWICZ; HESS, 2011). As drogas foram dissolvidas em 1% de Tween 80. Têm-se descrito na literatura, na dose de 50mg/kg, efeitos centrais para RU-486 assim como a capacidade da Espironolactona em bloquear receptores MR situados no hipocampo (MOLDOW et al., 2005). Apesar de ter sido observado uma quantidade de apenas 28% da concentração plasmática de RU-486 no cérebro de rato, resultados *in vitro* quanto ao efeito desse composto sobre a secreção de ACTH mostram que, no sistema nervoso central, as concentrações entre 10^{-8} e 10^{-7} já se mostram efetivas (HEIKINHEIMO; KEKKONEN, 1993).

3.4.3. Determinação da abertura vaginal

A partir dos 30 dias de idade foi realizada diariamente a observação da região perigenital para detectar a ocorrência da abertura completa do orifício vaginal.

3.5. Procedimentos realizados durante a vida adulta

Terminados os protocolos de estresse, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas até a idade adulta (60 dias após o nascimento).

3.5.1. Ciclo Estral

Monitorou-se diariamente o esfregaço vaginal a partir de sete dias antes do término do protocolo experimental com a finalidade de se identificar a fase do ciclo estral em que os animais se encontrariam no dia de cada experimento a ser realizado. As ratas foram distribuídas de forma homogênea em dois grupos, proestro/estro (que apresenta secreção elevada de estrogênio) e metaestro/diestro (com concentrações baixas de estrogênio). Esta variável (fase do ciclo estral) foi adicionada à análise estatística para os ensaios de avaliação comportamental, hormonal e citológica por imuno-histoquímica. Como não houve diferença estatisticamente significativa entre as fases do ciclo estral, os dados dos animais de ambos grupos foram unificados e apresentados graficamente. Assim, a análise estatística e o efeito geral do estresse e dos tratamentos foram descritos para um único conjunto de animais.

3.5.2. Avaliação comportamental

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliação de ansiedade na idade adulta. Elevado 50 cm do piso, consiste em dois braços abertos e dois braços fechados, cruzados em ângulo reto e conectados por uma área central (PELLOW et al., 1985). Este teste amplamente validado (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) consiste em colocar o animal na área central do labirinto com o focinho posicionado para um dos braços fechados. Foi realizado o registro por um período de 5 minutos, nos quais o animal pode explorar livremente o ambiente. A partir disso, foram determinados: frequência nos braços abertos e tempo gasto nos braços abertos e fechados, indicadores relacionados com a ansiedade; frequência nos braços fechados e distância percorrida, indicadores relacionados com a atividade locomotora. Esta análise foi realizada por meio da utilização do software X-Plo-Rat (CHAIM, K.T.; SEIXAS, M.A; PISA, I.T; OLIVEIRA, R.F.; MORATO, S., 2005). Os testes foram executados aos 60 dias de idade dos animais, no período da manhã entre 07:00 e 8:00 h.

3.5.3. Implantação de cateter na jugular

Um dia antes do estresse de contenção nos animais adultos, uma cânula (Silastic® Dow Corning Co., diâmetro interno 0,51 mm, diâmetro externo 1,14 mm, Midland, Michigan, EUA) preenchida com salina heparinizada estéril (150 I.U./ml) foi inserida pela veia jugular externa, no átrio direito, de acordo com a técnica descrita por Harms e Ojeda (1974), sob anestesia com tribromoetanol (1 ml/100g de peso corporal, i.p., em solução 2,5%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA). Após o procedimento, administrou-se uma dose profilática de pentabiótico (0,1 ml / rato i.m.; Fort Dodge, Campinas, Brasil) além do analgésico flunixina meglunina (2,5mg/kg, s.c., Banamine®, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil). A partir deste momento, as ratas foram separadas em gaiolas individuais, onde permaneceram por um período próximo a 24 horas.

3.5.4. Estresse de contenção

Na idade adulta, os animais foram submetidos novamente a uma sessão estresse de contenção (TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014) a fim de avaliar a resposta do eixo HPA, por meio de dosagem hormonal plasmática e da análise de ativação neuronal em áreas cerebrais relacionadas ao controle desse eixo. Desta forma, as ratas foram colocadas por 30 minutos em um tubo plástico cilíndrico (21cm de comprimento x 6 cm de diâmetro) com orifícios para suprimento de ar ao mesmo tempo em que amostras de sangue eram retiradas periodicamente.

3.5.5. Coleta de amostras de sangue

No dia do experimento uma extensão de polietileno PE-50 preenchida com salina estéril contendo heparina (150 I.U./ml) foi conectada ao cateter jugular entre 07:00 e 08:00 h. Uma hora depois, após uma coleta basal de sangue, as ratas foram submetidas à contenção por 30 minutos. Assim, sete amostras sanguíneas (0,2 ml cada) foram coletadas pelo cateter jugular (basal, durante e depois da contenção, com intervalos de 15 minutos entre elas), com

reposição subsequente do volume com salina. Em seguida, elas foram centrifugadas em 1200 xg à 4ºC por 15 minutos e o plasma separado e armazenado à -20ºC até o momento da dosagem hormonal por radioimunoensaio (RIE).

3.5.6. Coleta de órgãos responsivos ao estresse

Ao término da coleta de sangue, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol (1 ml / 100g de peso corporal, i.p., solução a 2,5%; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA). Realizou-se laparotomia para a retirada das adrenais e toracotomia para a retirada do timo a fim de que tais órgãos tivessem seus pesos mensurados.

3.5.7. Imuno-histoquímica

Posteriormente à coleta, efetuou-se o procedimento de perfusão, por meio da aorta ascendente, com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 M, pH 7,4) durante 10 minutos seguida por solução de 4% de paraformaldeído (PFA) em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4) por 40 minutos. Então, os cérebros foram removidos e mantidos na mesma solução de PFA, anteriormente descrita, para fixação por um período de uma hora. Em seguida, foram transferidos para uma solução de 30% de sacarose em tampão PB (0,1M, pH 7,4) até à saturação do tecido, e subsequentemente congelados em isopentano resfriado e armazenados a -70 ° C.

Foram realizados, em um criostato a -20º C, cortes coronais de 30 µm do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). As delimitações dos núcleos cerebrais de interesse estão em conformidade com o atlas estereotáxico (PAXINOS, G.; WATSON C., 1997). As seções foram armazenadas em solução anti-congelamento (pH 7,4) a -20 ° C até a realização da técnica imuno-histoquímica.

Então, os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos em solução salina tamponada com fosfato de potássio (KPBS, 0,05 M, pH 7,2), mantidos em uma solução de H_2O_2 (30%) durante 30 minutos e, novamente, lavados por 5 vezes com KPBS. Em seguida,

permaneceram durante 1 hora em solução contendo KPBS, 0,3% Triton-X-100 e soro de ovelha 5%. Foram posteriormente incubados à 4 ° C, durante a noite, com anticorpo policlonal de coelho anti-fos em 1: 10.000 (sc- 52, específico para a detecção de c-fos; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) diluído na solução anteriormente citada. Após 3 lavagens com KPBS, as secções foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário biotinilado em 1: 600 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Depois de serem novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos com KPBS, utilizou-se a solução AB do Kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), ou seja, 50 µl de A e 50 µl de B por 10 ml de KPBS com 0,3% de Triton X-100, na qual foram mantidas durante 1 hora. Logo a seguir, passaram por duas lavagens de 5 minutos com KPBS e uma, pelo mesmo tempo, com acetato de sódio (175 mM, pH 7,5). As secções passaram pela reação com a solução de tetracloridrato de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) reforçada com níquel (2 mg de DAB e 250 mg de sulfato de níquel (II), com 3 µl de H_2O_2 a 30% a cada 10 ml de acetato de sódio 175 mM), com a finalidade de se adquirir um composto escuro. A reação foi interrompida a partir da lavagem por uma vez durante 5 minutos com acetato de sódio e duas vezes, pelo mesmo tempo, com KPBS. Posteriormente ao protocolo de FOS, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de coelho anti-CRH (Península Laboratories, San Carlos, CA, EUA), na diluição 1:10000 durante 48 h a 4 ° C. A partir de então, os cortes foram lavados e o protocolo descrito para a marcação de Fos foi seguido, no qual empregou-se os anticorpos secundários biotinilados apropriados bem como a solução AB. Novamente as seções foram lavadas com KPBS (2 vezes por 5 minutos) e, na sequência, com tampão Tris-HCl (pH 7,2, 0,6 g de Tris-HCl a cada 100 ml de água mili-Q) por mais 5 minutos. As secções foram transferidas para uma solução contendo DAB seguido da lavagem com tampão Tris-HCl (1 vez por 5 minutos) e KPBS (2 vezes por 5 minutos). Em seguida, foram colocadas em lâminas gelatinizadas e aguardou-se sua secagem. Então, elas foram limpas em xileno e cobertas, por meio da utilização de Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha), com lamínulas. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera acoplada ao microscópio DMC 2900 Leica (Leica, Alemanha) e analisadas com *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA). A contagem neuronal foi realizada a partir de duas secções por animal e obtendo-se um valor médio. Tal avaliação foi executada por um observador independente e treinado, o qual teve como referência o atlas de Paxinos (PAXINOS; WATSON C., 1997) para as regiões cerebrais.

3.5.8. Dosagem hormonal por radioimunoensaio (RIE)

Foi utilizada uma prévia extração com etanol para dosagem de corticosterona. No radioimunoensaio, empregou-se padrão e anticorpo específico, na diluição de 1:10000, adquiridos da Sigma Co. (EUA) e corticosterona triciada proveniente da Amershan (EUA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5/0,05%). O limite mínimo de detecção para este hormônio foi de 0,04 ng / ml e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 5% e 8%, respectivamente.

4. ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados foram plotados como médias ± erros padrões das médias. Analisou-se separadamente as variáveis dependentes contínuas, concentração hormonal e peso, conforme os seus fatores independentes: duração do estresse, tratamento farmacológico, dias da pesagem, ou tempo da coleta sanguínea. Assim, empregou-se o modelo linear de efeitos mistos (fixos e aleatórios) visto que amostras repetidas foram colhidas de cada indivíduo. As variáveis mensuradas no labirinto, o número de neurônios estabelecido por imuno-histoquímica, o peso das adrenais e do timo foram analisados conforme suas co-variáveis (duração do estresse e tratamento farmacológico), pelo modelo linear generalizado. O dia da abertura vaginal foi avaliado mediante curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) seguido do teste Log-Rank. As comparações entre as médias foram feitas usando contrastes ortogonais baseados na distribuição *t* de Student. A adequação dos modelos estatísticos foi determinada mediante gráfico de probabilidades dos resíduos. Em todas as análises adotou-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas pelo software SAS 9.1 (SAS, Cary, NC, EUA), por meio da utilização de ferramentas como Mixed, ANOVA, GLM, TTEST e LIFETEST.

5. RESULTADOS

5.1. Peso corporal

O peso corporal dos animais está vinculado ao efeito da idade ($F_{6,553}$ = 3284,2; p<0,0001), o qual se expressa por meio de um aumento no decorrer do desenvolvimento. Desse modo, se constatou que o ganho de peso não foi afetado pelo bloqueio de MR ou GR durante a fase pré-puberal ($F_{2,557}$ = 0,91; p = 0,404) mas foi modificado pelo estresse ($F_{2,557}$ = 4,44; p = 0,012) durante esse período. No entanto, não houve a interação entre essas variáveis, ou seja, o tratamento farmacológico não influenciou o efeito do estresse. Isso quer dizer que o ganho de peso de ratas sujeitas à restrição crônica na pré-puberdade foi menor que no grupo veículo não exposto ao estresse e no grupo submetido ao estresse agudo (Figura 2).

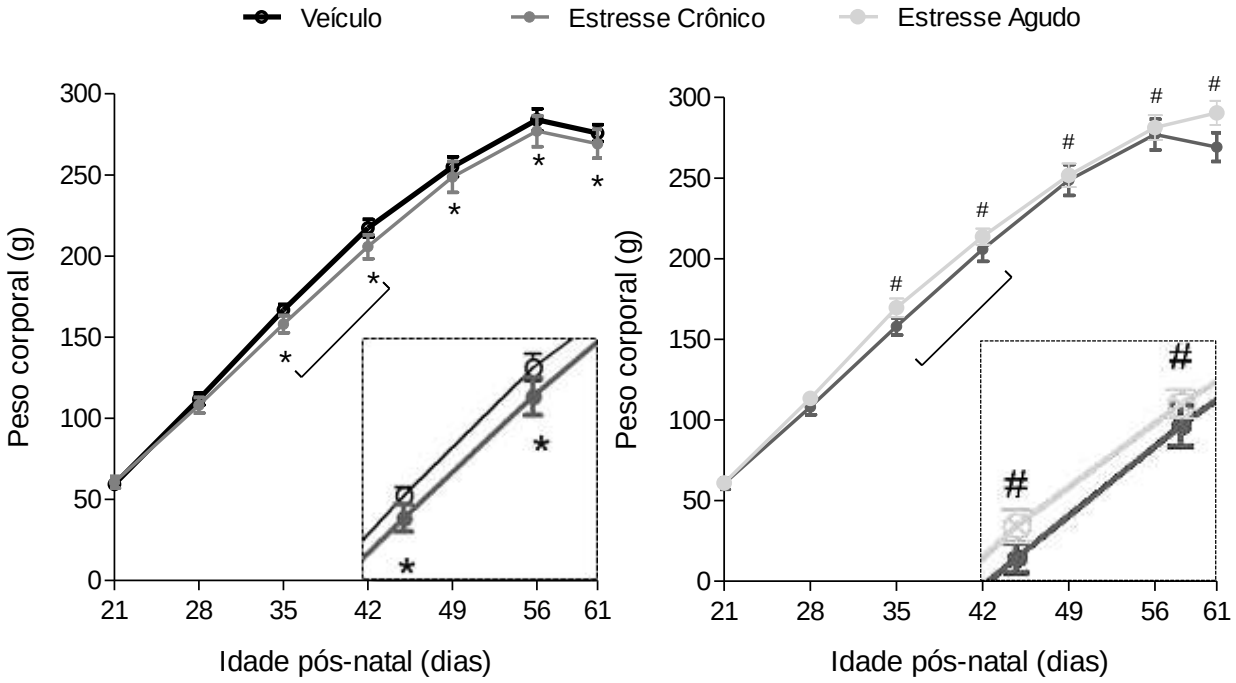

Figura 2. Evolução do peso corporal de ratas veículo não submetidas ao estresse ou sujeitas a contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida. Valores expressos em média ± erro padrão da média. n=9, (*) p<0,008 (estresse crônico comparado ao veículo), (#) p<0,02 (estresse agudo comparado ao crônico) pelo modelo linear de efeitos mistos.

5.2. Início da puberdade

A administração de Espironolactona ou RU-486 na pré-puberdade não alterou o período da abertura vaginal. Porém, o estresse agudo nesse período promoveu o avanço da instalação da puberdade enquanto o estresse crônico causou seu atraso, como verificado pelo valor do teste estatístico (log-rank de 5,69, com 1 grau de liberdade e o valor p de 0,017) (Figura 3). Tais efeitos do estresse não foram modificados pelo tratamento farmacológico.

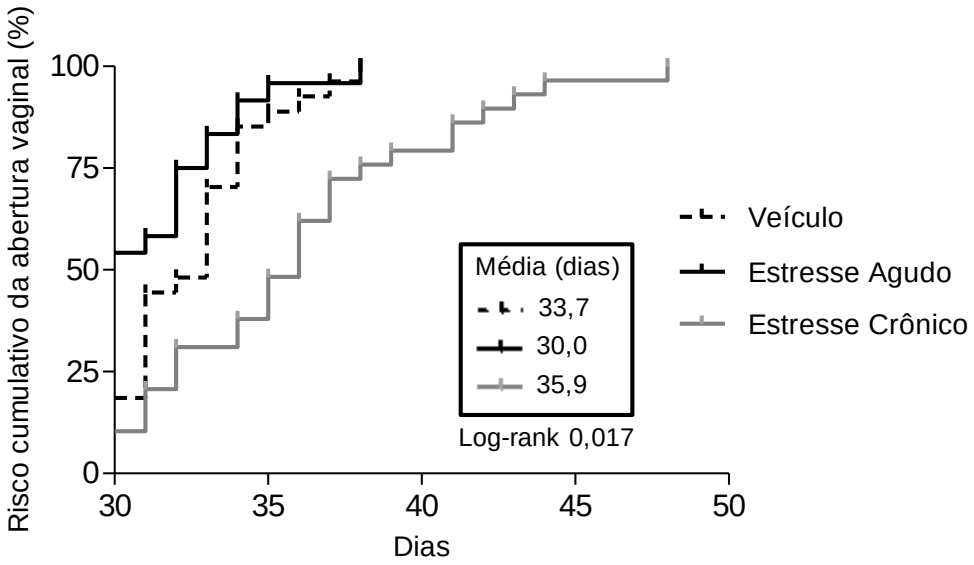

Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier indicam a probabilidade cumulativa da abertura vaginal de ratas veículo não submetidas ao estresse (n=27) ou sujeitas ao estresse por contenção agudo (n=24) ou crônico (n=29), a partir dos 26 dias de vida. Valores expressos em média. (*) p<0,02 (comparado ao veículo não submetido ao estresse).

5.3. Avaliação comportamental

O número de entradas e tempo gasto nos braços abertos não foram influenciados pelo tratamento farmacológico ($F_{2,94}$ = 0,83; p = 0,438; $F_{2,94}$ = 0,72; p = 0,491, respectivamente), protocolo de estresse (de modo respectivo, $F_{2,94}$ = 0,89; p = 0,417; $F_{2,94}$ = 0,82; p = 0,442), aplicados na pré-puberdade, ou mesmo pelo ciclo estral ($F_{1,95}$ = 1,55; p = 0,216; $F_{1,95}$ = 1,51; p = 0,222, respectivamente) (Figura 4). Do mesmo modo, os demais parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado apresentaram semelhança entre os grupos experimentais (Tabela 1).

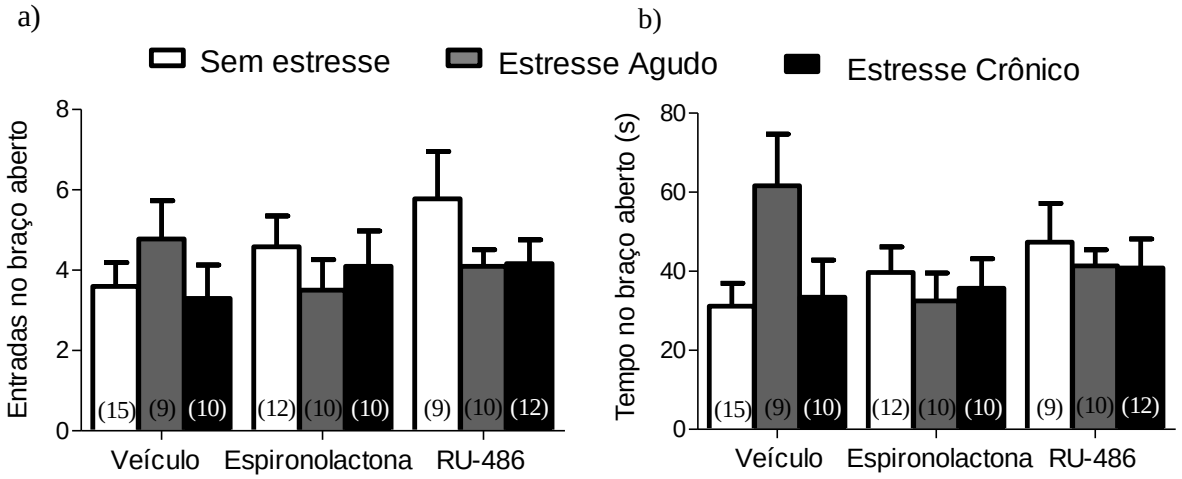

Figura 4. Número de entradas (a) e tempo gasto nos braços abertos (b) na execução de uma sessão de 5 minutos no labirinto em cruz elevado por ratas adultas com 60 dias de idade. As mesmas, sem estresse ou sujeitas a contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na figura. Valores expressos em média ± erro padrão da média, p>0,05 pelo modelo linear generalizado.

Tabela 1 – Respostas comportamentais de ratas adultas com 60 dias de idade no teste labirinto em cruz elevado. A partir dos 26 dias de vida, animais sem estresse ou sujeitos a contenção, em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, foram tratados com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg.

	Veículo			Espironolactona			RU-486		
Braço fechado	Restrição								
	Sem (15)	Aguda (9)	Crônica (10)	Sem (12)	Aguda (10)	Crônica (10)	Sem (9)	Aguda (10)	Crônica (12)
Entradas	10,1±0,9	10,0±1,1	9,5±0,6	10,0±0,8	11,5±1,1	8,7±1,0	9,8±0,9	10,6±0,5	9,7±0,6
Tempo (s)	227,7±9,3	186,9±18,3	222,3±14,8	213,7±10,2	223,9±11,9	206,0±17,4	200,6±12,4	201,2±7,0	219,0±10,8
Distância percorrida (m)	6,5±0,4	5,6±0,7	6,4±0,4	6,4±0,3	7,7±0,6	5,9±0,4	6,5±0,5	6,7±0,4	6,3±0,3

Valores expressos em média ± erro padrão da média, p>0,05 pelo modelo linear generalizado.
O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na tabela.

5.4. Peso de órgãos responsivos ao estresse

Nem o bloqueio dos receptores MR nem de GR ($F_{2,78}$ = 0,55; p = 0,579), tampouco o paradigma de estresse ($F_{2,78}$ = 1,34; p = 0,268) na pré-puberdade afetou o peso do timo das ratas quando adultas (Figura 5).

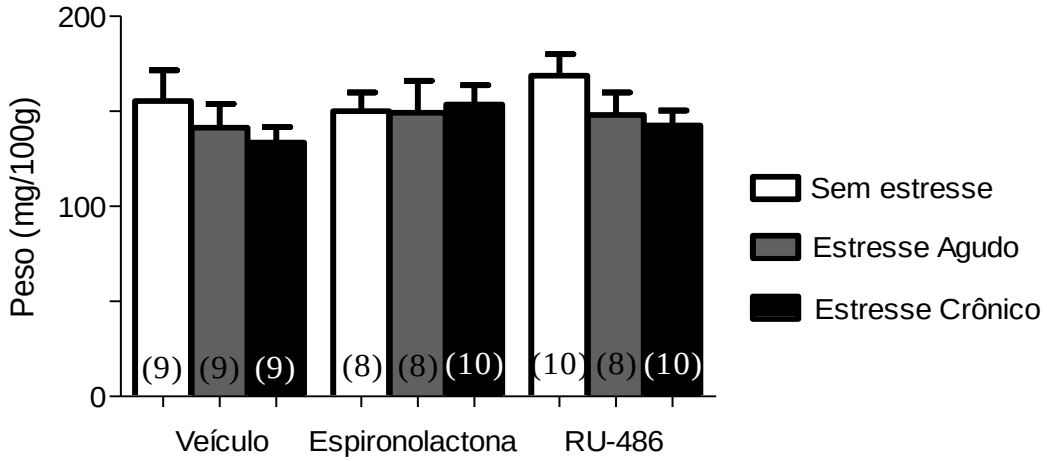

Figura 5. Peso do timo em ratas adultas (com 61 dias de vida) submetidas ao estresse de restrição por 30 minutos. As mesmas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na figura. Valores expressos em média ± erro padrão da média, p>0,05 pelo modelo linear generalizado.

Contudo, verificou-se que o tratamento farmacológico na pré-puberdade ($F_{2,78}$ = 9,43; p = 0,0002) influiu no peso das adrenais na fase adulta. Todavia, não houve participação da variável estresse ($F_{2,78}$ = 0,4; p = 0,671), empregada na pré-puberdade. A administração de RU-486 causou um aumento do peso dessas glândulas em relação ao grupo que recebeu veículo ou Espironolactona, após todos esses animais serem submetidos à contenção na vida adulta (Figura 6).

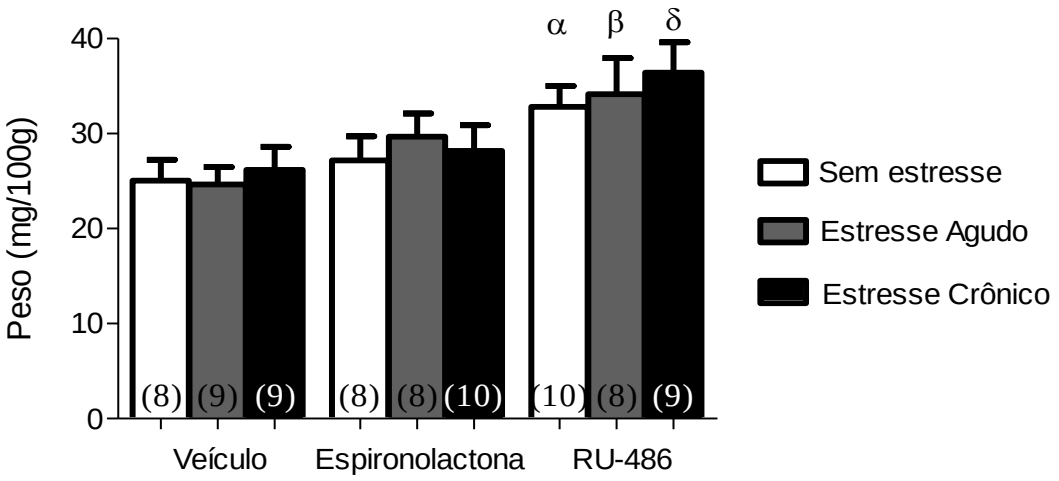

Figura 6. Peso das adrenais (direita e esquerda) em ratas adultas (com 61 dias de vida) submetidas ao estresse de restrição por 30 minutos. As mesmas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na figura. Valores expressos em média ± erro padrão da média. (α) $p<0,04$ (comparado ao veículo sem estresse), (β) $p<0,01$ (comparado ao veículo com estresse agudo), (δ) $p<0,01$ (comparado ao veículo com estresse crônico) pelo modelo linear generalizado.

5.5. Dosagem hormonal

O perfil de secreção de corticosterona em reposta ao estresse de contenção, aplicado em todos os grupos experimentais na vida adulta, está apresentado na figura 7 (a - f). As variáveis ciclo estral ($F_{1,79} = 0,09$; $p = 0,767$) e estresse ($F_{2,78} = 0,63$; $p = 0,536$), empregado na pré-puberdade, não tiveram efeito sobre a concentração plasmática de corticosterona. No entanto, o tratamento farmacológico afetou tal parâmetro ($F_{2,78} = 6,46$; $p = 0,003$). Constata-se o aumento da concentração deste hormônio na vida adulta em função da administração de RU-486 na pré-puberdade quando comparado ao grupo que recebeu veículo, fato evidenciado pelo gráfico da área sob a curva (Figura 8).

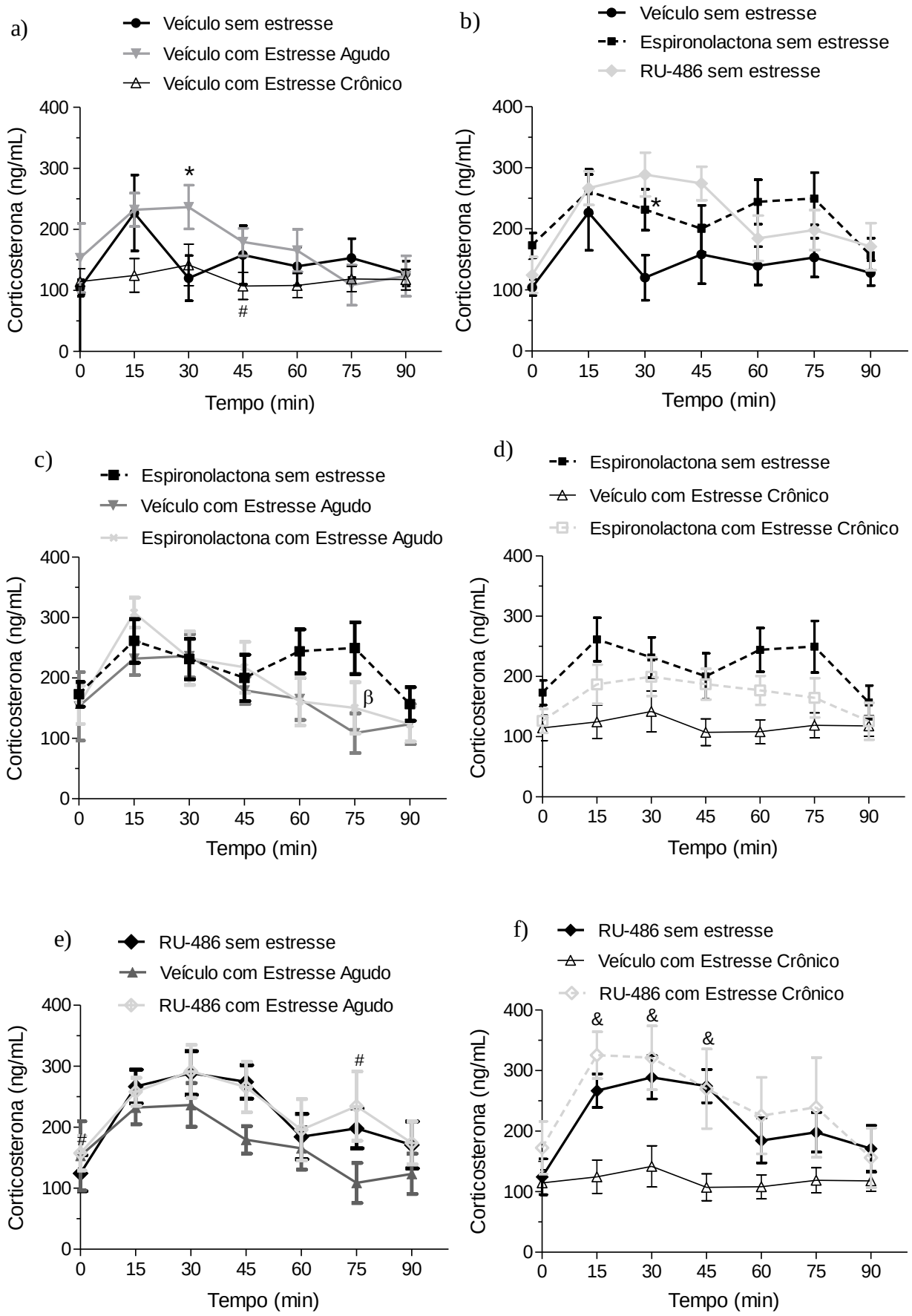
a)
Veículo sem estresse
Veículo com Estresse Agudo
Veículo com Estresse Crônico
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)
b)
Veículo sem estresse
Espironolactona sem estresse
RU-486 sem estresse
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)
c)
Espironolactona sem estresse
Veículo com Estresse Agudo
Espironolactona com Estresse Agudo
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)
d)
Espironolactona sem estresse
Veículo com Estresse Crônico
Espironolactona com Estresse Crônico
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)
e)
RU-486 sem estresse
Veículo com Estresse Agudo
RU-486 com Estresse Agudo
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)
f)
RU-486 sem estresse
Veículo com Estresse Crônico
RU-486 com Estresse Crônico
Corticosterona (ng/mL)
Tempo (min)

Figura 7. Secreção de corticosterona em resposta ao estresse por contenção durante 30 minutos em ratas adultas (com 61 dias de vida). As mesmas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. Valores expressos em média ± erro padrão da média. n= 8-10, (*) p<0,03 (comparado ao veículo), (#) p<0,05 (comparado ao veículo com estresse agudo), (&) p<0,01 (comparado ao veículo com estresse crônico), (β) p<0,01 (comparada à Espironolactona) pelo modelo linear de efeitos mistos.

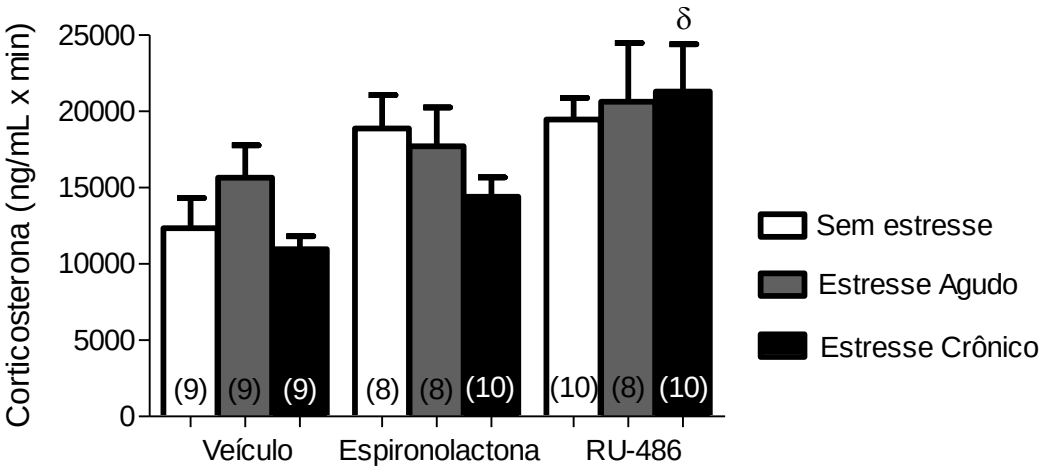

Figura 8. Área sob a curva da secreção de corticosterona em resposta ao estresse por contenção em ratas adultas (com 61 dias de vida). As mesmas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na figura. Valores expressos em média ± erro padrão da média. (δ) p<0,01 (comparado ao veículo com estresse crônico) pelo modelo linear generalizado.

5.6. Imuno-histoquímica

A ativação de Fos em neurônios do PVN, como resposta a contenção na vida adulta, foi alterada pelo estresse ($F_{2,58}$ = 15,44; p = 0,0001) na pré-puberdade porém não houve efeito da administração de Espironolactona ou RU-486 ($F_{2,58}$ = 0,06; p = 0,937). Sua expressão foi reduzida nos grupos que sofreram estresse crônico em relação aos seus respectivos controles. No entanto, o estresse agudo não alterou a atividade neuronal embora com a presença de um dos fármacos houve diminuição da ativação de Fos comparada aos controles correspondentes

(figura 9 a). De maneira semelhante, o estresse ($F_{2,58}$ = 3,83; p = 0,028) mas não o tratamento farmacológico ($F_{2,58}$ = 1,22; p = 0,303) aplicado na pré-puberdade influiu sobre o número de neurônios CRH que expressaram Fos no PVN como resposta a contenção na vida adulta. Houve redução nos animais que receberam veículo ou Espironolactona após estresse crônico (figura 9 b).

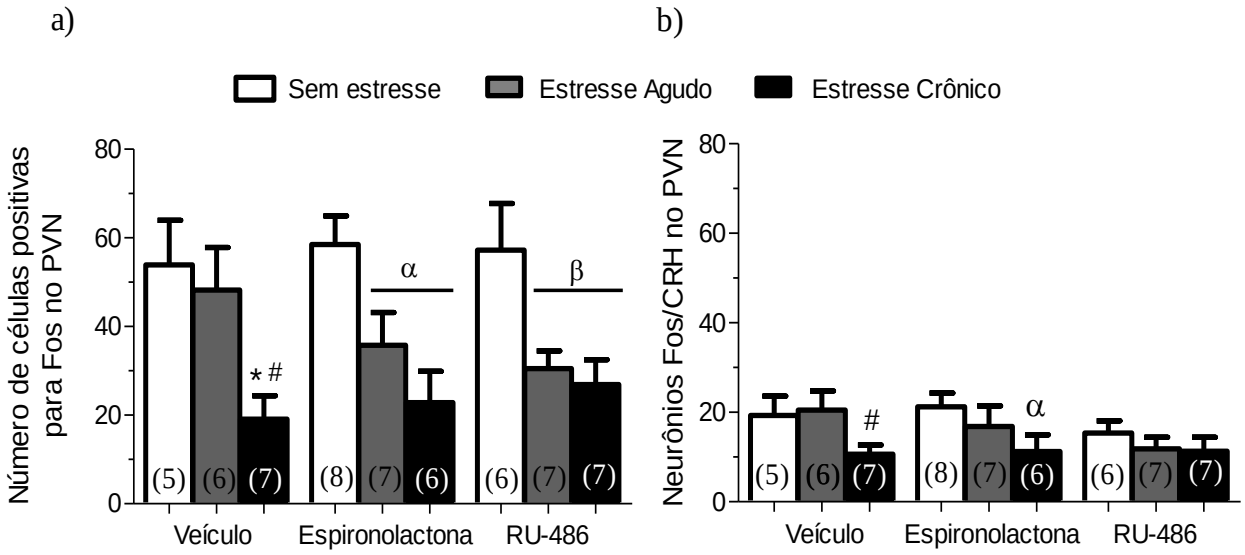

Figura 9. Expressão de Fos (a) e ativação de neurônios CRH (b) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratas adultas (com 61 dias de vida) em resposta ao estresse por contenção durante 30 minutos. As mesmas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. O número de animais em cada grupo está indicado entre parênteses na figura. Valores expressos em média ± erro padrão da média, (*) p<0,01 (comparado ao veículo sem estresse), (#) p<0,05 (comparado ao veículo com estresse agudo), (α) p<0,04 (comparado ao grupo Espironolactona sem estresse) (β) p<0,01 (comparado ao RU-486 sem estresse) pelo modelo linear generalizado.

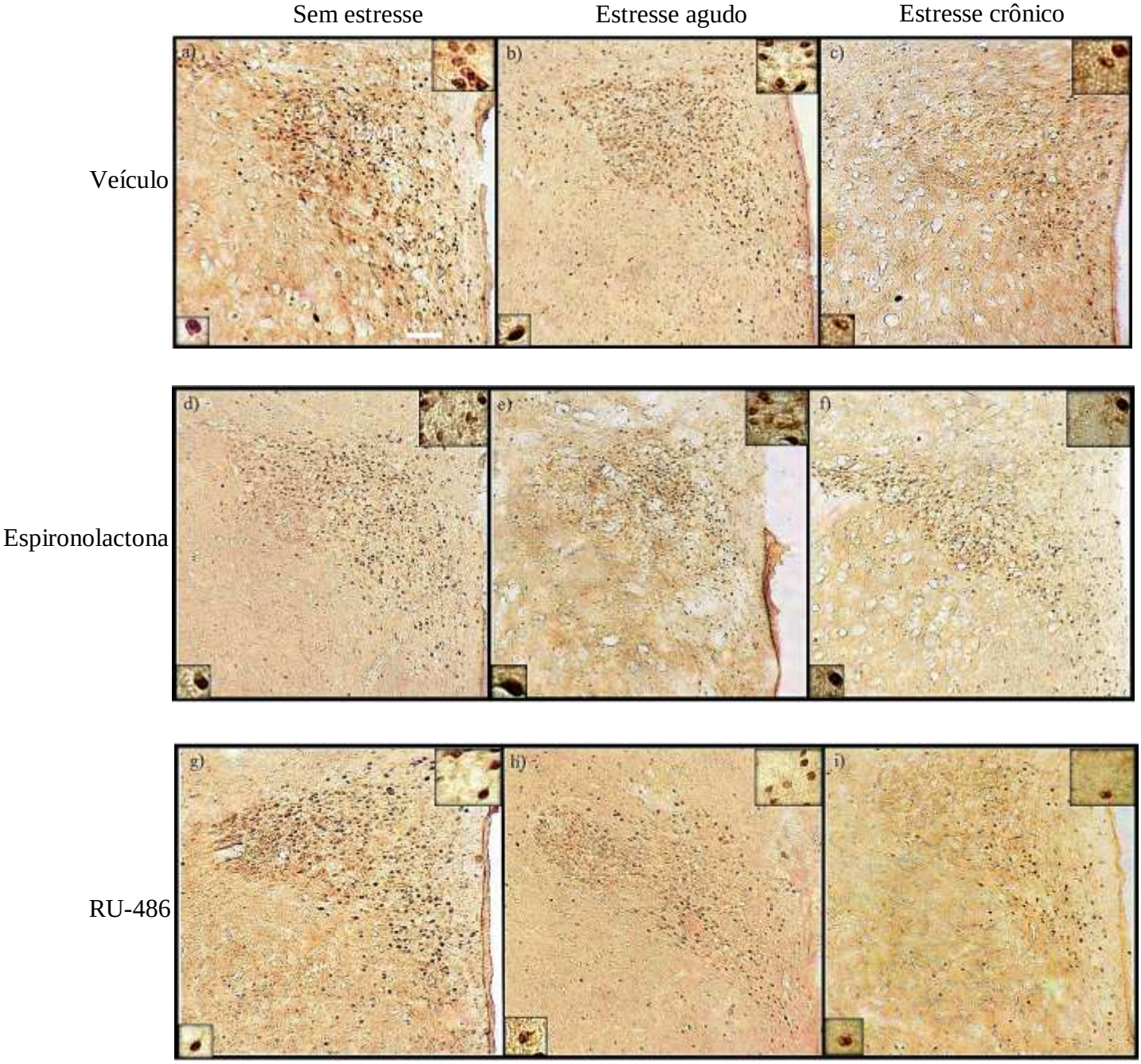

Figura 10. Fotomicrografias que ilustram a dupla marcação de Fos-CRH em neurônios da região parvocelular medial (PaMP) do PVN. Ratas adultas, sem estresse ou sujeitas à contenção em um (agudo) ou sete (crônico) dias consecutivos, a partir dos 26 dias de vida, foram tratadas com veículo, Espironolactona ou RU-486 na dose de 20mg/kg. Barra de escala, 100 µm.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a avaliar a influência a longo prazo do bloqueio farmacológico dos receptores MR e GR após o estímulo estressor no período da adolescência. Propicia um maior entendimento dos mecanismos envolvidos uma vez que mostra a importância de MR e GR no estresse agudo durante a pré-puberdade sobre a resposta ao mesmo evento na vida adulta.

A diminuição do ganho de peso em animais submetidos ao estresse crônico na puberdade corrobora evidências, que a regulação do peso corporal e da adiposidade envolva a participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (BRAY, 1984; HAVEL et al., 1996). Recentemente foi mostrado que o estresse por imobilização diária repetida reduziu a ingestão de alimentos e os animais não conseguiram recuperar o peso normal mesmo com o término do estresse (BAZHAN; ZELENA, 2013). A possível participação do eixo HPA poderia ocorrer em diferentes níveis, um deles pela ação dos corticosteroides. Com a redução de insulina no estresse crônico, os glicocorticoides em concentração elevada exercem ação catabólica, acarretando disponibilização de lipídios como fonte energética e consequente redução em suas reservas (DALLMAN et al., 2004). No entanto, o presente estudo não mostrou a participação do bloqueio de MR ou GR sobre a alteração do peso corporal. Em modelos experimentais diferentes, outros autores também observaram resultados semelhantes. Este parâmetro, em ratas adultas, não foi afetado ao fim da administração por 8 semanas com antagonista MR (Espironolactona) (GOYAL et al., 2009). O tratamento com antagonista GR (RU-486) durante 14 dias também não teve efeitos sobre a ingestão alimentar e ganho de peso corporal em ratas magras e obesas com 35 dias de idade (HAVEL et al., 1996).

Os resultados deste estudo mostraram que o estresse agudo antecipou, enquanto o estresse crônico retardou a instalação da puberdade. Os antagonistas MR e GR não tiveram efeito sobre esse evento. O processo de desenvolvimento da puberdade envolve o início da atividade do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HPG), por meio do estabelecimento da secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo, da esteroidogênese gonadal e o consequente amadurecimento sexual (KINSEY-JONES et al., 2010). A instalação da puberdade é afetada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como desnutrição, infecção, privação emocional e estresse (PARENT et al., 2003; KNOX et al., 2009; KINSEY-JONES et al., 2010). O CRH, componente do eixo HPA, pode suprimir a liberação pulsátil de GnRH em condições de estresse. Em ratas tratadas a partir de 28 dias de idade com CRH, i.c.v., durante 14 dias, demonstrou-se que este exerceu ação inibitória sobre a instalação da puberdade. O

tônus reduzido de CRH na MPOA parece estar associado à indução do início da puberdade, e possivelmente interfira na sinalização de kisspeptina com seu receptor. O sistema kisspetina é considerado um elemento-chave para regular a secreção de GnRH e para iniciar o processo puberal. O atraso na puberdade provocado pela administração central de CRH foi associado à redução significativa na expressão de RNA mensageiro de kisspeptina na MPOA (KINSEY-JONES et al., 2010).

Por outro lado, estudos em macacos mostraram que, na presença de estrógeno, o estresse pode estimular a liberação de LH (PUDER et al., 2000). Em mulheres na pós-menopausa que tiveram reposição de estradiol, o estresse agudo por injeção de endotoxina ou infusão de ACTH promoveu elevação da secreção de LH (PUDER et al., 2000). Em ambos os grupos, este aumento só ocorreu quando associado à elevação de progesterona. Desta forma, o estresse agudo durante a fase folicular do ciclo menstrual pode antecipar um pico de secreção de LH, e consequentemente afetar a maturação dos folículos e antecipar a ovulação. A ativação do eixo HPA promove um aumento da secreção de progesterona provinda da adrenal, a qual potencializa a ação estimuladora do estrógeno sobre a liberação de LH (PUDER et al., 2000). Esse mecanismo parece envolver a ativação de neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral pelo estradiol e progestorona, os quais se projetam para a MPOA (SZAWKA et al., 2009), área rica em neurônios GnRH (CHARLTON, 2008). A antecipação da puberdade no estresse agudo e o retardo no estresse crônico podem estar vinculados com tais mecanismos na MPOA envolvendo a relação entre sistema noradrenérgico do tronco cerebral e neurônios GnRH e CRH e kisspeptina, respectivamente. Há escassez de dados na literatura correlacionando estresse agudo e instalação da puberdade. Outros estudos experimentais e observações clínicas são necessários para compreensão desses mecanismos. A ausência de efeitos de antagonistas de GR e MR favorece a hipótese de que na situação em questão, a participação do eixo HPA envolva mais um mecanismo central relacionado ao CRH do que a ação de glicocorticoides.

As respostas comportamentais na idade adulta, avaliadas neste trabalho pelo teste do labirinto em cruz elevado, não foram alteradas pelo estresse ou tratamento com antagonistas de GR e MR no período pré-puberal. O teste do labirinto em cruz elevado, dentre várias finalidades, constitui uma ferramenta para avaliação do efeito ansiolítico / ansiogênico de drogas (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Consequências diversas e conflitantes sobre do efeito do estresse na adolescência sobre o comportamento de ansiedade no animal adulto têm sido descritas na literatura. Dentre elas, há relatos de efeitos ansiogênicos (TSOORY; COHEN; RICHTER-LEVIN, 2007;

WILKIN et al., 2012), ansiolíticos (SUO et al., 2013; TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014) ou nulos (PELEG-RAIBSTEIN; FELDON, 2011; LOI et al., 2015). Em trabalho anterior deste grupo de pesquisa foi demonstrado um efeito ansiolítico e dependente do ciclo estral, que envolve uma interação complexa de diversas variáveis (TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014).

Dados concordantes com o atual estudo, sem alteração no teste de labirinto em cruz elevado na idade adulta, foram obtidos em experimento com modelo de estresse por privação materna, aos 3 dias de idade, e tratamento com antagonista GR (Mifepristona), entre os 26 e 28 dias de vida (LOI et al., 2015).

Nosso estudo parece ser o primeiro a relacionar o bloqueio farmacológico dos receptores MR em fêmeas na pré-puberdade e a avaliação do comportamento de ansiedade, na vida adulta, o que dificulta a comparação com outros resultados da literatura. Alguns estudos em machos mostraram que a Espironolactona impediu a consolidação de efeitos ansiogênicos pela exposição de ratos, sem proteção, a um predador (ADAMEC et al., 2007) ou ao estresse por contenção (CALVO; VOLOSIN, 2001).

Os resultados conflitantes obtidos por diversos pesquisadores podem estar relacionados a um ou mais dos seguintes fatores: tipo e duração de exposição ao estressor, intervalo entre o paradigma de estresse, intervenção farmacológica e realização do teste comportamental, dose e tempo de tratamento, sexo, idade e manipulações prévias dos animais. A questão demanda outros estudos para esclarecimento das diferentes respostas e possíveis mecanismos nelas envolvidos.

Em ratas adultas, foi constatado que o estresse de restrição e o tratamento com Espironolactona ou RU-486 durante a adolescência não alteraram o peso do timo. Anteriormente, foi mostrado que 10 dias de exposição ao estresse de contenção (1 hora por dia) ou estresse variável não causou qualquer efeito sobre o peso relativo do timo em ratos adultos (MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007). Os autores discutiram que os paradigmas de estresse utilizados no estudo não foram suficientemente intensos ou longos para alterar esse parâmetro. Em ratos, com idade entre 28 e 37 dias, o estresse por contenção também não alterou o peso relativo do timo. No entanto, o estresse variável reduziu o peso deste órgão em relação ao controle (CRUZ et al., 2012). A associação entre o timo e a adrenal foi mostrada pela primeira vez em um trabalho que apontou uma estimulação do crescimento deste órgão linfoide após a adrenalectomia bilateral em ratos jovens. Os glicocorticoides poderiam mediar essa relação uma vez que são responsáveis por diminuir a quantidade de linfócitos e timócitos por meio do mecanismo de apoptose (KRAML et al., 2003). Contudo, o tratamento por 10

dias com Espironolactona (50 mg/kg/dia, s.c,) em ratos adultos Lister hooded, adrenalectomizados e restituídos com 30% de corticosterona, não modificou o peso do timo quando comparado aos grupos veículo (propilenoglicol) e sham (WONG; HERBERT, 2005). Por outro lado, a administração de RU-486, por um período 3 dias, em diferentes grupos de ratos a partir de 9, 12 ou 14 dias de idade, diminuiu o peso deste órgão em comparação ao seus respectivos controles. Tal diferença desapareceu nos grupos que receberam esse tratamento partir dos 16 ou 23 dias de idade. Os autores sugeriram que a ausência de hipertrofia seria causada por um bloqueio incompleto dos receptores de glicocorticoides do timo (KRAML et al., 2003). Há uma produção elevada de glicocorticoides neste órgão linfoide em fetos e neonatos, apesar da concentração no plasma ser baixa em ratos com 12 dias de idade. No início da vida, isso poderia provocar apoptose dos timócitos. Como o timo está sob regulação da glândula adrenal após o desmame, uma concentração plasmática menor de glicocorticoides proporcionaria o antagonismo dos sinais de deleção e a sobrevivência dos timócitos (KRAML et al., 2003). Em ratas Zucker magras com 35 dias de idade, RU-486, durante 14 dias (30 mg/kg/dia, s.c.), também não afetou o peso do timo em relação ao seu controle, apesar da diminuição deste órgão ter sido verificada em ratas obesas no mesmo trabalho (HAVEL et al., 1996).

A atividade do eixo HPA na idade adulta foi avaliada, pelo presente estudo, por meio da concentração plasmática de corticosterona, peso das adrenais e ativação, mediante estresse, de neurônios CRH no PVN em animais submetidos a diferentes condições na pré-puberdade. O eixo HPA envolve a secreção dos hormônios CRH / vasopressina, produzidos pelo PVN, que promovem a liberação de ACTH pela hipófise, o qual estimula a secreção dos glicocorticoides pelo córtex da adrenal (MCCORMICK et al., 2010). O controle desse sistema consiste em evitar a reação exagerada dos mecanismos de defesa em resposta ao estresse, uma vez que a exposição prolongada às concentrações elevadas de glicocorticoides tem efeitos deletérios em vários sistemas do organismo (MCCORMICK; MATHEWS, 2007).

Os resultados deste estudo mostraram que o peso da adrenal e a secreção de corticosterona, desencadeada pelo estresse na fase adulta, não foram alterados pelo estresse na pré-puberdade seguido do tratamento com veículo ou Espironolactona. Porém, tais parâmetros se mostraram aumentados em virtude da administração de RU-486.

Van Haarst et al. (1996) apontaram que, em resposta a um novo ambiente vinte e quatro horas após a administração de RU-486, houve aumento das concentrações de ACTH e corticosterona no período da manhã. Também verificaram aumento do peso da adrenal e da sensibilidade de suas células, *in vitro,* ao ACTH após 10 dias de tratamento.

Quando o RU-486 foi administrado i.c.v. por meio de minibombas Alzet, durante vários dias em ratos adultos Wistar, ocorreu um aumento da concentração de ACTH durante a fase vespertina do ciclo circadiano, no primeiro dia de tratamento, o que foi normalizado nos dias subsequentes. O mesmo aconteceu em relação à corticosterona, contudo, a concentração deste hormônio voltou a aumentar no terceiro e quarto dia de tratamento. O conteúdo de RNA mensageiro para CRH na região paraventricular do hipotálamo, medidos no quarto dia de administração de RU-486, bem como as propriedades de ligação dos receptores de corticosteroides no hipocampo, hipotálamo e hipófise, após 10 dias de tratamento, não foram alterados. O aumento da corticosterona dissociado de concentrações elevadas de ACTH sugere um aumento da capacidade de resposta da adrenal ao ACTH (VAN HAARST et al., 1996).

Em experimentos realizados com 10 homens saudáveis, que receberam RU-486 durante oito dias, verificou-se uma ação anti-glicocorticoide, com aumento das concentrações circulantes de cortisol. Quatro dias após o final do tratamento, a ativação das adrenais estava normalizada. Porém, a estimulação direta da hipófise por CRH exógeno causou uma resposta corticotrófica e cortical excessiva. A resposta das adrenais a um composto sintético com efeito semelhante ao ACTH (Cortrosyn) também foi exacerbada no decorrer do tratamento (BERTAGNA, 1997).

Apesar das diferenças metodológicas, nossos resultados e os trabalhos citados da literatura mostraram uma ação do RU-486 nas adrenais, associada a uma alteração de sensibilidade destas glândulas.

Verificou-se no atual estudo que a ativação de Fos e Fos/CRH no PVN, foi semelhante em animais não estressados, tratados com veículo, Espironolactona ou RU-486. Estes grupos também foram análogos com os animais submetidos a estresse agudo que receberam veículo. Portanto, por si, os tratamentos com antagonistas de GR e MR ou o estresse agudo, na pré-puberdade, não interferiram na atividade de neurônios do PVN, em resposta a contenção na fase adulta.

As informações desencadeadas por estímulos estressores convergem para células parvocelulares do PVN no hipotálamo e resultam em respostas neuroendócrinas. Por conseguinte, há um rápido aumento em c-fos, ativação de genes, e liberação dos produtos, dentre eles o hormônio CRH, o que proporciona a ativação do eixo HPA (LIGHTMAN, 2008). Nossos resultados mostraram que houve redução da ativação de Fos no PVN, mas não de Fos/CRH, em resposta a contenção na vida adulta, nos animais que sofreram estresse agudo, seguido do tratamento com Espironolactona ou RU-486 na puberdade. Portanto, os

antagonistas de GR ou MR impediram um efeito da corticosterona no estresse agudo na pré-puberdade e, como consequência na vida adulta, um conjunto de neurônios do PVN foi menos ativado mediante estresse. Não há participação de neurônios CRH, pois a expressão Fos/CRH foi semelhante aos animais tratados com veículo. Além disso, descarta-se que sejam neurônios vasopressinérgicos do PVN, os quais se projetam para a eminência mediana e interferem no eixo HPA. Esta subpopulação com atividade reduzida não está relacionada à atividade do eixo HPA mas, provavelmente, a outro componente da resposta de estresse. No entanto, o tratamento com RU-486 promoveu alterações no peso das adrenais e concentração de corticosterona. É provável que tais respostas sejam devido a efeitos periféricos do antagonista GR e não mediados por alterações da atividade de neurônios do PVN.

Considerando que os receptores MR são pouco expressos no PVN do hipotálamo (REUL; DE KLOET, 1985; COLE et al., 2000), uma hipótese para que ambos antagonistas, com diferentes mecanismos, tenham exercido o mesmo efeito sobre esse conjunto de neurônios, seria uma ação indireta, mediada por outras regiões, como por exemplo o hipocampo. Essa área apresenta grande expressão de ambos receptores (REUL; DE KLOET, 1985) e exibe influência inibitória sobre o PVN (DE KLOET et al., 1998). Em conformidade com o proposto, um estudo com ratos adultos Lister hooded, adrenalectomizados e com implantes subcutâneos de corticosterona, que receberam Espironolactona ou Mifepristona, demonstrou que o antagonismo dos receptores MR aumentou a proliferação celular no giro denteado do hipocampo, mesmo efeito alcançado pelo antagonismo dos receptores GR, sob condições de administração adicional de corticosterona (WONG; HERBERT, 2005).

No presente trabalho, os animais submetidos ao estresse crônico na pré-puberdade apresentaram menor expressão de Fos e de Fos/CRH em neurônios do PVN, em resposta ao estresse na fase adulta. Esse efeito não foi revertido pelo tratamento com Espironolactona ou RU-486. O estresse crônico pode promover adaptações no eixo HPA, entre elas, a infrarregulação da transcrição gênica de CRH, bem como manutenção na expressão do gene AVP ou aumento do mesmo, de maneira compensatória (MA; LEVY; LIGHTMAN, 1997). Ainda, há relatos que o estresse crônico seria responsável por uma habituação da expressão do gene c-fos no PVN (COLE et al., 2000).

Com estes resultados, demonstramos que o modelo de administração de antagonistas MR e GR, após o estresse agudo na adolescência, com o propósito da diminuição dos efeitos de longa duração, mostrou-se efetivo a nível central.

7. CONCLUSÃO

O atual estudo mostra a participação dos receptores MR e GR, de áreas específicas, na repercussão de breves situações estressoras, vivenciadas na pré-puberdade, sobre a vida adulta, contribuindo para a compreensão destes efeitos.

Visto que o modelo de administração de antagonistas MR e GR após o estresse agudo indica diminuição dos efeitos de longa duração a nível central, intervenções preventivas podem trazer perspectivas positivas no propósito de atenuar efeitos a longo prazo decorrentes do estresse na adolescência. Contudo, efeitos desejáveis e adversos devem ser ponderados bem como realizados mais estudos a fim de avaliar a segurança de tal tratamento farmacológico durante o período da adolescência, fase de desenvolvimento tão suscetível devido ao processo de maturação de vários sistemas (TRASLAVIÑA; DE OLIVEIRA; FRANCI, 2014).

8. REFERÊNCIAS

ADAMEC, R. et al. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behavioural Brain Research**, v. 179, n. 2, p. 192–207, 2007.

ADRIANI, W. et al. Evidence for Enhanced Neurobehavioral Vulnerability to Nicotine during Periadolescence in Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 11, p. 4712–4716, 2003.

ASSENMACHER, I. et al. Central Regulation of ACTH Release in Stress. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 41–54, 1995.

AVITAL, A.; RICHTER-LEVIN, G. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 8, n. 2, p. 163–73, 2005.

AVITAL, A.; SEGAL, M.; RICHTER-LEVIN, G. Contrasting roles of corticosteroid receptors in hippocampal plasticity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 36, p. 9130–4, 2006.

BARKER, G. Adolescents, social support and help-seeking behaviour: an international literature review and programme consultation with recommendations for action. **World Health Organization**, 2007.

BAULIEU, E. E. A Short Overview of Its Mechanisms of Action and Clinical Uses at the End of 1996. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 828, p. 47–58, 1997.

BAZHAN, N.; ZELENA, D. Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Brain Research Bulletin**, v. 95, p. 46–53, 2013.

BERTAGNA, X. Pituitary-adrenal response to RU 486 in man. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22, n. SUPPL. 1, p. 51–55, 1997.

BIRNBAUM, H. G. et al. Employer burden of mild, moderate, and severe major depressive disorder: mental health services utilization and costs, and work performance. **Depression and anxiety**, v. 27, n. 1, p. 78–89, 2010.

BRAY, G. A. Hypothalamic and genetic obesity: an appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. **International journal of obesity**, v. 8 Suppl 1, p. 119–37, 1984.

BRUNTON, L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. [s.l.] The McGraw-Hill Co, 2008.

CALVO, N.; VOLOSIN, M. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 4, p. 261–271, 2001.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–205, 2005.

CHAIM, K.T.; SEIXAS, M.A; PISA, I.T; OLIVEIRA, R.F.; MORATO, S. **X-Plo-Rat**, Ribeirão Preto, 2005.

CHARLTON, H. Hypothalamic Control of Anterior Pituitary Function: A History. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 641–646, 2008.

CHEMTOB, C. M. et al. Adolescent exposure to the World Trade Center attacks, PTSD symptomatology, and suicidal ideation. **Journal of traumatic stress**, v. 24, n. 5, p. 526–9, 2011.

COLE, M. A. et al. Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 10, p. 1034–1042, 2000.

CORNELISSE, S.; JOËLS, M.; SMEETS, T. A randomized trial on mineralocorticoid receptor blockade in men: effects on stress responses, selective attention, and memory. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2720–8, 2011.

CRUZ, F. C. et al. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 19–23, 2012.

DALLMAN, M. F. et al. Chronic Stress-Induced Effects of Corticosterone on Brain : Direct and Indirect. **Annals New York Academy Of Sciences**, v. 1018, p. 141–150, 2004.

DE KLOET, E. R. et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269–301, 1998.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, 2005.

Estatuto da Criança e do Adolescente., 1990.

EVANS, A. M. Age at puberty and first litter size in early and late paired rats. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 322–326, 1986.

GOBLE, K. H. et al. Pubertal-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity and cytokine secretion in response to an immunological stressor. **Journal of neuroendocrinology**, v. 23, n. 2, p. 129–35, 2011.

GOLDMAN, L. et al. Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. **Neuroendocrinology**, v. 12, n. 3, p. 199–211, 1973.

GOLISZEK, A. G. et al. Effects of prepubertal stress on subsequent ACTH response to novel stress and CRH in male vs female rats. **Stress Medicine**, v. 12, p. 199–204, 1996.

GONZALEZ, A.; KOHN, M. R.; CLARKE, S. D. Eating disorders in adolescents. **Australian Family Physician**, v. 36, n. 8, p. 614–619, 2007.

GOYAL, B. R. et al. Investigation into the cardiac effects of spironolactone in the experimental model of type I diabetes. **J.Cardiovasc.Pharmacol.**, v. 54, n. 6, p. 502–9, 2009.

GRABER, J. A.; BROOKS-GUNN, J. Puberty. In: BLECHMAN, E. A.; BROWNELL, K. D. (Eds.). . **Behavioral medicine and women: a comprehensive handbook**. New York: Guilford Press, 1998. p. 51–8.

GRANT, K. E. et al. Stressors and child and adolescent psychopathology: Moving from markers to mechanisms of risk. **Psychological Bulletin**, v. 129, n. 3, p. 447–466, 2003.

GREYDANUS, D. E.; BACOPOULOU, F.; TSALAMANIOS, E. Suicide in Adolescents: A Worldwide Preventable Tragedy. **The Keio Journal of Medicine**, v. 58, n. 2, p. 95–102, 2009.

HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology**, v. 36, n. 3, p. 391–2, 1974.

HAVEL, P. J. et al. Predominately glucocorticoid agonist actions of RU-486 in young specific-pathogen-free Zucker rats. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. R710–7, 1996.

HEIKINHEIMO, O.; KEKKONEN, R. Dose-response relationships of RU 486. **Annals of medicine**, v. 25, n. 1, p. 71–6, 1993.

ISGOR, C. et al. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. **Hippocampus**, v. 14, n. 5, p. 636–48, 2004.

JURUENA, M. F. et al. Improved stress response in bipolar affective disorder with adjunctive spironolactone (mineralocorticoid receptor antagonist): case series. **Journal of psychopharmacology**, v. 23, n. 8, p. 985–7, 2009.

KELLOGG, C. K.; AWATRAMANI, G. B.; PIEKUT, D. T. Adolescent development alters stressor-induced Fos immunoreactivity in rat brain. **Neuroscience**, v. 83, n. 3, p. 681–689, 1998.

KIM, P. et al. Effects of childhood poverty and chronic stress on emotion regulatory brain function in adulthood. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 2013.

KINSEY-JONES, J. S. et al. Corticotrophin-Releasing Factor Alters the Timing of Puberty in the Female Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 2, p. 102–109, 2010.

KNOX, A. M. I. et al. Neonatal Lipopolysaccharide Exposure Delays Puberty and Alters

Hypothalamic *Kiss1* and *Kiss1r* mRNA Expression in the Female Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 683–689, 2009.

KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 298–303, 1977.

KRAML, J. et al. Glucocorticoid agonistic and antagonistic effects of mifepristone and onapristone on thymocyte subset composition and CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in infant male rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 87, n. 1, p. 85–96, 2003.

LEWIS, E. M. et al. Sexual Maturation Data for Crl Sprague-Dawley Rats: Criteria and Confounding Factors. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 437–458, 2002.

LIGHTMAN, S. L. The Neuroendocrinology of Stress: A Never Ending Story. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 880–884, 2008.

LOI, M. et al. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. **Neuroscience**, 2015.

MA, X. M.; LEVY, A.; LIGHTMAN, S. L. Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint: A study of both AVP and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (RNA) and heteronuclear RNA. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4351–4357, 1997.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 29–35, 2007.

MCCORMICK, C. M. et al. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. **Brain and cognition**, v. 72, n. 1, p. 73–85, 2010.

MCCORMICK, C. M.; MATHEWS, I. Z. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 86, n. 2, p. 220–33, 2007.

MOLDOW, R. L. et al. Blockage of glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptors prevents the persistent increase in circulating basal corticosterone concentrations following stress in the rat. **Neuroscience letters**, v. 374, n. 1, p. 25–8, 2005.

NEINSTEIN, L. S. **Adolescent Health Care : A Practical Guide Contents**. 4ª. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2002.

OITZL, M. S. et al. Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 853–866, 2010.

PACAK, K. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.

PARENT, A. S. et al. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 5, p. 668–693, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 1997.

PELEG-RAIBSTEIN, D.; FELDON, J. Differential effects of post-weaning juvenile stress on the behaviour of C57BL/6 mice in adolescence and adulthood. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 339–351, 2011.

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

PUDER, J. J. et al. Stimulatory effects of stress on gonadotropin secretion in estrogen-treated women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 6, p. 2184–8, 2000.

REUL, J. M. H. .; DE KLOET, E. R. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505–2511, 1985.

REUL, J. M. H. M.; VAN DEN BOSCH, F. R.; DE KLOET, E. R. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: Functional implications. **Journal of Endocrinology**, v. 115, n. 3, p. 459–467, 1987.

ROMEO, R. D. et al. Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. **Neuroendocrinology**, v. 79, n. 3, p. 125–132, 2004.

ROMEO, R. D. et al. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-

pituitary-adrenal axis plasticity. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1664–1674, 2006.

ROMEO, R. D.; LEE, S. J.; MCEWEN, B. S. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 6, p. 387–393, 2004.

SISK, C. L.; FOSTER, D. L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1040–1047, 2004.

SISK, C. L.; ZEHR, J. L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 26, n. 3-4, p. 163–174, 2005.

SOBOCKI, P. et al. Cost of depression in Europe. **The journal of mental health policy and economics**, v. 9, n. 2, p. 87–98, 2006.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 24, p. 417–463, 2000.

SPENCER, R. L. et al. Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2718–2726, 1998.

SPYRKA, J.; DANIELEWICZ, J.; HESS, G. Brief neck restraint stress enhances long-term potentiation and suppresses long-term depression in the dentate gyrus of the mouse. **Brain Research Bulletin**, v. 85, n. 6, p. 363–367, 2011.

SUCKOW, MARK A. WEISBROTH, STEVEN H. FRANKLIN, C. L. **The Laboratory Rat**. 2ª. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

SUO, L. et al. Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1387–400, 2013.

SZAWKA, R. . . et al. **5th INTERNATIONAL MEETING STEROIDS AND NERVOUS SYSTEM** (G. C. Panzica, S. Gotti, Eds.)OVARIAN-STEROID REGULATION OF NORADRENERGIC PROJECTIONS TO THE MEDIAL PREOPTIC AREA IN FEMALE RATS. **Anais**...TORINO, Italy: 2009

TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 163–178, 2003.

TRASLAVIÑA, G. A. A.; DE OLIVEIRA, F. L.; FRANCI, C. R. Early adolescent stress alters behavior and the HPA axis response in male and female adult rats: The relevance of the nature and duration of the stressor. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 178–189, 2014.

TSOORY, M.; COHEN, H.; RICHTER-LEVIN, G. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 245–256, 2007.

VAN GROEN, T.; WYSS, J. M. Extrinsic Projections From Area CAI of the Rat Hippocampus : Olfactory , Cortical , Subcortical , and Bilateral Hippocampal Formation Projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 302, p. 515–528, 1990.

VAN HAARST, A. D. et al. Chronic brain glucocorticoid receptor blockade enhances the rise in circadian and stress-induced pituitary-adrenal activity. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4935–4943, 1996.

VÁZQUEZ, D. M.; AKIL, H. Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. **Pediatric research**, v. 34, n. 5, p. 646–653, 1993.

VIAU, V. et al. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 137–146, 2005.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575–86, 2013.

WILKIN, M. M. et al. Intermittent physical stress during early- and mid-adolescence differentially alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 2, p. 344–360, 2012.

WONG, E. Y. H.; HERBERT, J. Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. **The European journal of neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 785–92, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **No Title**The Second Decade: Improving Adolescent Health and Development. **Anais**...Geneva, Switzerland: 2001

WULSIN, A. C. et al. Psychoneuroendocrinology Adolescent chronic stress causes hypothalamo – pituitary – adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in

adult female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, p. 109–117, 2016.