

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Fernanda Vieira Rodovalho Callegari**

**Perfil da secreção de progesterona em ratas no  
proestro: uma nova proposta para o controle do  
pico pré-ovulatório de LH**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

**FERNANDA VIEIRA RODOVALHO CALLEGARI**

**Perfil da secreção de progesterona em ratas no  
proestro: uma nova proposta para o controle do  
pico pré-ovulatório de LH**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de doutor em Ciências  
Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete A. Anselmo Franci

**Ribeirão Preto**

**2008**

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.

Rodvalho-Callegari, Fernanda Vieira.

Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH.”; orientadora: Janete Anselmo Franci.—Ribeirão Preto, 2008.

Xxx f. : fig.

Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas - Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo.

1. Hormônio Luteinizante.- 2. Progesterona.- 3. Ovulação. -
4. Adrenal - 5. Ratas Wistar

Fernanda Vieira Rodovalho Callegari

“Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH.”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de doutor em Ciências  
Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico este trabalho:**

A memória do meu amado pai, **Luiz**, que não terá a oportunidade de viver esse momento.

A minha amada mãe, **Margarida**, por representar um “*porto seguro*”, onde sempre encontrei amor, amizade, incentivo e apoio.

Ao **César**, meu grande amor e companheiro, por ter compartilhado intensamente todas as alegrias e dificuldades dessa longa jornada, pelo apoio incondicional e sobretudo por fazer meu coração sorrir. **Amo você!!!!!!!**

Aos meus irmãos, **Daniel, Gisele e Luiz Henrique**, pelo apoio, carinho e amizade que sempre demonstraram.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Prof. Dra. Janete A. Anselmo Franci**, que tem minha admiração e respeito, e a quem agradeço pelos ensinamentos e orientação segura.

A minha irmã, **Gisele**, pelos ensinamentos, apoio e pronta ajuda na execução desse projeto.

À **FAPESP** e a **CAPES** pela oportunidade e pelo patrocínio.

Aos professores e mestres, nossa inspiração, em especial ao professor **Marcos Felipe Silva de Sá**, por quem tenho admiração e respeito.

Ao professor **Celso Franci** por ter aberto as portas de seu laboratório para realização das dosagens hormonais.

As professoras, **Adelina Marta dos Reis**, **Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro** e **Rita de Cássia Menegati Dornelles**, pelas sugestões e críticas pertinentes.

Ao **Ruither de Oliveira Gomes Carolino**, ao **Rogério Azevedo** e a **Sônia Zanon** que com competência e dedicação prestaram uma ajuda inestimável no processamento das dosagens hormonais.

Ao **Maicon Renato Silva** pelo auxílio técnico e cuidado com os animais.

Aos **funcionários** do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e todos profissionais dessa instituição.

Aos amigos, **Fernanda Lima** e **Waldecy de Luca**, pelos momentos inesquecíveis durante o estágio sanduíche na Oregon Health and Science University.

Aos colegas do laboratório de neuroendocrinologia da FORP\_USP, **André, Bruna, Cristiane, Cleyde, Livia, Marcelo, Raphael**, pela disposição em ajudar sempre que necessário.

A todos os **colegas da Pós-graduação** que dividiram comigo esse árduo processo de aprendizado.

A **Lucimeire** pelo bom atendimento aos nossos pedidos burocráticos

A **Suelen Soares Bezerra** pelo auxílio administrativo

Ao **Gustavo Henrique Bianco** pela amizade e incentivo constante.

As eternas e grandes amigas **Larissa Pelá, Patrícia Lizarelli e Débora Oedenkoven** pela amizade valiosa.

Aos **animais** pelo o sacrifício em favor do desenvolvimento científico.

Ao **Centro de Métodos Quantitativos** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEMEQ) pela a consultoria estatística.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse trabalho.



“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

Rodvalho-Callegari, F.V. "**Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH**". 2008. 76 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A ocorrência do pico pré-ovulatório de LH no proestro depende da pré-exposição aos estrógenos seguida da ação aguda da progesterona, hormônio responsável pela deflagração e amplitude desse pico. No entanto, a origem da progesterona durante essa fase do ciclo ainda é incerta. Enquanto alguns estudos sugerem que a adrenal contribui significativamente para secreção de progesterona nesse período, outros apontam a ovário como a fonte principal. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o perfil e a origem da secreção de progesterona durante o proestro e a sua relação com o pico pré-ovulatório de LH. Para tanto, às 7h00 da manhã do proestro ratas Wistar adultas foram submetidas apenas à canulação da veia jugular (controle) ou a esse procedimento seguido pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Sham), ou pela ovariectomia (OVX) ou pela adrenalectomia (ADX). Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 minutos das 11h00 às 13h45 para dosagem de progesterona, estradiol e corticosterona e a cada hora das 14h00 às 19h00 para dosagem desses três hormônios e do LH. Adicionalmente, 7 dias depois da ovariectomia, ratas foram tratadas com óleo milho (OVO) ou 17- $\beta$ -estradiol (OVE) por 3 dias consecutivos, para compreender melhor o padrão de secreção de progesterona pela adrenal e verificar essa secreção se essa secreção poderia ser modulada pelos estrógenos. Um, dois ou três dias depois da última injeção amostras de sangue foram coletadas conforme descrito acima. No proestro, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos controle e Sham em relação ao número de animais que apresentaram o pico pré-ovulatório de LH, ao número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do proestro, bem como às concentrações plasmáticas de LH, progesterona, estradiol e corticosterona, sendo os dados referentes a esses dois grupos apresentados em um único grupo denominado Controle. A secreção de estradiol foi similar nos grupos Controle e ADX e significativamente reduzida no grupo OVX. Como esperado, a secreção de corticosterona foi completamente abolida no grupo ADX, enquanto foi similar nos grupos Controle e OVX. Em todos os grupos experimentais as concentrações basais de progesterona foram em média de 2 pg/mL. Entre às 12h00 e 14h00 o grupo

Controle apresentou um aumento discreto, mas significativo, da secreção de progesterona (pico 1: de  $3,5 \pm 1,1$  para  $22,3 \pm 2,7$  ng/mL), e após às 15h00 um segundo pico de progesterona (pico 2: de  $10,5 \pm 2,2$  para  $43,0 \pm 2,5$  ng/mL), como também o pico de LH ( $25,4 \pm 2,4$  ng/mL). Embora o grupo OVX não tenha apresentado o pico 2 de progesterona (de  $5,7 \pm 2,2$  para  $6,5 \pm 1,2$  ng/mL), o pico de LH ( $26,5 \pm 3,9$  ng/mL) foi similar ao do grupo Controle. Nessas ratas o pico 1 de progesterona foi atenuado para  $12,3 \pm 1,9$  ng/mL. Ambos picos de progesterona 1 e 2 como o pico de LH, foram praticamente abolidos nas ratas ADX (pico 1: de  $2,0 \pm 0,3$  para  $4,5 \pm 0,7$  ng/mL; pico 2: de  $2,2 \pm 0,4$  para  $8,9 \pm 3,6$  ng/mL). Nas ratas OVX, tratadas ou não com estradiol, um pico de progesterona (provavelmente de origem adrenal) foi observado diariamente por volta das 12h00, sendo que a amplitude desse pico não foi influenciada pelo estradiol (OVO:  $19,0 \pm 5,7$  ng/mL; OVE:  $22,9 \pm 5,3$  ng/mL). Esses dados, em conjunto, sugerem que: 1) o pico 1 de progesterona é de origem adrenal e está envolvido na gênese do pico de LH ; 2) esse pico parece ser circadiano uma vez que ratas OVX apresentam um ritmo diário de secreção de progesterona, com um pico por volta das 12h00; 3) o pico 2 de progesterona é de origem ovariana e não é necessário para ocorrência do pico de LH; 4) existe uma comunicação endócrina entre ovário e a adrenal de forma que o ovário participa da regulação da secreção de progesterona pela adrenal e 5) o estradiol não está envolvido na regulação da secreção de progesterona pela adrenal.

**Palavras-chave: Hormônio Luteinizante, Progesterona, Ovulação, Adrenal, Ratas Wistar.**

## ABSTRACT

Rodvalho-Callegari, F.V. **A new proposal for the progesterone control of Luteinizing Hormone surge during proestrus.** 76f. Thesis (Doctoral)– Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

It is well known that the occurrence of preovulatory surge on proestrus depends on estradiol pre-exposure followed by the acute action of progesterone, a hormone responsible for both the onset and amplitude of this peak. However the origin of progesterone during this period is not clear yet. While some authors argue that the adrenals contribute significantly to preovulatory progesterone, others consider the ovary as the main source. The origin of progesterone that regulates the LH preovulatory surge is not clear. Therefore, we determined here the profile and the source of progesterone secretion during proestrus and its relationship with the LH preovulatory surge. At 7:00h of the proestrus day, female rats were either submitted to jugular vein cannulation (control) or to cannulation followed by ovariectomy (OVX), adrenalectomy (ADX), or sham surgery (Sham). Blood samples were collected every 15 minutes between 11 and 13:45 h for progesterone, estradiol and corticosterone measurements and hourly between 14 and 19 h for progesterone, estradiol and corticosterone and LH measurements. Also, to better understand the pattern of adrenal progesterone secretion and to verify if estrogen can modulate this secretion, seven-day ovariectomized rats were treated with corn oil (OVO) or 17- $\beta$  estradiol (OVE) for 3 days. One, two, or three days after the last injection, blood samples were withdrawn as described above. Since no difference was observed between the control and Sham groups with regard to the preovulatory LH surge, the number of oocytes or the plasma concentration of LH, progesterone, estradiol and corticosterone, data from these groups were presented as a single group called Control. Upon proestrus, estradiol secretion was similar between Control and ADX groups and significantly decreased in OVX group. As expected, corticosterone secretion was completely abolished in ADX group, while it was similar between the Control and OVX groups. In all groups basal progesterone levels were around 2pg/mL. In Control group, we observed a significant increase in progesterone secretion, around 12-13h (surge 1: from  $3.5 \pm 1.1$  to  $22.3 \pm 2.7$  ng/mL) and after 15h a second progesterone surge (surge 2: from  $10.5 \pm 2.2$  to  $43.0 \pm 2.5$  ng/mL) as well as LH surge ( $25.4 \pm 2.4$  ng/mL). OVX group failed to present surge 2 of progesterone (from  $5.7 \pm 2.2$  to  $6.5 \pm 1.2$  ng/mL), but LH surge ( $26.5 \pm 3.9$  ng/mL) was identical to that of Control group. In these rats, surge 1 was attenuated to  $12.3 \pm 1.9$  ng/mL. Both progesterone surges 1 and 2 as well as LH surge were absent in ADX group (surge 1: from  $2.0 \pm 0.3$  to  $4.5 \pm 0.7$  ng/mL; surge 2: from  $2.2 \pm 0.4$  to  $8.9 \pm 3.6$  ng/mL). In OVX rats, treated or not with estradiol, a surge

of similar magnitude of progesterone (probably from adrenal) was observed around noon (OVO:  $19.0 \pm 5.7$  ng/mL; OVE:  $22.9 \pm 5.3$  ng/mL). We may conclude that 1) the surge 1 of progesterone is from the adrenal glands and is important for the LH; 2) this surge seems to be circadian since the OVX rats displays a daily rhythm of progesterone secretion, with a surge around 12 h; 3) the surge 2 of progesterone surge originates from the ovary and is not required for the genesis of the LH surge; 4) there is a potential crosstalk between the ovary and the adrenal gland. in a way that ovary influences adrenal progesterone secretion and 5) the adrenal progesterone secretion is not influenced by estradiol levels.

**Key words: Luteinizing Hormone, Progesterone, Ovulation, Adrenal, Wistar Rats.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variações hormonais durante o ciclo estral de ratas.....	22
Figura 2 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal de ratas com ciclos regulares dias.....	23
Figura 3 - Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a ocorrência do pico de LH e ovulação.....	42
Figura 4 - Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro no perfil e na amplitude do pico pré-ovulatório de LH.....	44
Figura 5 - Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de corticosterona e estradiol .....	46
Figura 6 - Perfil individual da secreção de progesterona no dia do proestro de ratas intactas ou ovariectomizadas ou adrenalectomizadas na manhã desse dia.....	48
Figura 7 -. Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de progesterona.....	49
Figura 8 - Representação esquemática do perfil da secreção de progesterona no proestro e a ocorrência do pico de LH.....	50
Figura 9 - Perfil individual da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com estradiol.....	52
Figura 10 - Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com estradiol.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACTH** – Corticotropina

**ADX** - Adrenalectomia

**APO** - Área Pré-Óptica

**APOM**- Área Pré-Óptica Medial

**AT**- Angiotensina

**EAA** - aminoácidos excitatórios

**EM** - Eminência Mediana

**ER** - Receptor para Estrógenos

**ER- $\alpha$**  - Receptor alfa para Estrógenos

**FSH** - Hormônio Folículo Estimulante

**GABA**- ácido gama-aminobutírico

**GnRH** - Hormônio Liberador das Gonadotrofinas

**GnRH-a** - Agonista GnRH

**hMG**-Gonadotrofina menopausal humana

**HPG** - Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

**LH** - Hormônio Luteinizante

**NA** - Noradrenalina

**NPY** - Neuropeptídeo Y

**NT** - Neurotensina

**OVX** - Ovariectomia

**P-450 scc**- Desmolase

**PR** - Receptor para Progesterona

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TBE**- Tribromoetanol

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 A rata como modelo experimental.....	19
1.1.1. As fases do ciclo estral.....	20
1.1.2. O perfil hormonal do ciclo estral.....	21
1.1.3. Determinação das fases do ciclo estral.....	23
1.2. Controle da secreção de Gonadotrofinas.....	24
1.3 Regulação do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas pelos esteróides gonadais.....	24
1.3.1: Retroalimentação positiva e negativa do estradiol na regulação do pico de gonadotrofinas.....	25
1.3.2: Retroalimentação positiva e negativa da progesterona na regulação do pico de gonadotrofinas.....	27
1.4. Origem da progesterona secretada durante a fase folicular do ciclo ovariano.....	31
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
2.1. Animais.....	34
2.2. Planejamento experimental.....	34
2.2.1. Experimento I: Perfil e a origem da secreção de progesterona em ratas.....	34



2.2.2. Experimento II: Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas e a influência das concentrações estrogênicas.....	35
2.3. Ciclo estral.....	35
2.4. Anestesia.....	36
2.5. SHAM Cirurgia.....	36
2.6. Adrenalectomia.....	36
2.7. Ovariectomia.....	37
2.8. Cirurgia da canulação da veia jugular.....	37
2.9. Cuidados pós-cirúrgicos.....	37
2.10. Reposição Hormonal.....	37
2.11. Ovulação.....	38
2.12. Colheitas sanguíneas.....	38
2.13. Dosagem hormonal.....	38
2.14. Análise estatística.....	40
<b>3 .RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a ocorrência do pico de LH e ovulação.....	41
3.2. Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro no perfil e na amplitude do pico pré-ovulatório de LH .....	43
3.3. Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de corticosterona e estradiol.....	45
3.4. Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de progesterona.. .....	47
3.5. Correlação do perfil da secreção de progesterona no proestro e a ocorrência do pico de LH.....	50

3.6. Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas e a influência das concentrações estrogênicas.....	51
4. DISCUSSÃO.....	54
5.CONCLUSÕES.....	65
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

Entre os eventos críticos da função reprodutiva feminina estão, o processo de crescimento e maturação dos folículos ovarianos, a ovulação e o ciclo de vida do corpo lúteo. Esta série coordenada de eventos, conhecida na mulher como ciclo menstrual, e na maioria dos mamíferos como ciclo estral, está sob controle muito preciso de uma série de variações hormonais determinadas tanto por fatores centrais como periféricos. Embora um grande número de estudos sobre essa questão tenha sido publicado nas últimas décadas, sendo a maioria deles baseados em experimentos com ratas, os mecanismos que coordenam a função reprodutiva não estão ainda bem esclarecidos.

**1.1) A Rata Como Modelo Experimental:** O ciclo reprodutivo da rata, embora tenha algumas diferenças com o ciclo da mulher, apresenta também importantes semelhanças. Enquanto o marco do ciclo menstrual em mulheres e em primatas superiores é a menstruação, nas ratas e na grande maioria dos animais este marco é o período da ovulação, caracterizado pela receptividade sexual (cio) e denominado estro (do grego *oistrus*: agitação), razão pela qual o ciclo reprodutivo é denominado de ciclo estral (FREEMAN, 1994). A duração do ciclo também varia entre essas espécies: enquanto a mulher apresenta um ciclo menstrual de aproximadamente 28 dias, o ciclo estral das ratas é, no geral, de 4 dias.

Na maioria dos animais a ovulação ocorre em consequência das variações nas condições ambientais: razão luz/escuro, disponibilidade de alimento, quantidade de chuva, etc (ciclos sazonais), como no caso dos ovinos, caninos, equinos, bovinos e várias espécies de primatas, ou em consequência do coito, como na maioria dos felinos, camelídeos, coelhas e furões fêmeas. No entanto, a rata faz

parte das poucas espécies que, em semelhança à mulher, ovulam cíclica e espontaneamente, independentemente de alterações sazonais ou de atividade sexual. Além disso, a rata apresenta um perfil de secreção hormonal bastante parecido àquele observado na mulher. Essas semelhanças, aliadas ao fato das ratas terem um ciclo de curta duração e de serem animais de pequeno porte e de fácil manutenção (o que permite a utilização de um grande número de animais para cada estudo), fazem da rata um excelente modelo experimental para os estudos de reprodução. Por abranger todas essas características esse animal foi adotado como modelo para o nosso estudo, motivo pelo qual descreveremos abaixo o ciclo estral dessa espécie.

**1.1.1) As fases do ciclo estral:** A palavra “estro” foi utilizada por Heape, em 1900, para definir a fase do ciclo em que a rata é receptiva ao macho. As outras fases do ciclo são denominadas proestro, metaestro e diestro. O proestro precede o estro e dura cerca de 12 a 14 horas, estendendo-se do início da manhã até o início da noite, quando a rata já começa a exibir comportamento de lordose característico da fase de estro. É no final da tarde do proestro que ocorrem os picos hormonais pré-ovulatórios. A fase de estro, que se segue ao proestro, dura de 25 a 27 horas. Apesar da longa duração dessa fase, a rata só é receptiva ao macho do início da noite até a madrugada (quando ocorre a ovulação), período comumente referido como estro comportamental. Após o estro, não ocorrendo concepção, segue-se um período de recuperação denominado metaestro, com duração de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro, que dura de 55 a 57 horas. Segue-se a essa fase um novo proestro (FREEMAN, 1994; HEAPE, 1900).

**1.1.2) O perfil hormonal do ciclo estral:** O perfil da secreção de gonadotrofinas, estradiol, progesterona e prolactina durante o ciclo estral foi descrito por vários autores (FREEMAN, 1994). A concentração plasmática de Hormônio Luteinizante (*LH*) durante o ciclo estral é a mais baixa na madrugada do estro, imediatamente após a ovulação e permanece baixa durante o metaestro e o diestro até o início da tarde do próximo proestro. Então, por volta das 15h00 horas, ela aumenta rapidamente para um pico ao redor das 17h00-18h00 horas que induz à ovulação cerca de 8 horas depois. Após o pico, a concentração desse hormônio diminui rapidamente até alcançar os seus valores basais na madrugada do estro.

O padrão de secreção do Hormônio Folículo Estimulante (*FSH*) no ciclo estral é similar ao de *LH*. Após o pico pré-ovulatório, a concentração de *FSH* também diminui rapidamente, mas, diferentemente do *LH*, há um pico secundário ao redor das 3 horas da madrugada do estro. Então a concentração começa a diminuir até atingir valores basais no final da tarde do estro (SMITH, FREEMAN; NEIL, 1975).

A concentração plasmática de *estradiol* é baixa entre o estro e manhã do metaestro e começa a aumentar na tarde dessa fase, alcançando valores mais altos ao redor do meio-dia do proestro, caindo no fim da tarde e atingindo valores basais no início da madrugada do estro. Essas variações funcionam como gatilho para uma cascata de eventos que induzem os picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas e prolactina (SMITH; FREEMAN; NEIL, 1975).

A *progesterona* apresenta um aumento de suas concentrações plasmáticas durante a tarde de proestro e o início do estro. Esse aumento ocorre quase simultaneamente com aquele do pico pré-ovulatório de *LH*, atinge o pico juntamente com o do *LH* e retorna às concentrações basais na manhã do estro. Esse pico de progesterona é de origem folicular. Um segundo pico desse hormônio,

de origem luteal, inicia-se ao meio-dia do metaestro, mantém-se na madrugada do diestro e diminui para concentrações basais no início da manhã desse dia (SMITH; FREEMAN; NEIL, 1975) (Fig. 1).

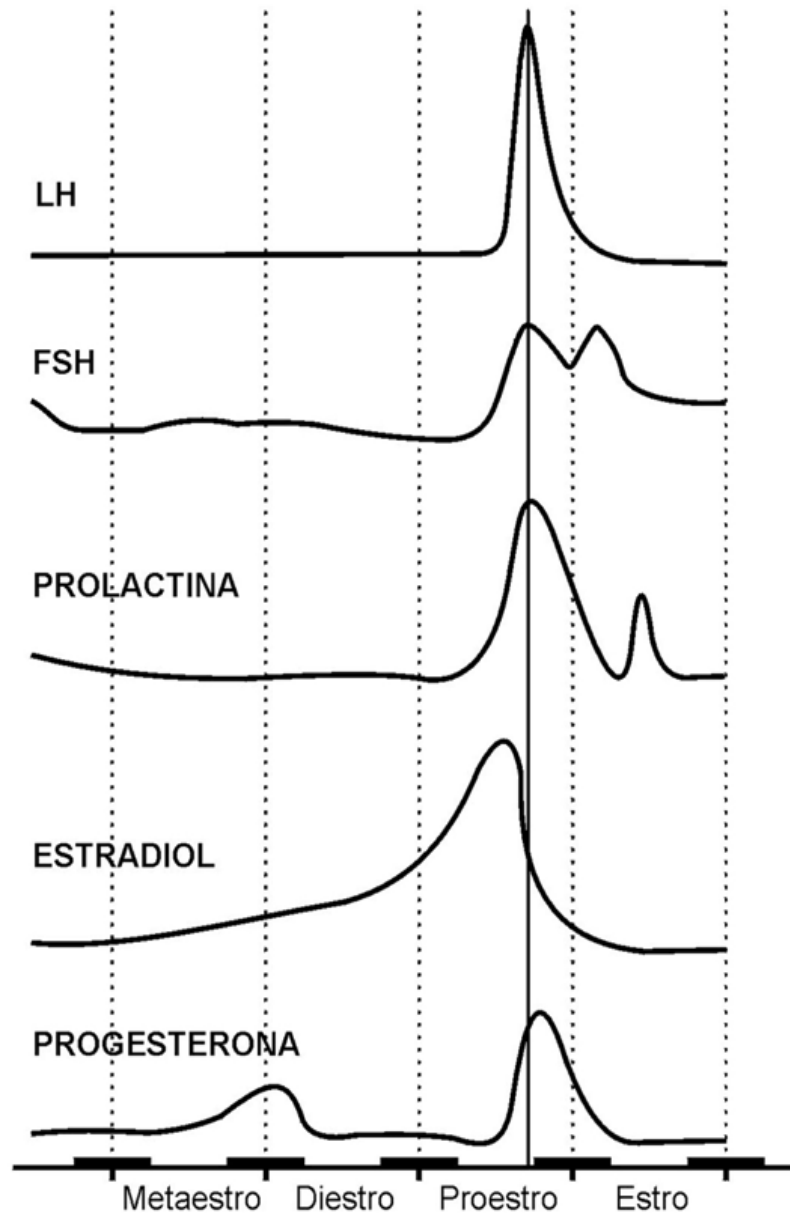


Figura.1: Perfil de secreção de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo claro-escuro (12h/12h). Na parte inferior do gráfico são apresentadas as fotomicrografias do epitélio vaginal característico de cada fase do ciclo estral. (ANSELMO-FRANCI JA; SZAWKA RE, 2005).

**1.1.3) Determinação das fases do ciclo estral:** Cada uma das fases do ciclo estral é facilmente determinada pela análise diária do tipo de células que descama do epitélio vaginal, tecido altamente responsivo às variações da secreção de estradiol e progesterona acima descritas. No proestro, observa-se um número abundante de células epiteliais nucleadas, resultado da estratificação e proliferação celular induzida pelos estrógenos, cuja concentração atinge o máximo no final da manhã do proestro. No estro, os efeitos máximos das altas concentrações de estradiol traduzem-se pela corneificação celular observada no esfregaço vaginal desta fase. No metaestro, quando as concentrações de estradiol permanecem baixas, ainda persistem algumas poucas células corneificadas e outras nucleadas, já acompanhadas por um grande número de leucócitos. No diestro, o esfregaço vaginal apresenta apenas um infiltrado leucocitário, sem células epiteliais, consequência da ação da progesterona, bem como das baixas concentrações de estradiol presentes no estro e metaestro (LONG; EVANS, 1922) (Fig. 2).

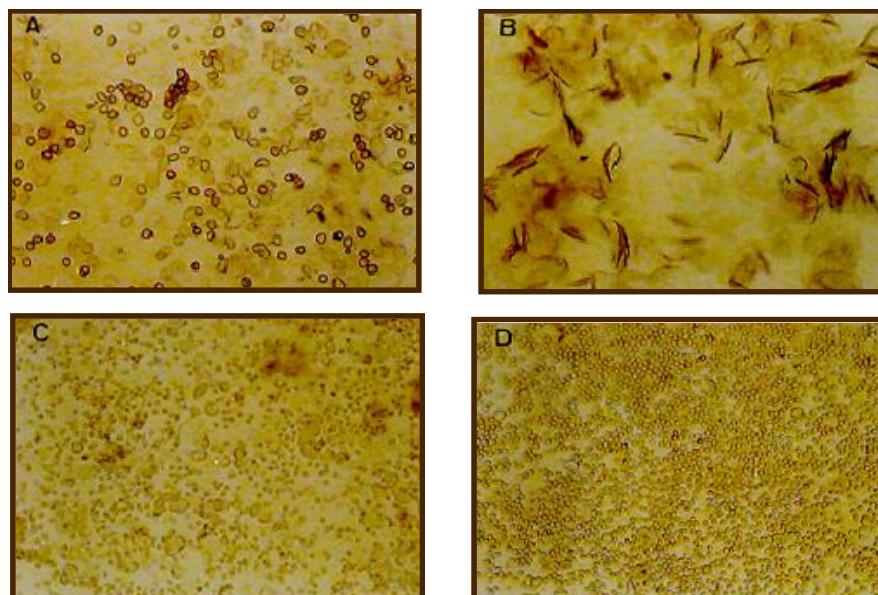


Figura 2-Fotomicrografia de esfregaço vaginal de ratas com ciclos regulares de 4 dias. Todos os esfregaços foram colhidos às 9:00 horas da manhã. A: Proestro; B: Estro; C: Metaestro; D: Diestro. Objetiva 10.

**1.2) Controle da secreção de Gonadotrofinas:** A liberação cíclica e pulsátil das gonadotrofinas, que garante que o processo reprodutivo ocorra com sucesso, está sob a ação reguladora do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (SCHALLY et al., 1971). O GnRH é um decapeptídeo sintetizado em corpos celulares de neurônios distribuídos difusamente em áreas hipotalâmicas e secretado em pulsos nos terminais neuroendócrinos localizados na zona externa da eminência mediana (CARMEL; ARAKI; FERIN, 1976). Uma vez secretado, o GnRH é transportado pelos vasos porta até a adenohipófise, onde modula a síntese e a secreção das gonadotrofinas. Em fêmeas, o pico de GnRH no proestro (CHING, 1982; SARKAR; CHIAPPA; FINK, 1976; XIA et al., 1992) fornece o gatilho neural para os picos pré-ovulatórios de LH e FSH, induzindo assim a ovulação e a perpetuação da espécie.

Os corpos celulares dos neurônios GnRH estão distribuídos difusamente por várias estruturas cerebrais (BENNET-CLARK; JOSEPH, 1982; IBATA et al., 1979; KING et al., 1985; NAIK, 1975). Enquanto em primatas, incluindo humanos, esses neurônios estão mais densamente concentrados no núcleo arqueado do hipotálamo, em roedores a maior concentração se dá na área pré-óptica (APO), estrutura localizada imediatamente anterior ao hipotálamo (KING et al., 1985; SILVERMAN; KREY; ZIMMERMANN, 1979).

**1.3) Regulação do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas pelos esteróides gonadais:** A liberação cíclica de LH e FSH durante o ciclo estral é resultado de um controle de retroalimentação ora negativa, ora positiva dos esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG).



### **1.3.1) Retroalimentação positiva e negativa do estradiol na regulação do pico de gonadotrofinas:**

Os efeitos do estradiol na retroalimentação positiva e negativa da secreção de gonadotrofinas são bem estabelecidos e uma revisão compreensiva desse tema, realizada por Everett, apareceu na literatura científica já em 1964 (EVERETT, 1964), sendo esse conceito confirmado por estudos subseqüentes.

**Retroalimentação negativa:** O aumento da secreção de gonadotrofinas que ocorre após a ovariectomia ou após a menopausa, bem como a queda de secreção desses hormônios após a reposição estrogênica, nas situações acima citadas, refletem a ausência ~~(constituem exemplos clássicos)~~ do mecanismo de retroalimentação negativa. Esse mecanismo é bastante rápido e ocorre na maior parte de um ciclo reprodutivo. Durante toda a fase lútea e a maior parte da fase folicular, concentrações baixas ou moderadas de estrógenos são capazes de inibir a síntese e a liberação de GnRH e de gonadotrofinas (CEMEROGLU et al., 1998, CHONGTHAMMAKUM; TERASAWA, 1993). Essa retroalimentação negativa dos estrógenos ocorre na adenohipófise, no hipotálamo/Área pré-óptica medial (APOM) e em neurônios de outras áreas que são responsivos aos estrógenos. Na adenohipófise, os estrógenos alteram a síntese de seus próprios receptores e dos receptores para o GnRH de forma a inibir a liberação de LH. No entanto, neurônios do sistema nervoso central (SNC) parecem constituir o alvo mais importante para a ação dos estrógenos nesse mecanismo inibitório (para referências ver HERBISON, 1998; LEVINE, 1997).

**Retroalimentação positiva:** O mecanismo de retroalimentação positiva ocorre tipicamente no período pré-ovulatório. O aumento gradual e depois agudo da secreção de estrógenos nesse período estimula, na hipófise, a proliferação

de gonadotrofos e a síntese de LH e de receptores para o GnRH e para os estrógenos. A literatura preconiza que, além desses efeitos, no hipotálamo os estrógenos aumentam a síntese e posteriormente a liberação de GnRH (para referências ver HERBISON, 1998). Enquanto o mecanismo de retroalimentação negativa é rápido, ocorrendo em minutos, o efeito positivo dos estrógenos tem uma longa latência (horas ou dias). Esses mecanismos se sobrepõem durante o ciclo reprodutivo de forma que, quando em presença de concentrações altas de estrógenos por pelo menos 36 horas em primatas, 15 horas em ratas, ou 58 a 68 horas em mulheres, o efeito inibitório desses hormônios é substituído pelo excitatório (LIU; YEN, 1983; MOENTER; CARATY; KARSCH, 1990; SARKAR; FINK, 1980; XIA et al., 1992).

Em ratas, o mecanismo de retroalimentação positiva, que induz o pico pré-ovulatório, é bem demonstrado. Durante a fase mais lenta de secreção de estrógenos ocorre a síntese de GnRH, o que prepara os estoques desse neurohormônio para o pico. Isso é demonstrado em experimentos que mostram que a expressão do RNAm para o GnRH na rata é baixa durante o estro, metaestro e na manhã do diestro (quando as concentrações de estrógenos ainda são baixas), e começa a aumentar ainda no diestro em função do aumento da secreção de estrógenos pelos folículos em crescimento, sendo a máxima na manhã do proestro, período em que ocorre o aumento rápido pré-ovulatório de estrógenos (GORE; ROBERTS, 1995; LEVINE et al., 1995; PETERSEN et al., 1995). Nesse período, o aumento de síntese não é acompanhado por um aumento de liberação, o que colabora para a estocagem do GnRH. Além dos estrógenos estimularem a síntese de GnRH e inibirem a sua liberação, eles diminuem a sua degradação, o que causa um acúmulo adicional dos estoques intracelulares deste neuropeptídeo nos neurônios

GnRH. De fato há, na Eminência Mediana (EM), um acúmulo de GnRH recentemente sintetizado imediatamente antes do pico pré-ovulatório (WISE; RANCE; BARRACLOUGH, 1981). Esse efeito estimulador dos estrógenos no pico de LH pode também ser demonstrado pela observação dos picos diários de LH que ocorrem em ratas, macacas ou ovelhas ovariectomizadas quando tratadas com estradiol (LEGAN; COON; KARSCH, 1975). Além disso, o bloqueio do aumento do estradiol na fase de diestro (ASHIRU; BLAKE, 1980; NEILL; FREEMAN; TILISON, 1971), bem como a administração de antagonista (LABHSETWAR, 1970; SHIRLEY; WOLINSKY; SCHWARTZ, 1968), ou de anticorpos para estradiol (FERIN et al., 1969) inibem o pico pré-ovulatório de LH. Assim, tanto o pico de LH do proestro como a secreção circadiana nas ratas ovariectomizadas com reposição hormonal, são dependentes de estradiol.

Embora tenha sido considerado que o estradiol seja capaz de induzir picos de LH, esse conceito tem sido questionado por dados que demonstram que é a progesterona de fato a responsável pela gênese dos picos de LH. Esta questão será discutida no item abaixo, que trata das ações da progesterona sobre o eixo HPG.

### **1.3.2: Retroalimentação positiva e negativa da progesterona na regulação do pico de gonadotrofinas.**

A progesterona tem sido reconhecida como um importante componente do sistema de retroalimentação ovariano sobre a secreção de gonadotrofinas, exercendo tanto efeitos facilitatórios como inibitórios na secreção desses hormônios.

**Retroalimentação negativa:** A administração de progesterona suprime as concentrações elevadas de LH (HAGIHARA et al., 1992; WIEGAND, TERESAWA, BRIDSON, 1978) após a ovariectomia e em várias espécies também

bloqueia a estimulação dos picos de GnRH (KASA-VUBU et al., 1992; SKINNER et al., 1998) e LH (DIERSCHKE et al., 1973, SCARAMUZZI et al., 1971) induzidos pelo estradiol. Esses são exemplos clássicos do mecanismo de retroalimentação negativa da progesterona. Em condições fisiológicas, o principal efeito inibitório da progesterona ocorre durante a fase lútea do ciclo reprodutivo, quando o aumento das concentrações de progesterona suprime, direta ou indiretamente, os picos de gonadotrofinas nas espécies que ovulam espontaneamente, incluindo a espécie humana (GIBSON; NAKAJIMA; McAULIFFE, 1991; LERANTH et al., 1992). Dessa forma, a ação de retroalimentação negativa da progesterona previne a recorrência do pico de LH nos dias subseqüentes à ovulação (FREEMAN; DUPKE; CROTEAU, 1976). Esse efeito ocorre por diminuição da freqüência de pulsos de LH (SOULES et al., 1984; WITKIN; PADEN; SILVERMAN, 1982), provavelmente por indução de uma diminuição da freqüência de liberação de GnRH (KARSCH, 1987), associada a um decréscimo no número de receptores para o GnRH na adenohipófise (WITCHER et al., 1984). A retroalimentação negativa, que mantém as concentrações de gonadotrofinas baixas no estro, diestro e na manhã de proestro, depende de um balanço entre as concentrações de estrógenos e progesterona. Animais castrados perdem as ações dessa retroalimentação, resultando num aumento da freqüência de pulsos e da concentração de LH, provavelmente por exacerbação de outros sistemas envolvidos na liberação de GnRH como, por exemplo, os aminoácidos excitatórios (EAA), o neuropeptídeo Y (NPY), a neurotensina (NT), a noradrenalina (NA), a angiotensina (AT), etc. A participação estimuladora dessas substâncias tem sido mostrada em vários estudos (COLOMBO; RITTERMAN, 1983; NAVARRO; CABRERA; DONOSO, 1994; SAITOH; SILVERMAN; GIBSON, 1991).

**Retroalimentação positiva:** Classicamente, a ação de retroalimentação positiva dos estrógenos sobre o eixo HPG tem sido considerada o único sinal ovariano responsável pela deflagração do pico de LH. No entanto, esse conceito pode ser questionado com base em fortes evidências que demonstram ser de fato a ação da progesterona e/ou a ativação dos seus receptores (PR) os elementos responsáveis pela gênese dos picos de LH “induzidos pelos estrógenos”. O fato de o pico de LH induzido pelo estradiol ser menor tanto em duração como em amplitude, quando comparado ao pico pré-ovulatório do proestro (para referências ver MASHEH; BRANN, 1998), associado à observação de que a administração do antagonista da progesterona, RU-486, abole tanto o pico de LH do proestro (BAUER-DANTOIN et al., 1993) como o pico de GnRH/LH induzido pelo estradiol (SKINNER et al., 1998), sugere que esse aumento foi de fato induzido pela progesterona e não pelo estradiol. Essa hipótese é reforçada por estudos que utilizaram como modelo camundongos fêmeas nocautes para PR. Nesses animais, os picos de LH foram ausentes tanto no proestro como após a ovariectomia seguida pela reposição estrogênica com regimes que induziram prontamente o pico de gonadotrofinas nos animais controles (CHAPELL et al., 1999). Assim, supõe-se que o estradiol secretado na fase folicular seja de grande importância para a ocorrência dos picos de LH por aumentar a síntese de receptores para a progesterona (uma ação já bem conhecida dos estrógenos) nos neurônios da APO, e em vários outros grupos neuronais envolvidos na gênese do pico de GnRH (BETHEA et al., 1992; DONCARLOS; GREENE; MORELL, 1989; ROMANO; KRUST; PFAFF, 1989) permitindo, assim, que esta induza a liberação de LH.

A maior dificuldade em se entender o significado fisiológico dos efeitos de retroalimentação positiva da progesterona no pico de LH tem sido a ausência de níveis significativamente elevados desse hormônio no período que antecede a deflagração do pico pré-ovulatório de LH (FEDER; BROWN-GRANT; CORKER, 1971; KALRA; KALRA, 1974; KALRA, 1993; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Sendo assim, dois modelos de ação da progesterona são propostos. O primeiro envolve a possibilidade de que os estrógenos induzam no cérebro a síntese “de novo” de progesterona (MICEVYCH et al., 2003), provavelmente nas células gliais (SINCHAK et al., 2003), o que forneceria uma exposição adequada do sistema de neurônios GnRH à progesterona no período pré-pico, mesmo na ausência de concentrações periféricas significantes desse hormônio. A segunda proposta sugere que, inicialmente, a transativação dos PR não ocorre como consequência da ligação da progesterona, mas ao contrário, resulta da ativação neural intracelular do sistema de segundo mensageiro que pode transativar os receptores de uma maneira independente do ligante (LEVINE, 1997). Nesse modelo, o aumento nas concentrações de estradiol iniciaria ou aumentaria a expressão de PR nas células que se projetam para os neurônios GnRH. Se esses PR fossem transativados por outros estímulos que não a progesterona, eles poderiam iniciar a regulação gênica apropriada para o pico. Esse modelo poderia explicar porque o bloqueio dos PR na ausência de níveis significativos de progesterona inibe o pico de LH. Além disso, elucidaria o mecanismo pelo qual a progesterona ovariana, secretada concomitantemente com o pico de LH, poderia retroalimentar e agora ativar os PR de uma forma dependente do ligante e amplificar o pico de GnRH.

No entanto, dados obtidos por nós, em trabalho anterior (CALLEGARI, 2004), sugerem que um terceiro modelo poderia explicar a ação de retroalimentação positiva da progesterona na gênese do pico de LH. Nesse trabalho, observamos que ratas ciclando regularmente apresentavam, além do aumento da secreção de progesterona de origem lútea, que ocorre juntamente com o pico de LH, um pico discreto, mas significativo da secreção desse hormônio entre 12h00 e 1300h do proestro. Esse pico de progesterona não tem sido descrito na literatura. Nossa hipótese é a de que esse pico de progesterona deva ser de origem adrenal, visto que em ratas, no momento que antecede o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, ocorre um aumento da progesterona no sangue venoso da adrenal, o qual é muito maior do que aquele do sangue venoso do ovário (SHAIKH; SHAIKH, 1975), sugerindo que a progesterona de origem adrenal pode ser o elemento deflagrador do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas e ovulação.

#### **1.4. Origem da progesterona secretada durante a fase folicular do ciclo ovariano:**

Estudos em humanos e animais suportam a hipótese de que a secreção pré-ovulatória de progesterona, necessária para a deflagração do pico de LH se dá principalmente na adrenal. Em humanos, as concentrações de progesterona na veia adrenal são maiores do que na circulação periférica (PETERSON, 1971) e a desmolasase (P-450 scc), enzima necessária para a síntese de progesterona, está presente não somente no corpo lúteo e na teca interna do folículo ovariano mas também na adrenal (MILLER, 1998). Além disso, apesar da secreção de progesterona durante a fase folicular, assim como na fase lútea, ocorrer em pulsos e sua produção a partir do ovário ser intimamente dependente da ação do

LH, mulheres com ciclos menstruais normais não apresentam correlação entre os pulsos de LH e progesterona. Similarmente, as concentrações séricas e a pulsatilidade da progesterona na fase folicular do ciclo menstrual não diferem entre as mulheres com ciclos normais e anovulatórios. Mesmo quando a pulsatilidade de LH, nas mulheres anovulatórias, é efetivamente restaurada pela administração de citrato de clomifeno, as concentrações e a pulsatilidade da progesterona permanecem inalteradas (JUDD et al., 1992). Esses dados sugerem que pelo menos parte da progesterona secretada durante a fase folicular do ciclo é originada em outro local (que não o ovário), o qual não é influenciado pelo LH. Outro fato interessante é que, em ciclos de reprodução assistida (RA), a incidência de elevação pré-ovulatória da progesterona nas mulheres que fizeram e não fizeram uso do agonista GnRH (GnRH-a) é semelhante (EDELSTEIN et al., 1990), sendo a administração de dexametasona altamente efetiva em bloquear esse efeito (ELDAR-GEVA et al., 1998). Da mesma forma, mulheres que utilizam dexametasona para tratamento de hiperplasia adrenal de início tardio e que são submetidas à estimulação ovariana com hMG, sem dessensibilização prévia por GnRH-a, não apresentam na fase pré-ovulatória aumento nas concentrações séricas de progesterona (ELDAR-GEVA et al., 1998). Esses dados sugerem que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) parece estar intimamente envolvido na secreção pré-ovulatória de progesterona.

Estudos em animais também sugerem um importante papel da progesterona secretada pela adrenal na deflagração do pico pré-ovulatório de LH. A administração do RU-486 a macacas ovariectomizadas, tratadas com estradiol (com concentrações estrogênicas próprias da fase folicular média), provoca, 3 horas depois, um decréscimo agudo na secreção de LH. Uma vez que as macacas são



ovariectomizadas, sugere-se que esse antagonista tenha bloqueado a ação da progesterona originada em outra fonte que não o ovário, provavelmente a adrenal (XIAO et al., 1997). Reforçando esses dados, a administração de corticotropina (ACTH) a ratas ciclando ou ovariectomizadas tratadas com estradiol provoca, 30 minutos depois, um aumento significativo na secreção progesterona e de corticosterona, que culmina com aumento da secreção de LH (cerca de 6 horas depois da injeção). Esse efeito é totalmente abolido tanto pela adrenalectomia como pela administração de RU-486 e não é observado em ratas que apresentam baixos níveis estrogênicos (PUTNAM; BRANN; MAHESH, 1991).

Sendo assim, investigações sobre esse pico de progesterona que ocorre entre 12h00 e 13h00 (CALLEGARI, 2004), do proestro tornam-se importantes, uma vez que ele pode estar relacionado com o sucesso da ovulação e que alterações no seu perfil podem estar relacionadas a casos de infertilidade. Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi investigar o perfil e a origem da secreção de progesterona em ratas durante o proestro e a sua relação com o pico pré-ovulatório de LH. Para esclarecer melhor o local de origem da secreção de progesterona e os sinais endócrinos envolvidos na sua regulação, nós também examinamos o padrão da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas 7 dias antes tratadas ou não com estradiol.

**2.1) Animais:** Foram utilizadas ratas Wistar adultas, com peso corporal de 300g, provenientes do Biotério Central do Campus USP de Ribeirão Preto. Os animais mantidos em gaiolas coletivas, num ambiente com temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (12 horas de claro e 12 horas de escuro, luzes acesas às 6h00) controladas, com água e ração oferecidas “ad libitum”. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (Licença nº 060/2004) e realizados de acordo com o “National Research Council’s (NRC) Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (Institute for Laboratory Animal Research of the National Academy of Science, Bethesda, MD; 1996).

## **2. 2) Planejamento experimental**

### **2.2.1) Experimento I: Perfil e a origem da secreção de progesterona em ratas durante o proestro.**

O objetivo desse experimento foi determinar a contribuição da progesterona secretada pelo ovário e/ou pela adrenal na gênese do pico pré-ovulatório de LH.

Ratas fêmeas adultas Wistar apresentando 3 ciclos estrais regulares foram submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:h00 da manhã do proestro (grupo controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), pela ovariectomia (grupo OVX) ou pela adrenalectomia (grupo ADX). Imediatamente após o término dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos em ambiente silencioso. Coletas seriadas foram realizadas a cada 15 minutos das 11h00 às 14h00 para melhor determinar o perfil de secreção de progesterona nesse período e a cada hora das 14h00 às 19h00 para traçar o perfil do pico pré-ovulatório de LH, como do aumento de progesterona. Das 11h00 às 14h00, as amostras foram de 150  $\mu\text{L}$ , enquanto que das 14h00 às 19h00, de 300  $\mu\text{L}$ . Às 9h00 da manhã seguinte, as ratas foram sacrificadas por decapitação e os ovidutos retirados para a

verificação da presença de óvulos. Imediatamente após as colheitas sanguíneas, o plasma foi separado para posterior dosagem hormonal. Nas amostras colhidas no primeiro intervalo de tempo foram realizadas as dosagens de progesterona e corticosterona, e nas amostras colhidas no segundo intervalo de tempo, além desses dois hormônios, também foi dosado o LH.

### **2.2.2) Experimento II: Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas e a influência das concentrações estrogênicas.**

O objetivo deste experimento foi estudar o perfil da secreção de progesterona pela adrenal e se este poderia ser modulado pelas concentrações estrogênicas.

Ratas Wistar adultas apresentando três ciclos estrais regulares foram OVX na tarde do metaestro. A partir do quarto dia após a OVX os animais foram submetidos à administração subcutânea de óleo de milho (Grupo OVO) ou de 17- $\beta$ -estradiol (Grupo OVE), por 3 dias consecutivos, às 9h00 da manhã. Na tarde do dia anterior à colheita sanguínea, uma cânula foi implantada na veia jugular. Um, dois ou três dias após a última injeção (D1, D2 e D3), amostras de sangue (150 $\mu$ L) foram coletadas a cada 15 min, das 11h00 às 14h00, e a cada hora, das 14h00 às 19h00, para dosagem de progesterona.

**2.3) Ciclo estral:** Em ambos experimentos, as ratas foram mantidas em caixas plásticas (40 x 32 x 17cm), em grupo de cinco por caixa, e o ciclo estral foi acompanhado diariamente por meio do esfregaço vaginal, colhido por volta das 9h00 da manhã, e analisado a fresco em microscópio óptico.

**2.4) Anestesia:** Para a realização de qualquer procedimento cirúrgico do experimento I, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução

de Tribromoetanol (TBE, Aldrich Chem Comp Inc) 2,5% em solução salina, na dose de 1 ml/100g de peso. Optamos pelo uso desse anestésico, pois ele não afeta a amplitude nem o horário de deflagração do pico de LH (POLETINI et al., 2003). Para os procedimentos cirúrgicos do experimento II, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de ketamina (0,08mL/100g; Agner) e xilasina (0,07mL/100g; Coopers do Brasil) para a ovariectomia, e com TBE para a canulação da veia jugular.

**2.5) Cirurgia Fictícia (SHAM):** As ratas foram submetidas a uma incisão mediana, com aproximadamente 3cm de extensão, na transição tóraco-lombar, abrangendo pele e subcutâneo. O acesso a cavidade peritoneal foi obtido por meio de incisões laterais, com 0,5 cm de extensão, abrangendo parede muscular e peritônio parietal. Tanto os ovários como as adrenais foram cuidadosamente manipulados com o fórceps, sem o comprometimento da superfície, inervação e irrigação dos órgãos.

**2.6) Adrenalectomia:** As ratas do experimento I foram adrenalectomizadas bilateralmente, utilizando as incisões descritas no item 2.5, por meio das quais as adrenais foram cuidadosamente isoladas e retiradas com o auxílio de um fórceps.

**2.7) Ovariectomia:** As ratas do experimento I foram ovariectomizadas bilateralmente, utilizando as incisões descritas no item 2.5, enquanto para as ratas do experimento II foram utilizadas incisões laterais de cerca de 1cm. Os ovários e o útero foram cuidadosamente expostos e após ligadura entre essas duas estruturas, os ovários foram retirados.

**2.8) Canulação da veia jugular:** Após a anestesia, uma cânula de Silastic (Silastic, Dow Corning, id: 0,51mm e od: 0,94) foi introduzida na veia jugular externa, conforme técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). Esta cânula foi mantida preenchida com uma solução fisiológica heparinizada estéril (200 U.I de heparina sódica/mL de solução salina 0,9%) até o início das colheitas sangüíneas.

**2.9) Cuidados pós-cirúrgicos:** É reconhecido que qualquer intervenção cirúrgica poderá provocar efeitos prolongados, que afetarão o resultado final do experimento. Sendo assim, após as cirurgias os animais receberam para controle da dor, uma dose de antiinflamatório não hormonal (Banamine Injetável/ SCHERING-PLOUGH), na dose de 0,3 mL/animal, via subcutânea, e para profilaxia da infecção, uma dose de Pentabiótico Veterinário (FONTOURA-WYETH S.A), na dose de 0,2mL/animal, via intramuscular. Para os animais adrenalectomizados, uma solução de NaCl 0,9% foi oferecida para beber.

**2.10) Reposição Hormonal:** *As ratas ovariectomizadas do grupo OVE, do experimento II, receberam injeções subcutâneas de 17 $\beta$ -Estradiol (E-8875, Sigma), utilizando-se óleo de milho como veículo, na dose de 5 $\mu$ g/0,2mL/rata, às 9h da manhã, durante três dias consecutivos. O grupo controle (OVO) recebeu as mesmas injeções, apenas do veículo (óleo).*

**2.11) Ovulação:** Na manhã do estro, após decapitação, os ovários foram retirados, dissecados, e as trompas de falópio separadas e colocadas numa

lâmina de vidro contendo solução fisiológica. Após a divulsão do tecido adjacente, e a exposição adequada de toda a trompa, uma segunda lâmina de vidro foi colocada sobre a primeira e ambas foram adaptadas em uma peça adequada que permitiu a compressão das mesmas. A presença de óvulos foi verificada em microscópio, por transparência, através das paredes das trompas.

**2.12) Colheitas sangüíneas:** Vinte minutos antes do início das colheitas sangüíneas, uma extensão de tubo de polietileno (PE-50) com aproximadamente 40 cm de comprimento, preenchida com solução de salina estéril, foi conectada à cânula de Silastic, que então foi lavada para remoção de eventuais coágulos. Em ambiente silencioso, as colheitas foram realizadas em seringas heparinizadas. Após cada colheita, um volume igual de solução de salina estéril foi repostado. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C, durante 15 minutos, a 1200 g, e o plasma separado e estocado a -20°C para posterior dosagem hormonal.

**2.13) Dosagens Hormonais:** As dosagens hormonais foram realizadas no laboratório de Neuroendocrinologia do Prof Dr Celso Rodrigues Franci, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, utilizando o método de radioimunoensaio (RIE). Para o LH, foi utilizado um Kit específico fornecido pelo National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK; Torrance, CA, USA). O anticorpo primário foi o anti-rat LH-S10 e a preparação padrão o LH - RP3. A dose mínima detectável foi de 0,2 ng/ml e o erro intra-ensaio de 4%. As concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol foram determinadas por meio dos kits da MAIA (BioChem ImmunoSystem, Itália S.P.A), e o erro intra e inter-ensaio foi de 2,5% e 3,2% respectivamente. Para dosagem de corticosterona, as amostras

plasmáticas, de todos os grupos experimentais, foram previamente submetidas à separação desse hormônio dos demais elementos plasmáticos por extração com etanol absoluto. Para cada amostra de 10µL de plasma foram acrescentados 500µL de etanol absoluto. Em seguida, os tubos contendo o homogenato (plasma + etanol) foram agitados com vigor, por 15 segundos e centrifugados por 15 min, a 2000 rpm, a 4<sup>o</sup> C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi vertido em um novo tubo de ensaio e liofilizado por 3 horas. Ao fim desse processo, as amostras foram ressuspensas em 200 µl de tampão fosfato gel 0,1%, vedadas e armazenadas no freezer -20<sup>o</sup> C até o dia da realização do RIE. No RIE da corticosterona, utilizamos padrão e anticorpos primários Sigma (USA) e hormônio triciado Amershan (USA). Para confecção da curva padrão foram realizadas diluições sucessivas (1:2) do padrão (20ng/mL) e as seguintes concentrações foram obtidas: P<sub>10</sub>: 20ng/mL; P<sub>9</sub>: 10ng/mL; P<sub>8</sub>: 5ng/mL; P<sub>7</sub>: 2,5ng/mL; P<sub>6</sub>: 1,25ng/mL; P<sub>4</sub>: 0,3125ng/mL; P<sub>3</sub>: 0,156ng/mL; P<sub>2</sub>: 0,078ng/mL; P<sub>1</sub>: 0,039ng/mL. Após o padrão (50 µL) ou a amostra (10 µl para os grupos controle, SHAM e OVX e 100 µl o grupo ADX) serem pipetados em cada tubo, foram adicionados o anticorpo primário (100 µL), o hormônio triciado (50 µl /5.000 pulsos), e o volume final da reação calibrado para 600 µL com tampão fosfato gel 0,1%. Durante todo procedimento, as amostras foram mantidas no gelo- A seguir, as amostras foram agitadas por 15 segundos e mantidas a temperatura ambiente por 20 à 24 horas. Para a separação do complexo foi utilizado carvão ativado (200µL) devidamente homogeneizado. Após o carvão ter sido adicionado às amostras, estas foram rapidamente agitadas e mantidas em repouso no gelo por 15 min. Ao fim desse período, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 2500 rpm, e o sobrenadante vertido em um tubo com tampa, onde foram acrescentados 2,5 mL de líquido de cintilação. Esses tubos foram agitados por 1 min e levados ao leitor de

radiação beta. O erro intra-ensaio para corticosterona foi de 5,8%. Os resultados das dosagens de progesterona, corticosterona e LH foram expressos em ng/mL e os resultados dos estradiol em pg/mL. As amostras de cada experimento (I e II) foram determinadas em duplicatas, em um mesmo ensaio, para evitar a variação inter-ensaio dos resultados.

**2.14) Análise Estatística:** Os dados apresentados como valores percentuais foram analisados pelo teste exato de Fisher para dados nominais. As concentrações plasmáticas de todos hormônios estudados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças dos resultados entre os grupos experimentais, bem como entre os diversos horários, foram determinadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, para medidas repetidas e comparações múltiplas. No experimento I, as diferenças entre a quantidade total de LH e também de progesterona secretadas (AUC) foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via. Sempre que necessário, a análise de variância foi seguida pelo pós-teste de Bonferoni. As diferenças entre o número de oócitos no experimento I bem como a AUC de progesterona no experimento II foram determinadas pelo teste t de Student. O nível crítico foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significantes.

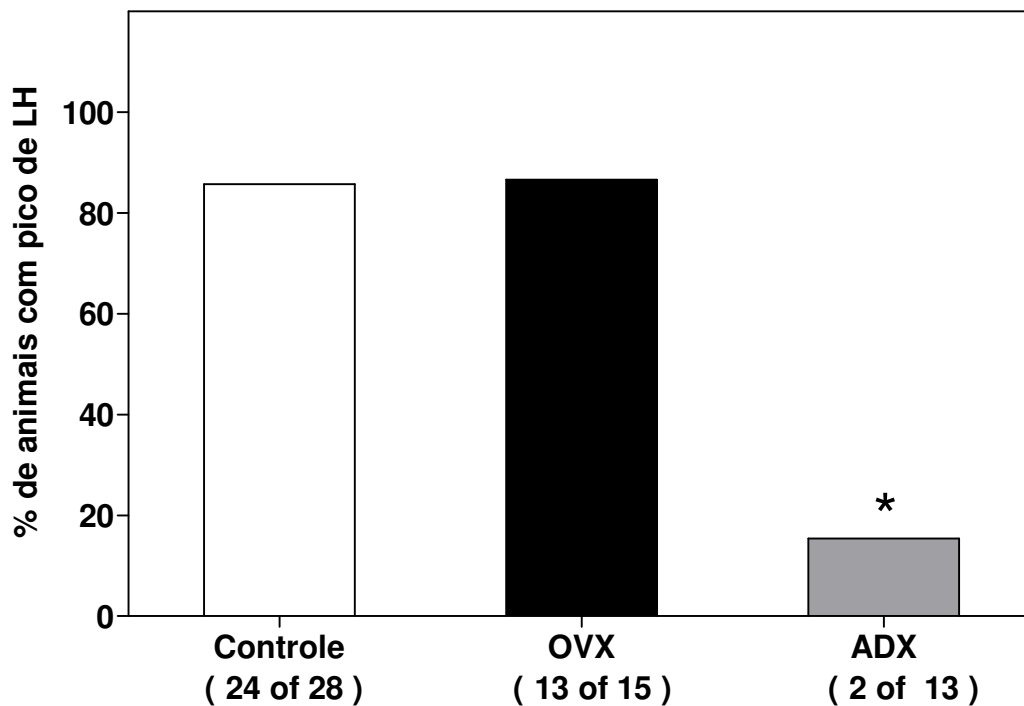


#### **Resultados 41**

Uma vez que nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos Controle e Sham em relação ao número de animais que apresentaram o pico pré-ovulatório de LH na tarde do proestro, ao número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do estro, bem como às concentrações plasmáticas de LH, progesterona e corticosterona, os dados referentes a esses dois grupos foram agrupados e serão apresentados nas Fig.s 3, 4, 5, 7 e 8 como um único grupo denominado Controle.

#### **3.1) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a ocorrência do pico de LH e a ovulação.**

A maioria dos animais estudados nos grupos Controle e OVX apresentou o pico pré-ovulatório de LH (Controle: 24 em 28 animais, 85,7%; OVX:13 em 15 animais, 86,6%). No entanto, a adrenalectomia realizada na manhã do proestro reduziu significativamente a ocorrência do pico de LH, o qual ocorreu em 2 dos 13 animais (ADX: 15,4%) (Fig. 3). As duas ratas que ovularam no grupo OVX apresentaram o número de oócitos no oviduto ( $6,5 \pm 2,5$ ) similar àquele observado no grupo Controle ( $8,0 \pm 1,17$ ).

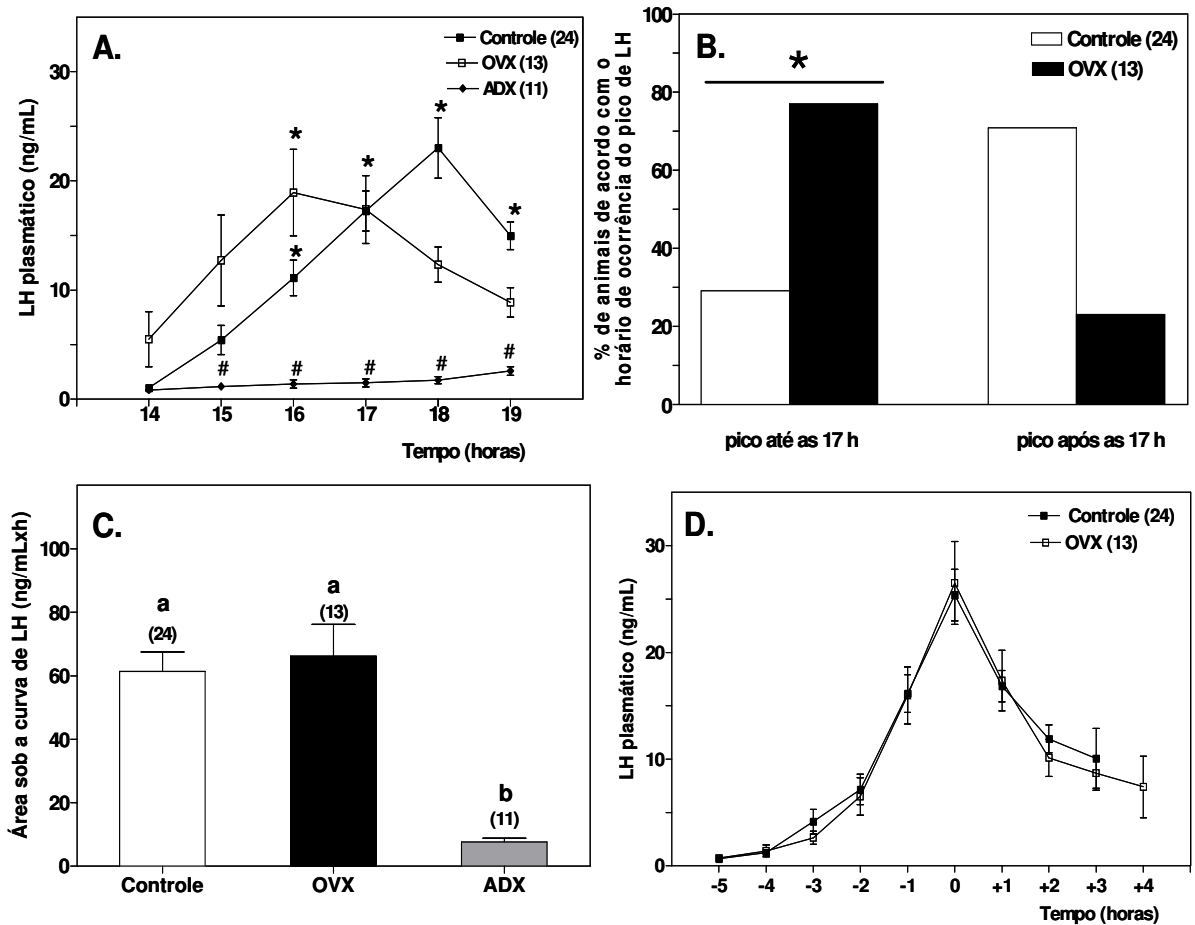


**Figura 3:** Percentual de ratas que exibiram pico pré-ovulatório de LH na tarde do proestro. Os animais foram submetidos apenas à canulação da veia jugular às 7h00 do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Desde que nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos Controle e Sham os dados dos dois grupos foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Enquanto nos grupos Controle e OVX a maioria dos animais estudados apresentou pico de LH (Controle: 24 em 28 animais; OVX:13 em 15 animais) a adrenalectomia inibiu significativamente a ocorrência do pico de LH (ADX: pico de LH em 2 de 13 animais) (\*teste exato de Fisher,  $p < 0.05$ ).

### **3.2) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro no perfil e na amplitude do pico pré-ovulatório de LH .**

Serão descritos abaixo apenas os dados referentes à resposta predominante de cada grupo, ou seja, os dados dos animais que apresentaram pico de LH nos grupos Controle e OVX e do grupo ADX, os dados dos animais nos quais o pico de LH não ocorreu.

As concentrações basais de LH (às 14h00) das ratas em proestro foram similares às dos demais grupos estudados (Controle, OVX e ADX) (Fig. 4.A). Embora o pico de LH tenha ocorrido nas ratas Controle e OVX, no grupo Controle, a maioria dos animais apresentou o pico de LH após as 17h00, enquanto no grupo OVX a maioria dos animais exibiu o pico antes das 17h00 (Fig. 4.B), sugerindo uma antecipação do pico de LH. No entanto, nenhuma diferença foi observada nem na quantidade total de LH secretado (Fig. 4.C), nem na amplitude do pico de LH, calculado pelo alinhamento dos valores de pico desse hormônio no tempo zero nos grupos Controle e OVX (Fig. 4.D). Enquanto o pico pré-ovulatório de LH não foi afetado pela ovariectomia, ele foi completamente abolido pela adrenalectomia (Fig. 4.A e 4.C).

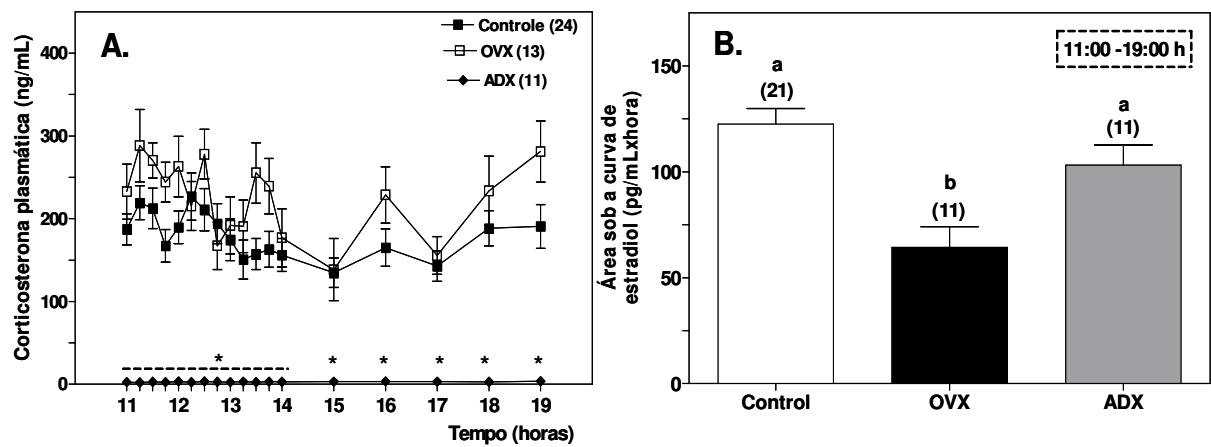


**Figura 4:** **A.** Concentrações plasmáticas de LH de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7h00 do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Desde que nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos Controle e Sham os dados dos dois grupos foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Os dados representam à média  $\pm$  o EPM apenas dos ratos que apresentaram a resposta predominante, ie, pico de LH nos grupos controle e OVX e ausência de picos no grupo ADX. #  $p < 0,05$  vs grupos Controle. **B.** Número percentual de ratas que apresentaram pico de LH antes e após às 17h00. \* teste exato de fisher  $< 0,05$  vs após às 17h00. **C.** Média  $\pm$  EPM da área sob a curva das concentrações plasmáticas de LH na tarde do proestro. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes. **D.** As máximas concentrações plasmáticas de LH no proestro de cada rata foram alinhadas no tempo zero; não foram observadas diferenças na amplitude do pico de LH entre os grupos Controle e OVX. ( ): número de animais.

### **3.3) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de corticosterona e estradiol.**

O perfil da secreção de corticosterona durante o proestro foi similar nos grupos Controle e OVX. Em ambos os grupos, as concentrações plasmáticas de corticosterona já se encontravam elevadas às 11h00 (Controle:  $187,3 \pm 18,65$  ng/mL, OVX:  $232,8 \pm 33,25$  ng/mL) quando comparadas às concentrações fisiológicas basais observadas em animais decapitados ( $42,78 \pm 11,00$  ng/mL) (CALLEGARI, 2004) e decaíram, atingindo o menor valor às 15h00. Após esse horário, as concentrações de corticosterona nos grupos Controle e OVX apresentaram um aumento discreto, atingindo o nível médio de 230 ng/mL às 19h00, o que representa provavelmente um ritmo circadiano da secreção de corticosterona. Como esperado, a adrenalectomia aboliu completamente a secreção de corticosterona (Fig.5.A).

Os animais do grupo OVX apresentaram uma redução significativa na secreção de estradiol, quando comparados aos animais Controles e ADX. A quantidade total de estradiol secretado das 11h00 às 19h00, calculada pela área sob a curva, foi de  $122,5 \pm 7,37$  ng/mL (n=21) para o grupo Controle,  $64,22 \pm 9,87$  ng/mL (n=11) para o grupo OVX e  $103,2 \pm 9,39$  ng/mL (n=11) para o grupo ADX (Fig.5.B).



**Figura 5: A.** Perfil das concentrações plasmáticas de corticosterona de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00h do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e/ou adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Os dados dos grupos Controle e Sham foram apresentados como os de um único grupo denominado Controle. Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11h00 às 14h00 e cada hora das 14h00 às 19h00. Os dados representam à média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupos controle e OVX. **B.** Média  $\pm$  EPM da área sob a curva das concentrações plasmáticas de estradiol de cada rata no período das 11h00 às 19h00. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes. ( ): número de animais.

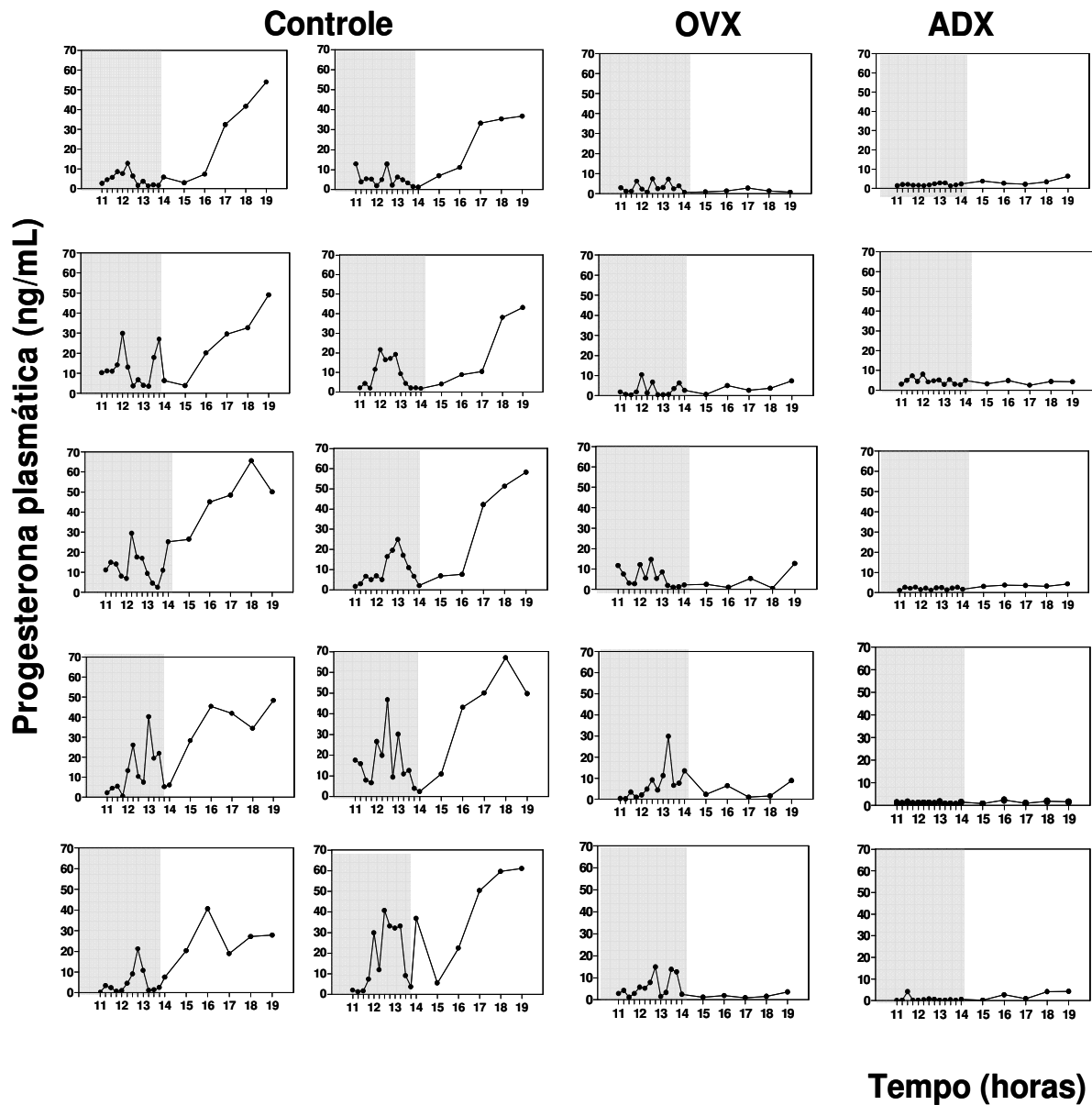
### **3.4) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de progesterona.**

Amostras representativas do perfil individual da secreção de progesterona são demonstradas na Fig. 6. Um aumento da secreção de progesterona (pico) foi observado entre as 12h00 e 14h00 no grupo Controle (pico 1). Apesar desse pico estar presente em cada rata do grupo Controle, sua magnitude variou entre os animais desse grupo experimental. Tanto a ovariectomia como a adrenalectomia influenciaram negativamente a ocorrência desse pico de progesterona (ver análise na Fig. 6).

Para avaliar o efeito da OVX e da ADX sobre a amplitude desse pico os maiores valores das concentrações de progesterona no período das 11h00 às 14h00 de cada animal foram alinhados no tempo zero (Fig. 7.A). As concentrações basais de progesterona foram mais baixas que 5ng/mL na manhã do proestro em todos os grupos experimentais e aumentaram para valores superiores a 20 ng/mL no momento do pico de LH, no grupo Controle (Fig. 6 e 7.A). Esse pico de progesterona foi significativamente atenuado pela ovariectomia (cerca de 45%) e praticamente abolido pela adrenalectomia (Pico 1 P4<sub>Controle</sub>: 22, 32 ± 2,65; Pico 1 P4<sub>OVX</sub>: 12,31 ± 1,93; Pico 1 P4<sub>ADX</sub>: 4,45 ± 0,66) (Fig. 6 e 7.A). Da mesma forma, a quantidade total de progesterona secretada nesse período de tempo (medida pela área sob a curva) foi reduzida em cerca de 40 % pela ovariectomia e em 80% pela adrenalectomia (ASC P4<sub>Controle</sub>: 23,55 ± 2,26 ng/mL; ASC P4<sub>OVX</sub>: 14,02 ± 1,59; ASC P4<sub>ADX</sub>: 5,04 ± 0,57 ng/mL) (Fig. 7.B).

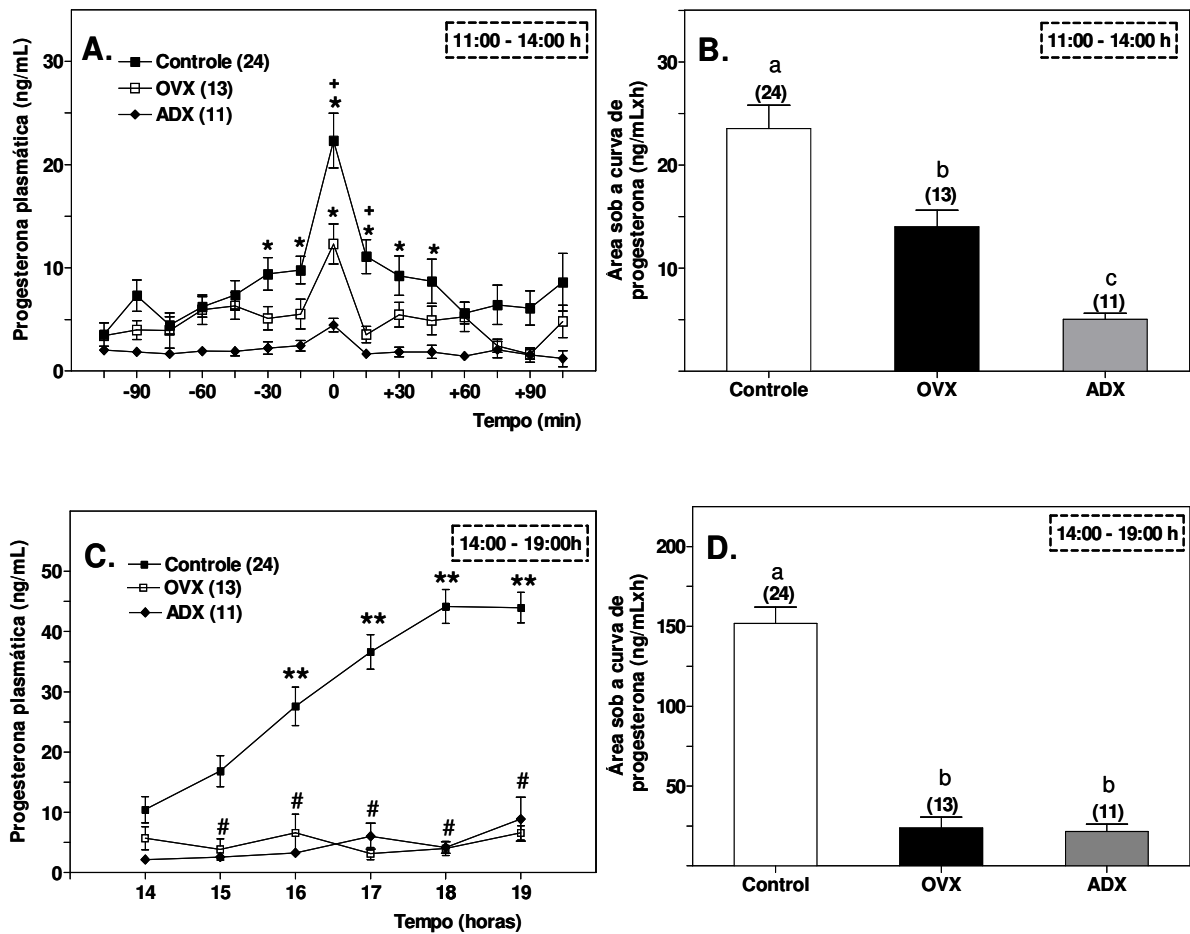
No período das 14h00 às 19h00 o grupo Controle apresentou um aumento contínuo e sustentado das concentrações plasmáticas de progesterona (pico 2), enquanto que nos grupos OVX e ADX essas concentrações permaneceram baixas e

constantes (Fig. 7.C). Tanto a OVX como a ADX provocaram uma redução da mesma magnitude (cerca de 83%) na quantidade total de progesterona nesse período de tempo (ASC P4<sub>Controle</sub>: 151.9 ± 10.19 ng/mL; ASC P4<sub>OVX</sub>: 23.73 ± 6.8; ASC P4<sub>ADX</sub>: 21.61 ± 4.62 ng/mL) (Fig. 7.D).



**Figura 6:** Perfil individual da secreção de progesterona de ratas submetidas às 7:00 h da manhã do proestro apenas à canulação da veia jugular (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11:00 às 14:00h e cada hora das 14:00 às 19:00 h.

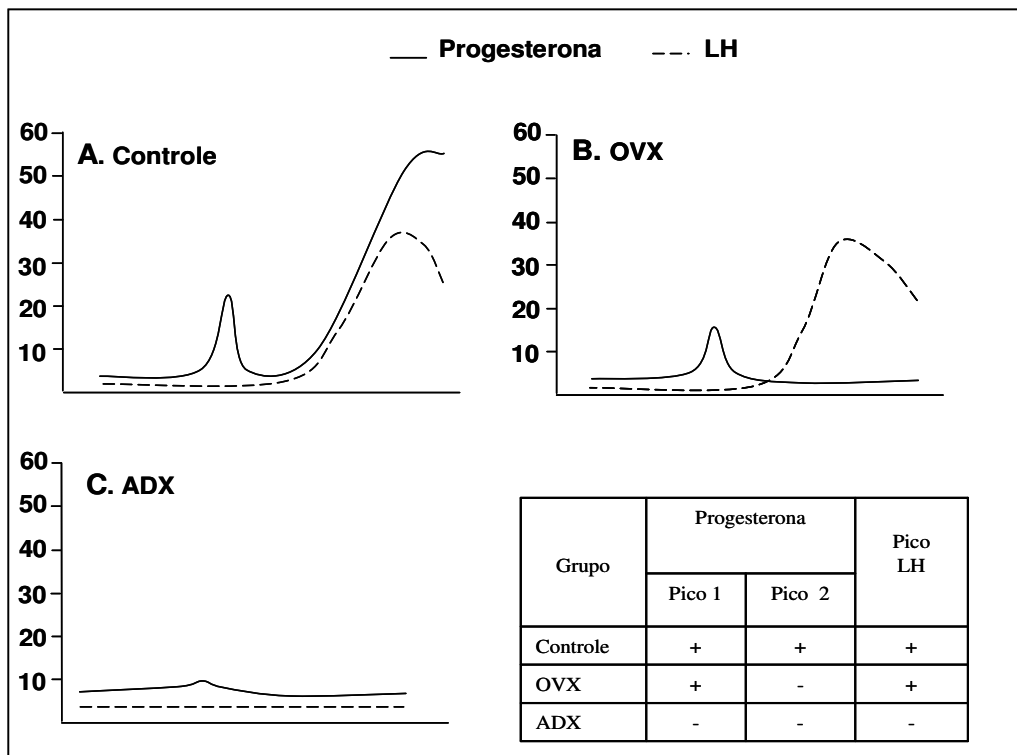




**Figura 7:** Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00 h do mesmo dia (Grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Grupo Sham), ovariectomia (Grupo OVX) ou adrenalectomia (Grupo ADX). Dados dos grupos Controle e Sham foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11:00 às 14:00 h e cada hora das 14:00 às 19:00 h. Os dados representam à média  $\pm$  EPM. **A.** Os dados das 11:00 às 14:00 h foram alinhados de modo que o tempo zero representasse o horário de pico progesterona de cada animal. \*  $p < 0,05$  vs grupo ADX, +  $p < 0,05$  vs grupo OVX. **C.** Dados das 14:00 às 19:00 h. #  $p < 0,05$  vs grupo Controle, \*\*  $p < 0,05$  vs 14:00 h do mesmo grupo experimental. Barras (**B**, **D**) representam a média  $\pm$  o erro padrão da média da área sob a curva de progesterona de cada animal durante os dois períodos de tempo estudados (11:00 - 14:00 h e 14:00 - 19:00 h). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ( ): número de animais.

### 3.5) Correlação do perfil da secreção de progesterona no proestro e a ocorrência do pico de LH.

A Fig. 8 correlaciona os dois picos de progesterona (picos 1 e 2) com a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Nas ratas Controle (Fig. 8.A), os dois picos estavam presentes e o pico de LH ocorreu normalmente. O grupo OVX apresentou apenas o pico 1 de progesterona, o qual foi de menor magnitude. Nesse grupo a amplitude do pico de LH foi similar a observada no grupo Controle (Fig. 8.B), apesar do aumento da secreção de progesterona após às 15:00 h ter sido abolido pela ovariectomia. Por outro lado, o pico de LH foi completamente bloqueado na maioria das ratas do grupo ADX, quando os dois picos de progesterona estavam ausentes (Fig. 8.C.). A tabela na Fig. 8 resume os resultados.

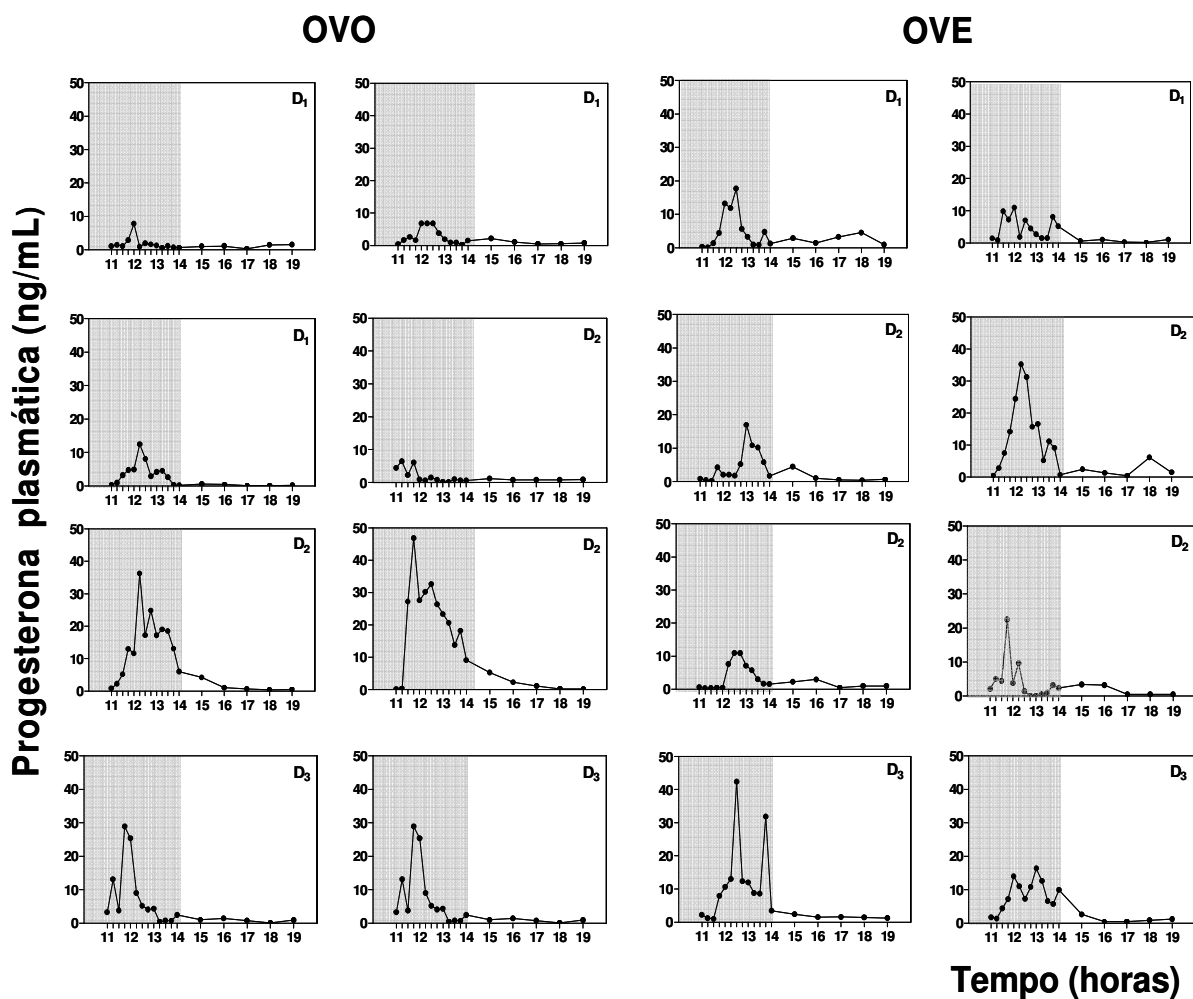


**Figura 8:** Representação esquemática demonstrando a correlação entre a secreção de progesterona (linhas contínuas) e a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH (linhas pontilhadas) durante o dia do proestro de ratas submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00 h do mesmo dia (Grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Grupo Sham), ovariectomia (Grupo OVX) ou adrenalectomia (Grupo ADX). Dados dos grupos Controle e Sham foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Dois picos de progesterona foram observados durante o dia do proestro: entre às 11:00 e 14:00 h (pico 1) e 14:00 e 19:00 h (pico 2). Quando o pico 1, mas não o pico 2, foi abolido a ocorrência do pico de LH foi completamente bloqueada (Tabela).

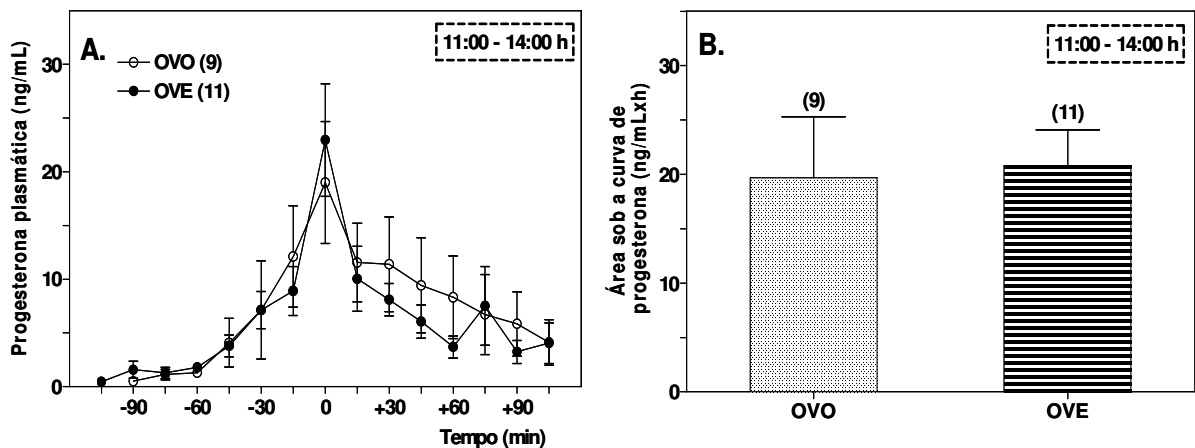
### **3.6. Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas e a influência das concentrações estrogênicas.**

A Fig. 9 representa uma amostragem do perfil individual da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (grupo OVO) ou 17- $\beta$ -estradiol (grupo OVE), por 3 dias consecutivos, nos dias 1, 2 e 3 após a última injeção (D1, D2 e D3) (n: 3-4 ratas/dia). No período das 14:00 h às 19:00 h, as concentrações plasmáticas de progesterona permaneceram baixas e constantes em todos os grupos (Fig. 9). No entanto, entre as 11:00 e 14:00 h, os animais dos três grupos OVO (D1, D2 e D3) apresentaram um aumento claro nas concentrações de progesterona (pico) apesar das baixas concentrações de estradiol (aproximadamente 7,0; 9,2; 9,0 pg/mL nos dias D1, D2 e D3 respectivamente). Da mesma forma, nos grupos OVE (D1, D2 e D3) esse pico ocorreu apesar do decréscimo das concentrações plasmáticas de estradiol (aproximadamente 137,9; 95,9 e 16,4 pg/mL nos dias D1, D2 e D3 respectivamente). O aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona foi observado em cada rata dos seis grupos experimentais e sua magnitude variou entre os animais do mesmo grupo experimental. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre as concentrações médias dos picos de progesterona nos dias D1, D2 e D3. Portanto, os dados dos três dias estudados foram agregados e apresentados na Fig. 10 como grupos únicos (OVO e OVE). Para avaliar a amplitude dos picos de progesterona entre as 11:00 e 14:00 h, bem como a influência da reposição de estradiol nessa secreção, os maiores valores das concentrações de progesterona de cada animal foram alinhados no tempo zero (Fig.10.A). A quantidade total de progesterona secretada nesse período foi também calculada (Fig.10.B). A amplitude do pico de progesterona nas ratas OVO e OVE foi

aproximadamente 20ng/mL (similar àquela das ratas do grupo Controle; veja Fig.7.A), e a secreção de progesterona não foi influenciada pelas concentrações estrogênicas (Fig. 10.B).



**Fig. 9:** Perfil individual da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas há 7 dias e submetidas à administração subcutânea de óleo de milho (Grupo OVO) ou de 17 $\beta$ -estradiol (Grupo OVE) por três dias consecutivos. Um, dois ou três dias após a última injeção, amostras de sangue foram coletadas a cada 15 minutos das 11:00 às 14:00 h e a cada hora das 14:00 às 19:00 h.



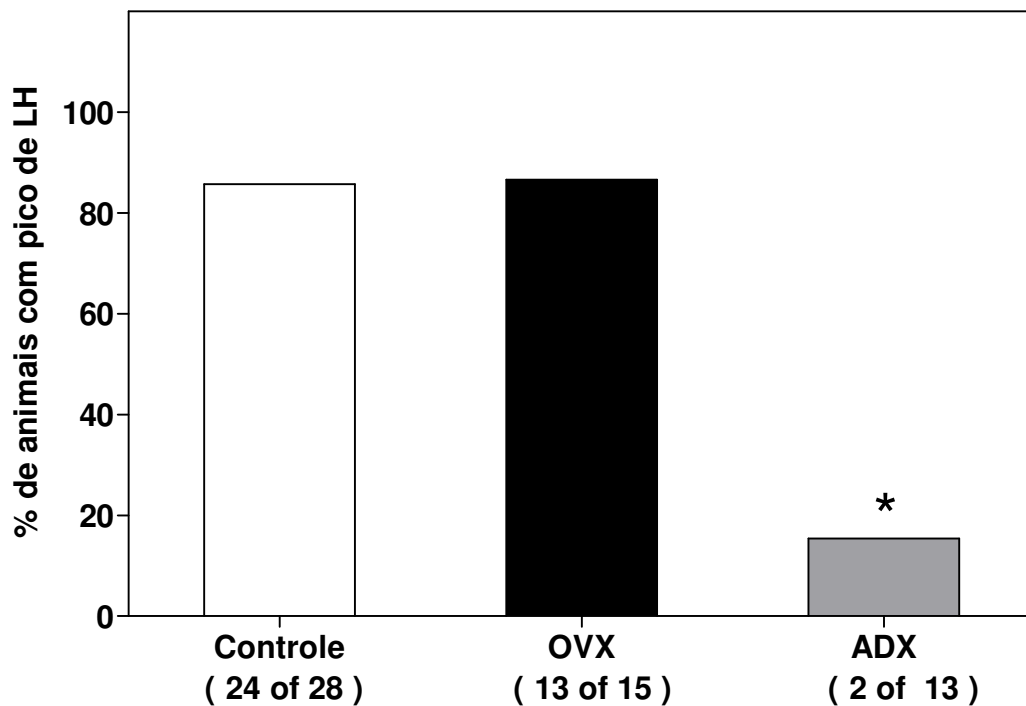
**Figura 10: A.** Concentrações plasmáticas de progesterona no período das 11:00 h às 14:00 h de ratas ovariectomizadas há 7 dias tratadas com óleo de milho (Grupo OVO) ou de  $17\beta$ -estradiol (Grupo OVE) por três dias consecutivos. Um, dois ou três dias após a última injeção, amostras de sangue foram coletadas a cada 15 minutos das 11:00 às 14:00 h. Os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão da média nos três dias estudados. Dados foram alinhados de modo que o tempo zero representasse o horário de ocorrência do pico progesterona de cada animal. **B.** Os dados representam a média  $\pm$  o EPM da área sob a curva de progesterona de cada animal. ( ): número de animais.

Uma vez que nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos Controle e Sham em relação ao número de animais que apresentaram o pico pré-ovulatório de LH na tarde do proestro, ao número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do estro, bem como às concentrações plasmáticas de LH, progesterona e corticosterona, os dados referentes a esses dois grupos foram agrupados e serão apresentados nas Fig.s 3, 4, 5, 7 e 8 como um único grupo denominado Controle.

### 3.1) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a ocorrência do pico de LH e a ovulação.

A maioria dos animais estudados nos grupos Controle e OVX apresentou o pico pré-ovulatório de LH (Controle: 24 em 28 animais, 85,7%; OVX:13 em 15

animais, 86,6%). No entanto, a adrenalectomia realizada na manhã do proestro reduziu significativamente a ocorrência do pico de LH, o qual ocorreu em 2 dos 13 animais (ADX: 15,4%) (Fig. 3). As duas ratas que ovularam no grupo OVX apresentaram o número de oócitos no oviduto ( $6,5 \pm 2,5$ ) similar àquele observado no grupo Controle ( $8,0 \pm 1,17$ ).



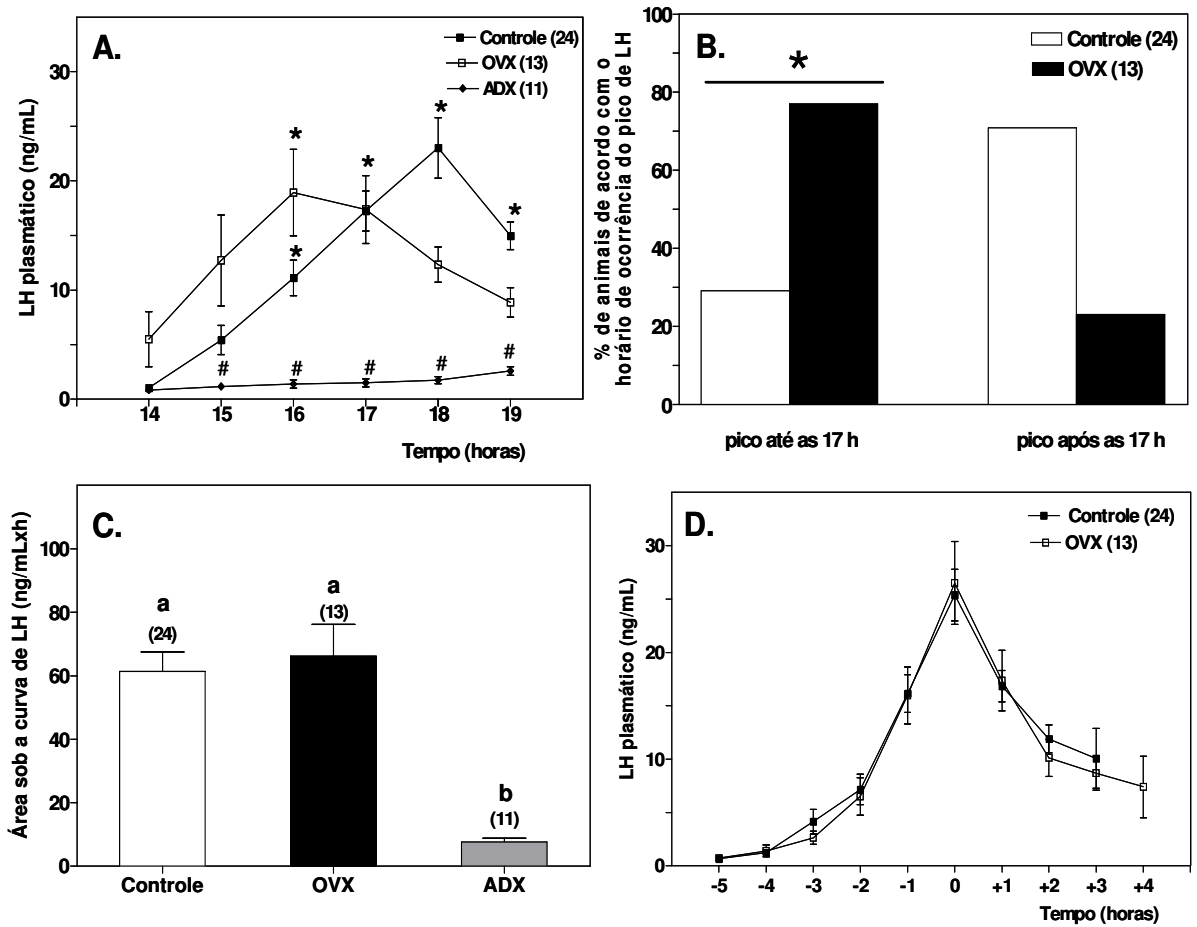
**Figura 3:** Percentual de ratas que exibiram pico pré-ovulatório de LH na tarde do proestro. Os animais foram submetidos apenas à canulação da veia jugular às 7h00 do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Desde que nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos Controle e Sham os dados dos dois grupos foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Enquanto nos grupos Controle e OVX a maioria dos animais estudados apresentou pico de LH (Controle: 24 em 28 animais; OVX:13 em 15 animais) a adrenalectomia inibiu significativamente a ocorrência do pico de LH (ADX: pico de LH em 2 de 13 animais) (\*teste exato de Fisher,  $p < 0.05$ ).

### **3.2) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro no perfil e na amplitude do pico pré-ovulatório de LH .**

Serão descritos abaixo apenas os dados referentes à resposta predominante de cada grupo, ou seja, os dados dos animais que apresentaram pico de LH nos grupos Controle e OVX e do grupo ADX, os dados dos animais nos quais o pico de LH não ocorreu.

As concentrações basais de LH (às 14h00) das ratas em proestro foram similares às dos demais grupos estudados (Controle, OVX e ADX) (Fig. 4.A). Embora o pico de LH tenha ocorrido nas ratas Controle e OVX, no grupo Controle, a maioria dos animais apresentou o pico de LH após as 17h00, enquanto no grupo OVX a maioria dos animais exibiu o pico antes das 17h00 (Fig. 4.B), sugerindo uma antecipação do pico de LH. No entanto, nenhuma diferença foi observada nem na quantidade total de LH secretado (Fig. 4.C), nem na amplitude do pico de LH, calculado pelo alinhamento dos valores de pico desse hormônio no tempo zero nos grupos Controle e OVX (Fig. 4.D). Enquanto o pico pré-ovulatório de LH não foi afetado pela ovariectomia, ele foi completamente abolido pela adrenalectomia (Fig. 4.A e 4.C).



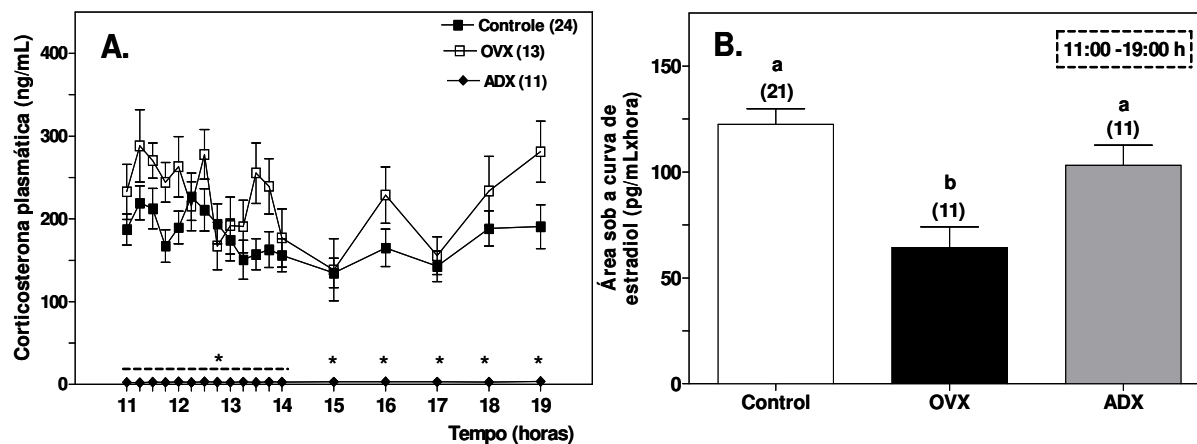


**Figura 4:** **A.** Concentrações plasmáticas de LH de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7h00 do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Desde que nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos Controle e Sham os dados dos dois grupos foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Os dados representam à média  $\pm$  o EPM apenas dos ratos que apresentaram a resposta predominante, ie, pico de LH nos grupos controle e OVX e ausência de picos no grupo ADX. #  $p < 0,05$  vs grupos Controle. **B.** Número percentual de ratas que apresentaram pico de LH antes e após às 17h00. \* teste exato de fisher  $< 0,05$  vs após às 17h00. **C.** Média  $\pm$  EPM da área sob a curva das concentrações plasmáticas de LH na tarde do proestro. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes. **D.** As máximas concentrações plasmáticas de LH no proestro de cada rata foram alinhadas no tempo zero; não foram observadas diferenças na amplitude do pico de LH entre os grupos Controle e OVX. ( ): número de animais.

### **3.3) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de corticosterona e estradiol.**

O perfil da secreção de corticosterona durante o proestro foi similar nos grupos Controle e OVX. Em ambos os grupos, as concentrações plasmáticas de corticosterona já se encontravam elevadas às 11h00 (Controle:  $187,3 \pm 18,65$  ng/mL, OVX:  $232,8 \pm 33,25$  ng/mL) quando comparadas às concentrações fisiológicas basais observadas em animais decapitados ( $42,78 \pm 11,00$  ng/mL) (CALLEGARI, 2004) e decaíram, atingindo o menor valor às 15h00. Após esse horário, as concentrações de corticosterona nos grupos Controle e OVX apresentaram um aumento discreto, atingindo o nível médio de 230 ng/mL às 19h00, o que representa provavelmente um ritmo circadiano da secreção de corticosterona. Como esperado, a adrenalectomia aboliu completamente a secreção de corticosterona (Fig.5.A).

Os animais do grupo OVX apresentaram uma redução significativa na secreção de estradiol, quando comparados aos animais Controles e ADX. A quantidade total de estradiol secretado das 11h00 às 19h00, calculada pela área sob a curva, foi de  $122,5 \pm 7,37$  ng/mL (n=21) para o grupo Controle,  $64,22 \pm 9,87$  ng/mL (n=11) para o grupo OVX e  $103,2 \pm 9,39$  ng/mL (n=11) para o grupo ADX (Fig.5.B).



**Figura 5: A.** Perfil das concentrações plasmáticas de corticosterona de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00h do mesmo dia (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela: cirurgia fictícia de retirada do ovário e/ou adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Os dados dos grupos Controle e Sham foram apresentados como os de um único grupo denominado Controle. Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11h00 às 14h00 e cada hora das 14h00 às 19h00. Os dados representam à média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupos controle e OVX. **B.** Média  $\pm$  EPM da área sob a curva das concentrações plasmáticas de estradiol de cada rata no período das 11h00 às 19h00. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes. ( ): número de animais.

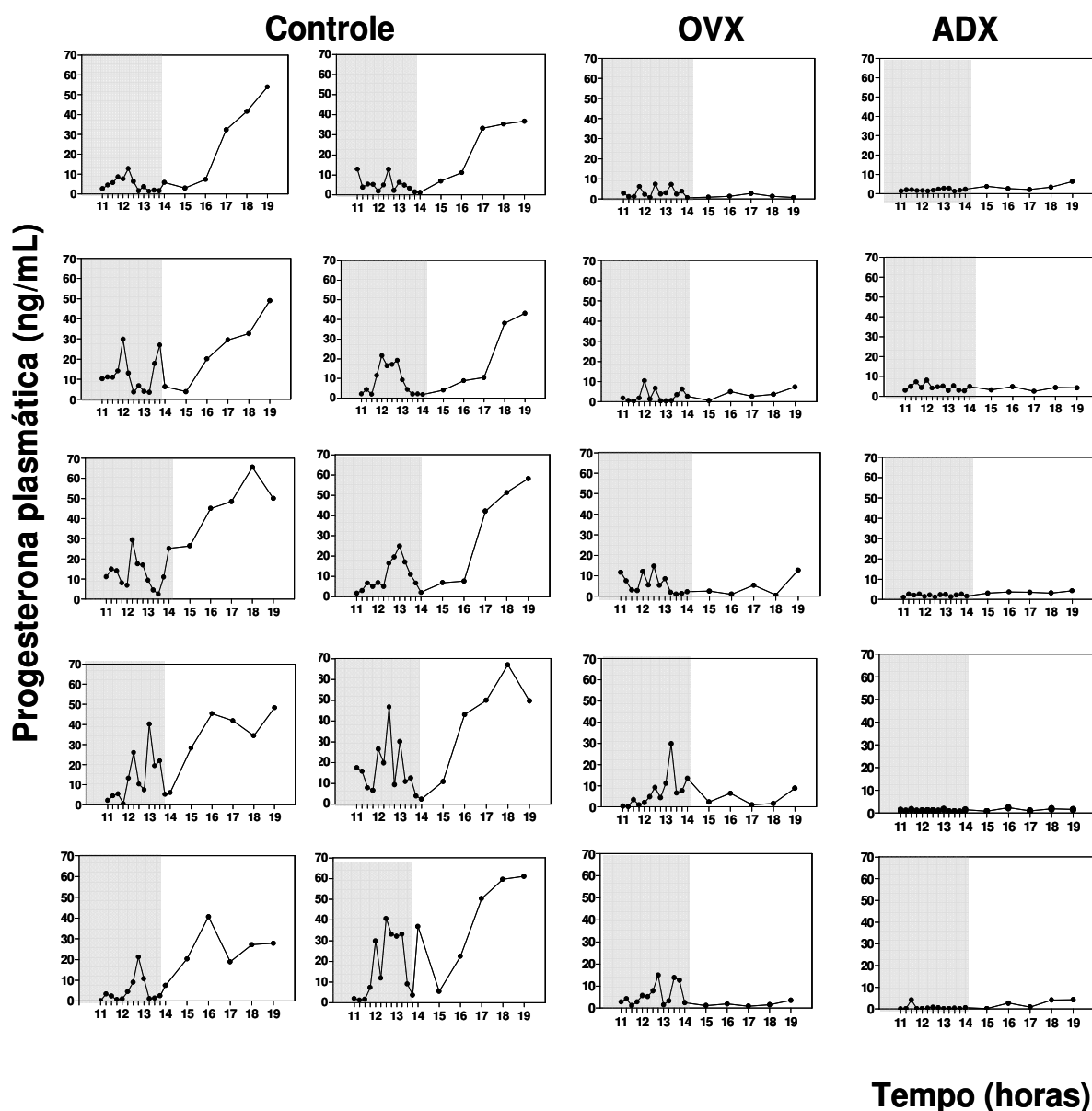
### **3.4) Efeitos da ovariectomia e da adrenalectomia realizadas na manhã do proestro sobre a secreção de progesterona.**

Amostras representativas do perfil individual da secreção de progesterona são demonstradas na Fig. 6. Um aumento da secreção de progesterona (pico) foi observado entre as 12h00 e 14h00 no grupo Controle (pico 1). Apesar desse pico estar presente em cada rata do grupo Controle, sua magnitude variou entre os animais desse grupo experimental. Tanto a ovariectomia como a adrenalectomia influenciaram negativamente a ocorrência desse pico de progesterona (ver análise na Fig. 6).

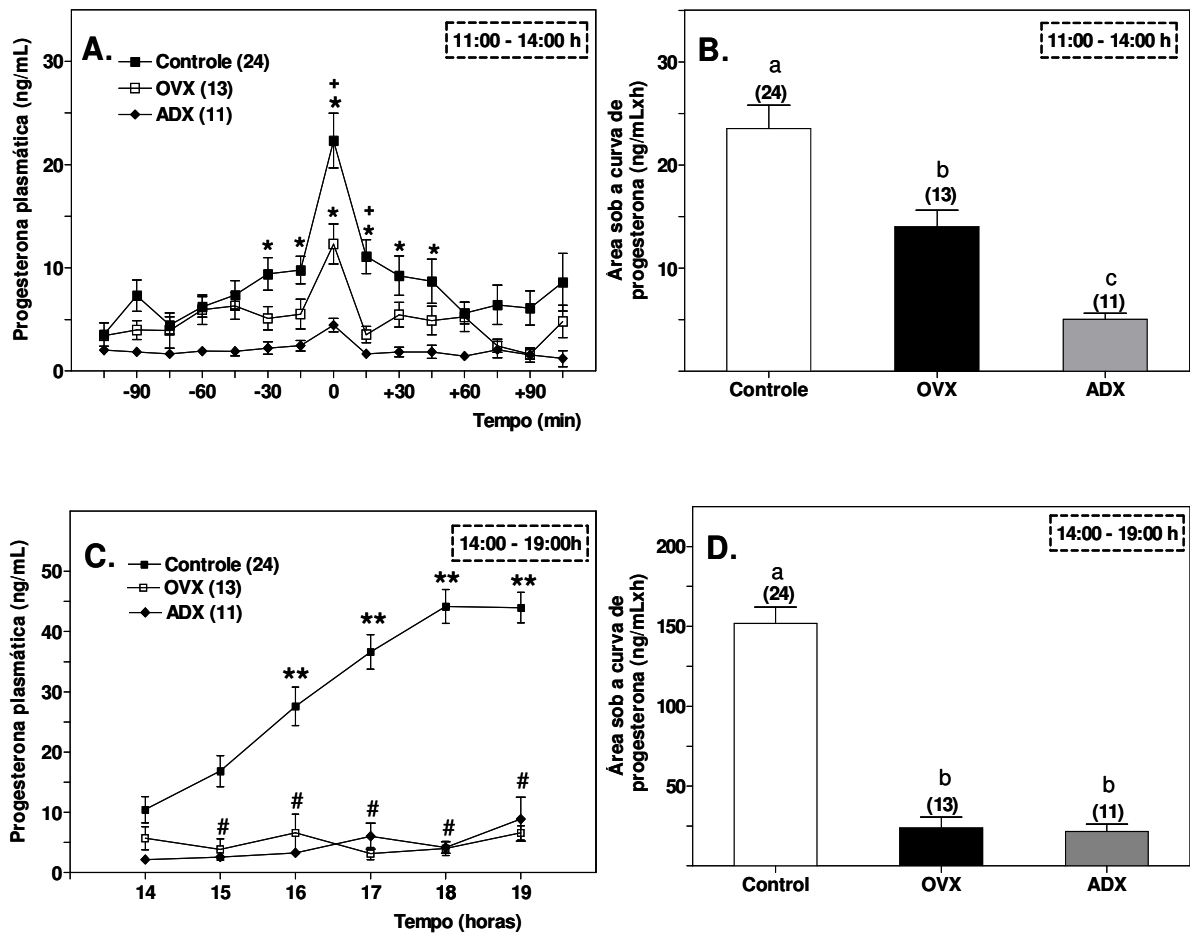
Para avaliar o efeito da OVX e da ADX sobre a amplitude desse pico os maiores valores das concentrações de progesterona no período das 11h00 às 14h00 de cada animal foram alinhados no tempo zero (Fig. 7.A). As concentrações basais de progesterona foram mais baixas que 5ng/mL na manhã do proestro em todos os grupos experimentais e aumentaram para valores superiores a 20 ng/mL no momento do pico de LH, no grupo Controle (Fig. 6 e 7.A). Esse pico de progesterona foi significativamente atenuado pela ovariectomia (cerca de 45%) e praticamente abolido pela adrenalectomia (Pico 1 P4<sub>Controle</sub>: 22, 32 ± 2,65; Pico 1 P4<sub>OVX</sub>: 12,31 ± 1,93; Pico 1 P4<sub>ADX</sub>: 4,45 ± 0,66) (Fig. 6 e 7.A). Da mesma forma, a quantidade total de progesterona secretada nesse período de tempo (medida pela área sob a curva) foi reduzida em cerca de 40 % pela ovariectomia e em 80% pela adrenalectomia (ASC P4<sub>Controle</sub>: 23,55 ± 2,26 ng/mL; ASC P4<sub>OVX</sub>: 14,02 ± 1,59; ASC P4<sub>ADX</sub>: 5,04 ± 0,57 ng/mL) (Fig. 7.B).

No período das 14h00 às 19h00 o grupo Controle apresentou um aumento contínuo e sustentado das concentrações plasmáticas de progesterona (pico 2), enquanto que nos grupos OVX e ADX essas concentrações permaneceram baixas e

constantes (Fig. 7.C). Tanto a OVX como a ADX provocaram uma redução da mesma magnitude (cerca de 83%) na quantidade total de progesterona nesse período de tempo (ASC P4<sub>Controle</sub>: 151.9 ± 10.19 ng/mL; ASC P4<sub>OVX</sub>: 23.73 ± 6.8; ASC P4<sub>ADX</sub>: 21.61 ± 4.62 ng/mL) (Fig. 7.D).



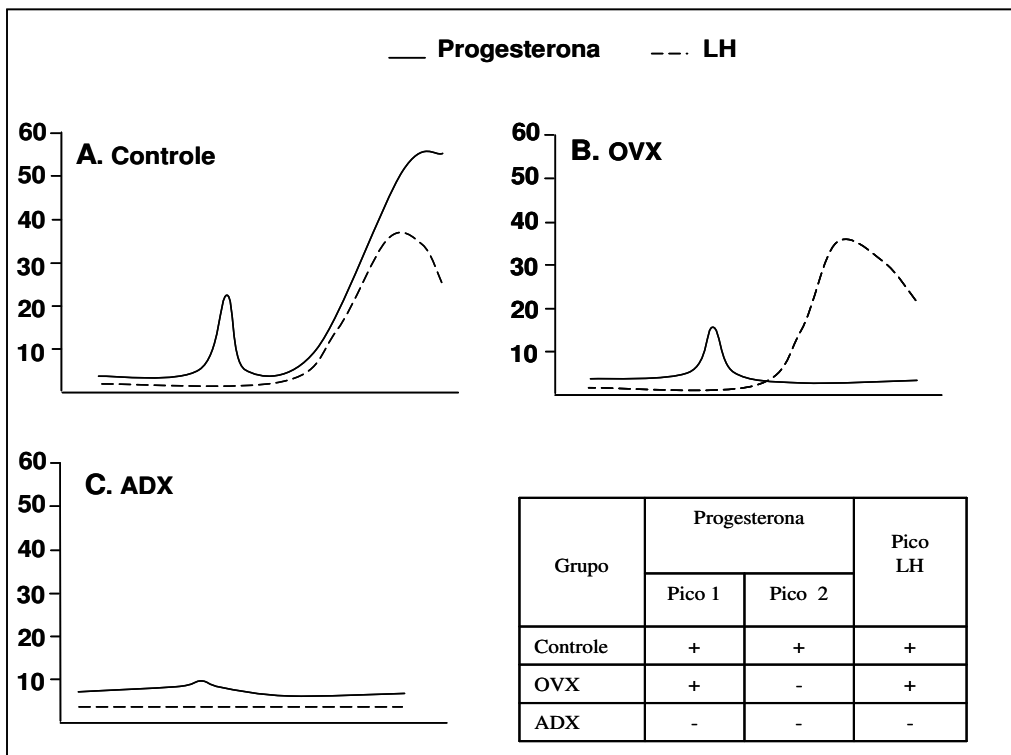
**Figura 6:** Perfil individual da secreção de progesterona de ratas submetidas às 7:00 h da manhã do proestro apenas à canulação da veia jugular (grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (grupo Sham), ovariectomia (grupo OVX) ou adrenalectomia (grupo ADX). Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11:00 às 14:00h e cada hora das 14:00 às 19:00 h.



**Figura 7:** Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona de ratas no proestro submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00 h do mesmo dia (Grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Grupo Sham), ovariectomia (Grupo OVX) ou adrenalectomia (Grupo ADX). Dados dos grupos Controle e Sham foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 min das 11:00 às 14:00 h e cada hora das 14:00 às 19:00 h. Os dados representam à média  $\pm$  EPM. **A.** Os dados das 11:00 às 14:00 h foram alinhados de modo que o tempo zero representasse o horário de pico progesterona de cada animal. \*  $p < 0,05$  vs grupo ADX, +  $p < 0,05$  vs grupo OVX. **C.** Dados das 14:00 às 19:00 h. #  $p < 0,05$  vs grupo Controle, \*\*  $p < 0,05$  vs 14:00 h do mesmo grupo experimental. Barras (**B, D**) representam a média  $\pm$  o erro padrão da média da área sob a curva de progesterona de cada animal durante os dois períodos de tempo estudados (11:00 - 14:00 h e 14:00 - 19:00 h). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ( ): número de animais.

### 3.5) Correlação do perfil da secreção de progesterona no proestro e a ocorrência do pico de LH.

A Fig. 8 correlaciona os dois picos de progesterona (picos 1 e 2) com a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Nas ratas Controle (Fig. 8.A), os dois picos estavam presentes e o pico de LH ocorreu normalmente. O grupo OVX apresentou apenas o pico 1 de progesterona, o qual foi de menor magnitude. Nesse grupo a amplitude do pico de LH foi similar a observada no grupo Controle (Fig. 8.B), apesar do aumento da secreção de progesterona após às 15:00 h ter sido abolido pela ovariectomia. Por outro lado, o pico de LH foi completamente bloqueado na maioria das ratas do grupo ADX, quando os dois picos de progesterona estavam ausentes (Fig. 8.C.). A tabela na Fig. 8 resume os resultados.



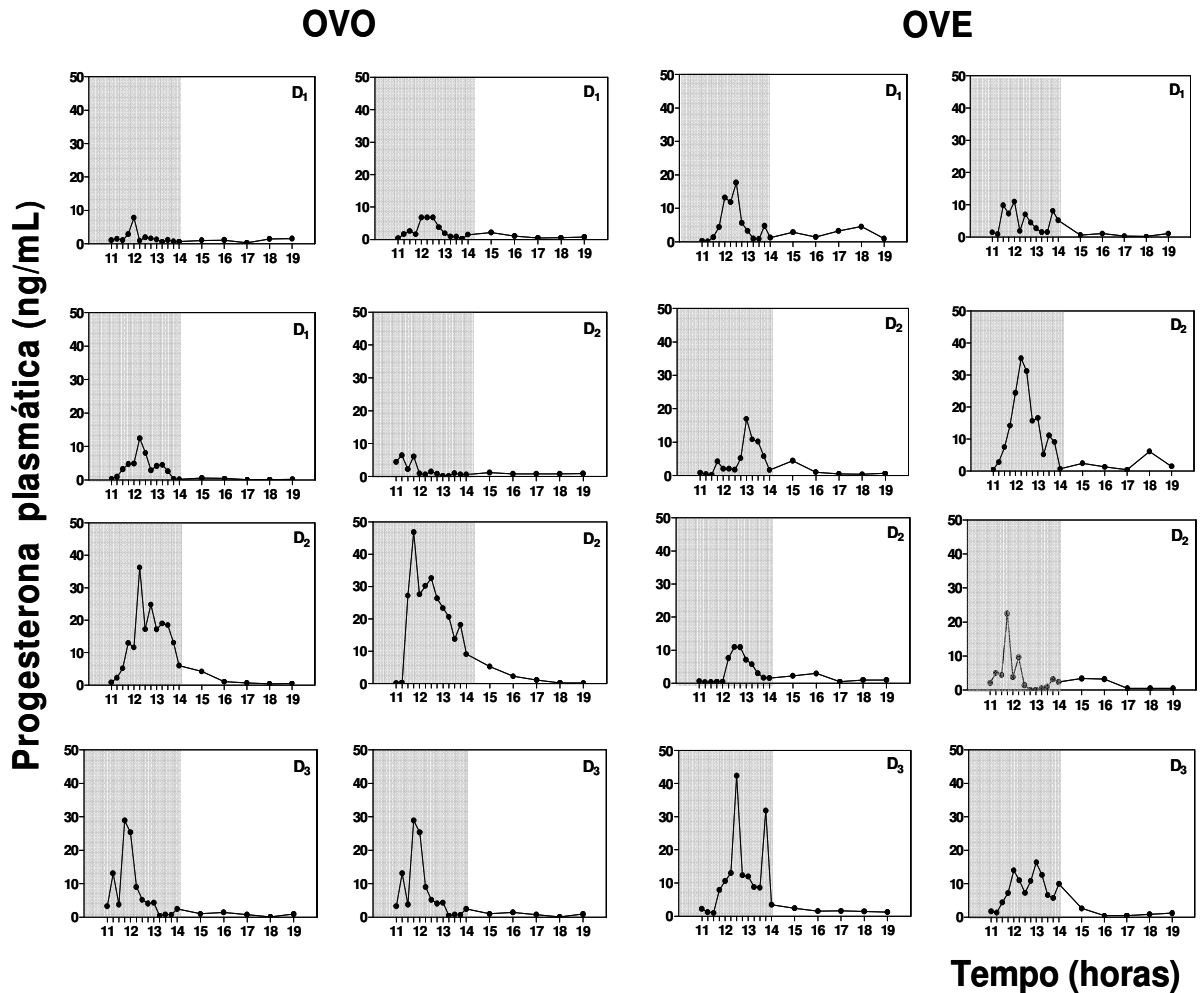
**Figura 8:** Representação esquemática demonstrando a correlação entre a secreção de progesterona (linhas contínuas) e a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH (linhas pontilhadas) durante o dia do proestro de ratas submetidas apenas à canulação da veia jugular às 7:00 h do mesmo dia (Grupo Controle) ou à canulação da veia jugular seguida pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Grupo Sham), ovariectomia (Grupo OVX) ou adrenalectomia (Grupo ADX). Dados dos grupos Controle e Sham foram agrupados e apresentados como um único grupo denominado Controle. Dois picos de progesterona foram observados durante o dia do proestro: entre às 11:00 e 14:00 h (pico 1) e 14:00 e 19:00 h (pico 2). Quando o pico 1, mas não o pico 2, foi abolido a ocorrência do pico de LH foi completamente bloqueada (Tabela).

### **3.6. Perfil da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas e a influência das concentrações estrogênicas.**

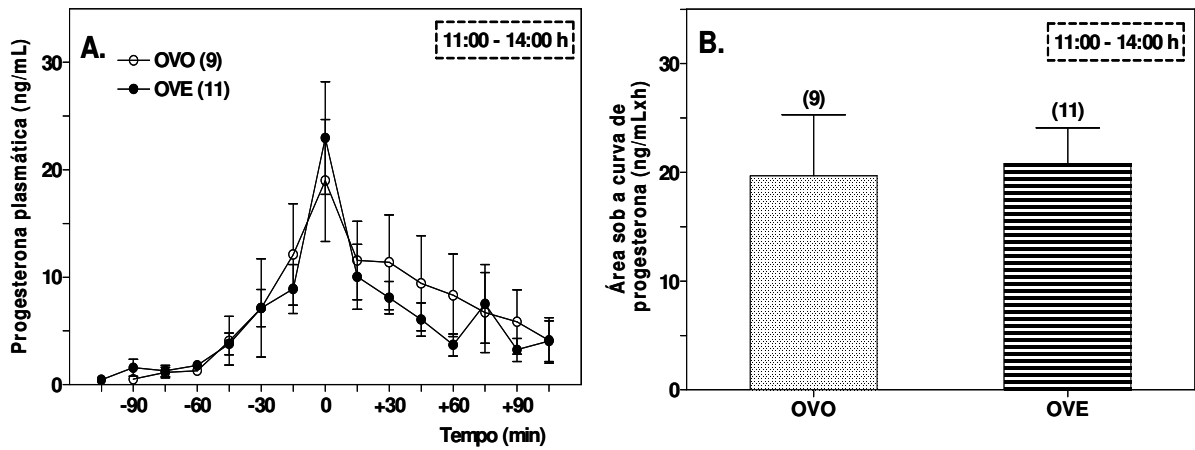
A Fig. 9 representa uma amostragem do perfil individual da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (grupo OVO) ou 17- $\beta$ -estradiol (grupo OVE), por 3 dias consecutivos, nos dias 1, 2 e 3 após a última injeção (D1, D2 e D3) (n: 3-4 ratas/dia). No período das 14:00 h às 19:00 h, as concentrações plasmáticas de progesterona permaneceram baixas e constantes em todos os grupos (Fig. 9). No entanto, entre as 11:00 e 14:00 h, os animais dos três grupos OVO (D1, D2 e D3) apresentaram um aumento claro nas concentrações de progesterona (pico) apesar das baixas concentrações de estradiol (aproximadamente 7,0; 9,2; 9,0 pg/mL nos dias D1, D2 e D3 respectivamente). Da mesma forma, nos grupos OVE (D1, D2 e D3) esse pico ocorreu apesar do decréscimo das concentrações plasmáticas de estradiol (aproximadamente 137,9; 95,9 e 16,4 pg/mL nos dias D1, D2 e D3 respectivamente). O aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona foi observado em cada rata dos seis grupos experimentais e sua magnitude variou entre os animais do mesmo grupo experimental. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre as concentrações médias dos picos de progesterona nos dias D1, D2 e D3. Portanto, os dados dos três dias estudados foram agregados e apresentados na Fig. 10 como grupos únicos (OVO e OVE). Para avaliar a amplitude dos picos de progesterona entre as 11:00 e 14:00 h, bem como a influência da reposição de estradiol nessa secreção, os maiores valores das concentrações de progesterona de cada animal foram alinhados no tempo zero (Fig.10.A). A quantidade total de progesterona secretada nesse período foi também calculada (Fig.10.B). A amplitude do pico de progesterona nas ratas OVO e OVE foi



aproximadamente 20ng/mL (similar àquela das ratas do grupo Controle; veja Fig.7.A), e a secreção de progesterona não foi influenciada pelas concentrações estrogênicas (Fig. 10.B).



**Fig. 9:** Perfil individual da secreção de progesterona de ratas ovariectomizadas há 7 dias e submetidas à administração subcutânea de óleo de milho (Grupo OVO) ou de 17 $\beta$ -estradiol (Grupo OVE) por três dias consecutivos. Um, dois ou três dias após a última injeção, amostras de sangue foram coletadas a cada 15 minutos das 11:00 às 14:00 h e a cada hora das 14:00 às 19:00 h.



**Figura 10: A.** Concentrações plasmáticas de progesterona no período das 11:00 h às 14:00 h de ratas ovariectomizadas há 7 dias tratadas com óleo de milho (Grupo OVO) ou de  $17\beta$ -estradiol (Grupo OVE) por três dias consecutivos. Um, dois ou três dias após a última injeção, amostras de sangue foram coletadas a cada 15 minutos das 11:00 às 14:00 h. Os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão da média nos três dias estudados. Dados foram alinhados de modo que o tempo zero representasse o horário de ocorrência do pico progesterona de cada animal. **B.** Os dados representam a média  $\pm$  o EPM da área sob a curva de progesterona de cada animal. ( ): número de animais.

## ***Discussão 54***

A maioria dos animais submetidos somente à canulação da veia jugular na manhã do proestro (grupo controle) apresentou o pico pré-ovulatório de LH esperado para a tarde daquele dia. Embora a cirurgia de canulação da veia jugular seja sabidamente um estresse cirúrgico, o pico de LH não foi afetado por esse procedimento, uma vez que já demonstramos que essa cirurgia, quando realizada na manhã do proestro, sob anestesia com TBE, não compromete nem a amplitude nem o horário de deflagração do pico de LH (POLETINI et al., 2003). Conseqüentemente, pode-se concluir que, similar à cirurgia de canulação da veia jugular, a cirurgia fictícia de retirada das adrenais e dos ovários (Sham cirurgia) não modificou a secreção de LH na tarde do proestro, uma vez que o número de animais que apresentaram o pico pré-ovulatório de LH, bem como a amplitude desse pico e o número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do estro foram similares aos do grupo controle. Visto que esse estudo focou na secreção de LH, as ratas submetidas somente à canulação da veia jugular ou à canulação da veia jugular seguida pela SHAM cirurgia foram consideradas adequadas para compor o grupo Controle. Sendo assim, podemos sugerir que ausência do pico de LH e ovulação observada em 20% dos animais do grupo Controle sejam conseqüência de uma variação normal da nossa colônia. Essa variação está de acordo com estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório ou mesmo pelo nosso grupo, em laboratórios no exterior, onde um percentual de 20% de ratas que ciclam regularmente, mas que não exibem pico de LH no proestro, é freqüentemente observado (ANSELMO-FRANCI et al., 1997). À semelhança do que ocorre em mulheres, ciclos regulares anovulatórios também são comumente encontrados em ratas.

A ovariectomia realizada no início da manhã do proestro não comprometeu a ocorrência do pico de LH. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores nos quais o pico pré-ovulatório de LH não foi abolido pela ovariectomia realizada entre às 3h00 e 13h30 do proestro (KALRA, 1975, LAWTON, 1972, LEGAN; KARSH, 1975) e sugere que a secreção de esteróides ovarianos no proestro não é essencial para desencadear o pico de LH. De fato, tem sido demonstrado que, para ocorrência do aumento pré-ovulatório da secreção de GnRH/LH, não é necessário que as concentrações de estradiol permaneçam elevadas durante todo o período pré-ovulatório, mas sim que concentrações moderadamente elevadas desse hormônio estejam presentes por um período de tempo prolongado, de aproximadamente 15 horas, em ratas e ovelhas, e 60 horas em mulheres (EVANS et al., 1997, MOENTER; CARATY; KARSCH, 1990, SARKAR; FINK, 1980, XIA et al., 1992). Fundamentalmente, enquanto o término de um estímulo estrogênico de longa duração, antes do início de pico de LH, não afetou nem a amplitude nem a duração do pico de GnRH (EVANS et al., 1997), a ovariectomia realizada às 23h00 horas do diestro, a qual impediu o aumento posterior da secreção de estradiol, bloqueou completamente a ocorrência do pico de LH (KALRA, 1975). Da mesma forma, a exposição do cérebro e da hipófise a níveis extremamente elevados de estradiol por um curto período de tempo não foi suficiente para induzir o pico de LH (YAMAJI et al., 1971). Na hipófise, o estradiol age diretamente, estimulando a síntese de LH (AJIKA et al., 1972) e a expressão de receptores para GnRH (CLARKE et al., 1988). No entanto, no hipotálamo, uma vez que os neurônios GnRH não expressam receptores clássicos para estradiol do tipo alfa ( $Er-\alpha$ ) (HERBISON; ROBINSON; SKINNER, 1993; LEHMAN; KARSCH, 1993), tem sido postulado que as ações de retroalimentação positiva do estradiol poderiam ocorrer não nos neurônios

produtores de GnRH da APOM, mas sim em interneurônios vizinhos ou mesmo distantes desses, os quais possuem receptores para estradiol (ERs) e conectam-se diretamente ou indiretamente aos neurônios GnRH. Assim, durante a retroalimentação positiva o estradiol atua por meio da via transsináptica, estimulando a síntese e a liberação de neurotransmissores excitatórios como, NT, NPY e NA, enquanto diminui a síntese e a liberação de neurotransmissores inibitórios como, as  $\beta$ -endorfinas e possivelmente do ácido gama-aminobutírico (GABA), promovendo, assim, um aumento da síntese de GnRH. (para referências ver HERBISON, 2001). Durante esse período de longa atuação, o estradiol induz a síntese de PR nos interneurônios cerebrais (LERANTH et al., 1992), preparando todo sistema de forma a permitir a ação estimulatória dos neurônios responsivos à progesterona no eixo HPG, garantindo a liberação aguda e maciça de GnRH e, conseqüentemente, o pico de LH. Apresentando tal organização neuroanatômica, espera-se que os efeitos da retroalimentação positiva dos estrógenos sobre o sistema de neurônios GnRH ocorram precocemente em relação ao início do pico de GnRH/LH e, portanto, a presença de estradiol somente seria necessária quando esses elementos neuronais sensíveis ao estradiol fossem ativados. Em nosso estudo, a ovariectomia, a qual provocou um decréscimo na secreção de estradiol durante todo o dia proestro, foi realizada quando a maior parte dos efeitos de retroalimentação positiva dos estrógenos sobre os neurônios GnRH já havia sido processada, e portanto, a ocorrência do pico de LH não era mais dependente desse hormônio. Nesse momento, a progesterona e/ou os PRs tornam-se os elementos mais importantes dessa rede neuronal.

Na população de ratas utilizadas nesse estudo, o horário de deflagração do pico de LH variou entre 16h00 e 19h00 no grupo Controle e entre 15h00 e 19h00 h

no grupo OVX. Essa variação é comumente observada em ratas, independentemente da procedência e das condições ambientais em que são mantidas. Por essa razão, para que a determinação do horário e da amplitude dos picos pré-ovulatórios seja mais confiável, é necessário que amostras sangüíneas sejam coletadas de forma seriada, abrangendo o período que compreende os picos. Assim, quanto menor o intervalo de tempo entre as colheitas de amostras sangüíneas, maior é a precisão na determinação do horário e da amplitude dos picos hormonais. Não obstante o horário de ocorrência do pico tenha variado, as ratas do Grupo Controle apresentaram o pico de LH, na sua maioria (cerca de 70,8%), após as 17h00, enquanto para maioria dos animais OVX (cerca de 77%), o pico de LH ocorreu antes das 17h00, sugerindo uma antecipação desse pico pela ovariectomia (Fig 2 B). Estudos anteriores sugerem que o estresse cirúrgico da ovariectomia realizada na manhã do proestro poderia antecipar o pico de LH da tarde desse dia (LAWTON, 1972, NEQUIM; SCHWARTZ, 1971). No entanto, em nosso estudo, esse efeito não pode ser atribuído ao procedimento cirúrgico, visto que o horário de ocorrência do pico de LH nos animais SHAM ovariectomizados foi semelhante ao das ratas submetidas apenas à canulação da veia jugular.

A síntese e a secreção de GnRH/LH são reguladas pelos esteróides ovarianos por meio de dois mecanismos de efeitos opostos: o de retroalimentação positiva (estimulatório) e o de negativa (inibitório), que se sobrepõem durante todo o ciclo reprodutivo (HERBISON, 1998). De fato, tem sido demonstrado que, embora o estradiol estimule a síntese de GnRH/LH, também inibe a sua secreção (CHONGTHAMMAKUN; TERESAWA, 1993). A sobreposição dos efeitos estimulatórios e inibitórios do estradiol é bem evidente no final da fase folicular, quando a exposição prolongada aos níveis crescentes de estradiol, estimula o

aumento da síntese de LH e de GnRH, mas não a sua liberação, o que colabora para a estocagem desses hormônios, preparando os neurônios GnRH e os gonadotrófos para liberação aguda de GnRH/LH na tarde do proestro. Como citamos anteriormente, é possível que o aumento de síntese de GnRH induzida pelo estradiol nesse período seja mediado por neurotransmissores excitatórios, visto que já foi demonstrado que a NA, por exemplo, aumenta a síntese desse neuropeptídeo (KIM et al., 1994). Por outro lado, a baixa liberação de GnRH nessa fase poderia ser explicada pela ação dos estradiol em estimular interneurônios inibitórios dos neurônios GnRH, além de atuar diretamente nos neurônios GnRH, possivelmente alterando a interação entre esses neurônios e células gliais (HERBISON, 2001). Dessa forma, o adiantamento no pico de LH nas ratas ovariectomizadas poderia ser explicado pelo descréscimo da secreção de estradiol, libertando os neurônios GnRH do controle inibitório do estradiol.

Apesar de que em macacas e ovelhas o pico de gonadotrofinas pode ser induzido apenas pelo estradiol, os gonadotrofos hipofisários e o sistema neuronal GnRH de ratas requerem a presença de progesterona para que o pico de LH ocorra em sua completa magnitude (KALRA, 1993). A importância da ativação dos PRs para deflagração do pico de LH é demonstrada pela ausência da sensibilização hipofisária ao GnRH e do pico de gonadotrofinas em camundongos ovariectomizados tratados com estradiol, nos quais os receptores para progesterona foram nocauteados (CHAPPEL et al, 1999). Similarmente, o tratamento com ZK98299, um inibidor da ação da progesterona, bloqueou completamente o pico de GnRH/LH em ratas ovariectomizadas, sensibilizadas previamente com estradiol (CHAPPELL; LEVINE, 2000). Além disso, em condições fisiológicas, a administração

de RU-486 a ratas na manhã do proestro bloqueou completamente o pico endógeno de LH (BAUER-DANTOIN et al, 1983).

Em ratas que ciclam regularmente, um importante aumento na secreção de progesterona que ocorre na tarde do proestro, quase simultaneamente com o pico de LH, é o único descrito nesse dia. Vários investigadores sugerem que esse pico de progesterona é de origem ovariana, resultante da estimulação direta dessa glândula pelas gonadotrofinas hipofisárias, principalmente pelo LH, e é o responsável pela deflagração e amplificação do pico pré-ovulatório de LH (EVERETT, 1948). A observação de que em nosso estudo a ovariectomia bloqueou completamente o pico de progesterona da tarde do proestro reforça a idéia de sua origem ovariana. No entanto, seu papel na deflagração do pico de LH pode ser questionado, uma vez que a amplitude do pico de LH nas ratas OVX foi similar à das ratas Controle, mesmo na ausência desse pico de progesterona. Esse fato nos leva a supor que, contrariamente ao que é sugerido pela literatura, o pico de progesterona da tarde do proestro é conseqüência, mas não causa, do aumento da secreção de LH que ocorre nesse dia. Portanto, o pico pré-ovulatório de LH parece ser induzido pela ação da progesterona originada em outro local, provavelmente na adrenal.

Para a maioria dos autores, os ovários representam a única fonte produtora de progesterona para o controle da secreção de gonadotrofinas. No entanto, fortes evidências sugerem que as adrenais, as quais produzem e secretam quantidades significativas de esteróides, podem também desempenhar um papel fundamental na regulação do pico de LH. De fato, em ratas pré-púberes, a adrenalectomia, realizada anteriormente ao 25<sup>o</sup> dia de vida, retardou a ocorrência da puberdade (GORSKI; LAWTON, 1971). Da mesma forma, a administração de ACTH a ratas imaturas estroginizadas provocou um pico pré-ovulatório de LH; esse efeito não foi alterado



pela ovariectomia, mas foi completamente abolido pela adrenalectomia (PUTNAM; BRANN; MAHESH, 1991). Em ratas que ciclam regularmente, os esteróides adrenais apresentam um ritmo de secreção circadiano diretamente relacionado com o ciclo de luz (MANN et al., 1977; CHEIFETZ; GAFFUD; DINGMAN, 1968). A quebra desse ritmo por meio da exposição constante à luz resultou em aciclicidade e na completa abolição do pico pré-ovulatório de LH (CHEIFETZ; GAFFUD; DINGMAN, 1968). Além disso, as concentrações plasmáticas do hormônio liberador da corticotropina (CRH), ACTH e corticosterona são mais elevadas na tarde do proestro, quando comparadas aos outros dias do ciclo, (BOHLER et al, 1990; BUCKINGHAM; DOHLER; WILSON, 1978; RAPS; BARTHE; DESAULLES, 1970), sugerindo um aumento da atividade do eixo adrenal no dia da deflagração do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Perfil semelhante de secreção de ACTH foi observado em mulheres, sendo as maiores concentrações desse hormônio presentes na fase pré-ovulatória do ciclo menstrual (GENAZZANI et al., 1975; KERDELHUE et al., 2002). Em conjunto, esses achados sugerem que os esteróides adrenais exercem uma importante atividade regulatória na secreção de gonadotrofinas *in vivo*. Nesse estudo, a observação de que a adrenalectomia bloqueou a ocorrência do pico de LH na maioria dos animais estudados (85%) (Fig. 3) está de acordo com esses achados e reforça a participação dos esteróides adrenais na secreção de LH. A progesterona e a corticosterona representam os dois principais esteróides secretados pelas adrenais em resposta ao estímulo pelo ACTH. No entanto, a progesterona parece ser o principal esteróide adrenal relacionado com a regulação da secreção de LH, visto que a progesterona, mas não a corticosterona, foi capaz de estimular a liberação de LH em ratas estrogenizadas no dia da sua administração (BRANN, PUTNAM, MAHESH, 1991). O fato do RU-486 ter sido

capaz de suprimir o efeito estimulatório do ACTH sobre a secreção de LH em ratas OVX tratadas com estradiol corrobora com essa hipótese (PUTNAM; BRANN; MAHESH, 1991). Sendo assim, podemos concluir que o bloqueio da secreção de progesterona, mas não da corticosterona, observado nas ratas, esteja envolvido na supressão do pico de LH.

Embora as concentrações plasmáticas de progesterona que antecedem o início do pico pré-ovulatório LH sejam descritas como baixas (BARRACLOUGH et al., 1971) e o pico de secreção de progesterona ovariana do fim da tarde do proestro (pico 2) seja o único descrito nesse dia, um aumento significativo na secreção de progesterona foi observado por volta do meio-dia nas ratas Controles (pico 1). Esse pico não foi bloqueado pela ovariectomia realizada na manhã do proestro e também foi observado nas ratas cronicamente OVX, tratadas ou não com estradiol. No entanto, foi praticamente abolido pela adrenalectomia. Em vista dessas observações, podemos sugerir que sua principal origem seja a adrenal. Uma vez que o pico de progesterona do meio-dia foi observado sempre no mesmo horário, ao longo de três dias consecutivos, nas ratas cronicamente OVX, pode-se sugerir a existência de um caráter circadiano, o qual não depende do estradiol, já que não encontramos diferença entre os grupos OVO e OVE (Fig. 6 e 7). No entanto, futuros experimentos são necessários para se verificar se de fato existe um ritmo circadiano na secreção de progesterona.

Como podemos observar na figura 8, quando o pico 1 de progesterona (pico das 12h00, de origem adrenal) e o pico 2 (da tarde do proestro, de origem ovariana) estavam presentes, ou quando somente o pico 1 estava presente, o pico de LH ocorreu normalmente. Por outro lado, quando o pico 1 estava ausente, o pico de LH não ocorreu. Esses dados sugerem que esse pico de progesterona, de origem

adrenal, que ocorre por volta do meio-dia, pode ser o único responsável pela deflagração do pico pré-ovulatório de LH. Essa hipótese é reforçada por estudos que demonstraram que em mulheres a administração de ACTH, mas não de hCG, aumentou a secreção de progesterona na fase folicular (STROTT; YOSHIMI; LIPSETT, 1969), assim como em mulheres menopausadas tratadas com dexametasona (VERMEULEN, 1976). Também em ratas as concentrações de progesterona são mais altas na veia adrenal do que na veia ovariana, e as mais altas concentrações foram observadas no início da tarde do proestro (SHAIKH; SHAIKH, 1975). Portanto, nossos dados descrevem um desconhecido, mas pico claro de progesterona ao meio-dia e suportam a importância da adrenal como uma importante fonte de progesterona durante a fase folicular tardia envolvida na deflagração do pico pré-ovulatório de LH.

Nossos resultados trazem à tona outra importante questão: uma comunicação entre os ovários e as adrenais. Essa hipótese baseia-se na observação do decréscimo na amplitude do pico de progesterona do meio-dia, supostamente de origem adrenal, provocado pela ovariectomia. O estradiol parece regular a atividade da adrenal, uma vez que a supressão da função ovariana com etinil estradiol diminuiu tanto as concentrações basais como as estimuladas pelo ACTH de progesterona e 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (DE GEYTER et al., 2002). Da mesma forma, uma redução significativa na secreção dos esteróides adrenais após o estímulo com ACTH foi observada em mulheres OVX quando comparadas a mulheres com ciclos ovulatórios regulares (LOBO et al., 1982). No entanto, nossos dados sugerem que a atividade da adrenal pode ser regulada por outro fator ovariano, visto que nenhuma diferença na amplitude do pico de progesterona do meio-dia foi encontrada entre as ratas OVE e OVO. Portanto, a natureza molecular

desse mediador endócrino ovariano ainda necessita ser determinada. Nitidamente, a adrenalectomia bloqueou o pico de progesterona de origem ovariana da tarde do proestro. É possível que esse efeito seja consequência da ausência do pico de LH nos animais ADX, uma vez que está bem determinado que o LH induz a luteinização nas células da granulosa e a síntese e, a secreção de progesterona (NUTI; MEYER, 1975).

Uma intrigante observação é que, apesar da ativação dos PR ser importante para desencadear o pico de pré-ovulatório de LH, imediatamente antes do início do pico uma pequena quantidade de progesterona tem sido mensurada na circulação (FEDER; BROWN-GRANT; CORKER, 1971; KALRA; KALRA, 1974; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Enquanto a hipótese de que os PR de progesterona poderiam ser ativados por um mecanismo independente do ligante tem sido proposta (CHAPPELL; LEE; LEVINE, 2000; O'MALLEY et al., 1995), sua ativação por um ligante cognato permanece como um possível mecanismo em potencial (MAHESH; BRANN, 1992; KE; RAMIREZ, 1987). Desse modo, nós podemos sugerir que o pico do meio-dia descrito nesse estudo pode ser o responsável pela ativação dos receptores para progesterona imediatamente antes do início do pico de LH.

É interessante notar que o pico de LH do proestro, o qual se inicia às 15h00, é precedido por um aumento da liberação de NA na APOm às 13h30 (SZAWKA et al., 2007), ou seja, imediatamente após o aumento da liberação de progesterona, que ocorre por volta 12h00-13h00. Tem sido demonstrado que a progesterona provoca um aumento rápido na liberação de NA o qual, além de ser importante para a deflagração do pico de LH (ANSELMO-FRANCI et al., 1997; HELENA; FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2002), também induz à síntese de GnRH (KANG et al., 1998; KIM et al., 1994) Dessa forma, podemos sugerir que o pico de progesterona descrito

ao meio-dia aqui, mas não o pico de progesterona da tarde do proestro, pode ser o responsável pela amplificação e pela iniciação do pico pré-ovulatório de LH.

Os resultados deste trabalho permitem sugerir que no proestro existe um pico de progesterona entre às 12:00 e 14:00 h, de origem adrenal, o qual parece estar diretamente envolvido na gênese do pico de LH. Esse pico parece ser circadiano uma vez que ratas OVX apresentam um ritmo diário de secreção de progesterona, com um pico por volta das 12:00 h. Por sua vez, o aumento de secreção de progesterona que ocorre na tarde do proestro é de origem ovariana e não é necessário para a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Além disso, existe uma comunicação endócrina entre ovário e adrenal, de forma que o ovário participa da regulação da secreção de progesterona pela adrenal. No entanto, o estradiol não está envolvido na regulação da secreção de progesterona pela adrenal. Sendo assim, a natureza molecular desse mediador endócrino ovariano ainda necessita ser determinada.

## **Referências Bibliográficas 79**

1. Ajika K, Krulich L, Fawcett CP, McCann SM. Effects of estrogen on plasma and pituitary gonadotropins and prolactin, and on hypothalamic releasing and inhibiting factors. *Neuroendocrinology* 1972;9(5):304-15.
2. Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Controle neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: Antunes-Rodrigues J; Moreira AC; Elias LIK; Castro M (Eds.). *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. Cap. 22: 318-40.
3. Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res* 1997 Sep 5;767(2):289-96.
4. Ashiru, O. A.; Blake, C. A. Effects of ovariectomy, estrogen and LHRH on periovulatory increases in plasma gonadotropins in the cyclic rat. *Biology of Reproduction*, 1980 Apr;22(3): 533-40.
5. Barraclough CA, Collu R, Massa R, Martini L. Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: effects of Nembutal and exogenous gonadotropins. *Endocrinology* 1971 Jun;88(6):1437-47.
6. Bauer-Dantoin AC, Tabesh B, Norgle JR, Levine JE. RU486 administration blocks neuropeptide Y potentiation of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone-induced LH surges in proestrous rats. *Endocrinology* 1993 Dec;133(6):2418-23
7. Bennett-Clarke C, Joseph SA. Immunocytochemical distribution of LHRH neurons and processes in the rat: hypothalamic and extrahypothalamic locations. *Cell Tissue Res* 1982;221(3):493-504.
8. Bethea CL, Fahrenbach WH, Sprangers SA, Fresh F. Immunocytochemical localization of progesterin receptors in monkey hypothalamus: effect of estrogen and progesterin. *Endocrinology* 1992 Feb;130(2):895-905.
9. Bohler HC, Jr., Zoeller RT, King JC, Rubin BS, Weber R, Merriam GR. Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1990 Aug;8(3):259-62.
10. Brann DW, Putnam CD, Mahesh VB. Validation of the mechanisms proposed for the stimulatory and inhibitory effects of progesterone on gonadotropin secretion in the estrogen-primed rat: a possible role for adrenal steroids. *Steroids* 1991 Feb;56(2):103-11.
11. Buckingham JC, Dohler KD, Wilson CA. Activity of the pituitary-adrenocortical system and thyroid gland during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 1978 Sep;78(3):359-66.

12. Callegari, FVR. Influência do estresse agudo no pico pré-ovulatório de LH de ratas. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004, Agosto.
13. Carmel PW, Araki S, Ferin M. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* 1976 Jul;99(1):243-8.
14. Cemeroglu AP, Kletter GB, Guo W, Brown MB, Kelch RP, Marshall JC, et al. In pubertal girls, naloxone fails to reverse the suppression of luteinizing hormone secretion by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Oct;83(10):3501-6.
15. Chappell PE, Lee J, Levine JE. Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Endocrinology* 2000 Apr;141(4):1486-92.
16. Chappell PE, Schneider JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW, et al. Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice. *Endocrinology* 1999 Aug;140(8):3653-8.
17. Cheifetz P, Gaffud N, Dingman JF. Effects of bilateral adrenalectomy and continuous light on the circadian rhythm of corticotropin in female rats. *Endocrinology* 1968 Jun;82(6):1117-24.
18. Ching M. Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anesthetics. *Neuroendocrinology* 1982 Apr;34(4):279-85.
19. Chongthammakun S, Terasawa E. Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 1993 Feb;132(2):735-43.
20. Clarke IJ, Cummins JT, Crowder ME, Nett TM. Pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone in relation to changes in pituitary and plasma gonadotropins in ovariectomized hypothalamo/pituitary-disconnected ewes. II. A marked rise in receptor number during the acute feedback effects of estradiol. *Biol Reprod* 1988 Sep;39(2):349-54.
21. Colombo JA, Ritterman SI. Prolactin and LH release induced by kainic acid administration within the preoptic-suprachiasmatic region in behaving male rats. *Exp Brain Res* 1983;52(2):257-60.
22. De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, Nieschlag E, Holzgreve W. Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):933-9.
23. Dierschke DJ, Yamaji T, Karsch FJ, Weick RF, Weiss G, Knobil E. Blockade by progesterone of estrogen-induced LH and FSH release in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1973 May;92(5):1496-501.



24. DonCarlos LL, Greene GL, Morrell JI. Estrogen plus progesterone increases progesterin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology* 1989 Dec;50(6):613-23.
25. Edelstein MC, Seltman HJ, Cox BJ, Robinson SM, Shaw RA, Muasher SJ. Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in cycles with gonadotropin-releasing hormone agonist suppression are not predictive of pregnancy outcome. *Fertil Steril* 1990 Nov;54(5):853-7.
26. Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Brooks B, Algur N, Zylber-Haran E, Diamant YZ. The origin of serum progesterone during the follicular phase of menotropin-stimulated cycles. *Hum Reprod* 1998 Jan;13(1):9-14.
27. Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 1997 Dec;138(12):5408-14.
28. Everett JW. Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol Rev* 1964 Jul;44:373-431.
29. Everett JW. Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 1948 Dec;43(6):389-405.
30. Feder HH, Brown-Grant K, Corker CS. Pre-ovulatory progesterone, the adrenal cortex and the 'critical period' for luteinizing hormone release in rats. *J Endocrinol* 1971 May;50(1):29-39.
31. Ferin M, Tempone A, Zimmering PE, Van de Wiele RL. Effect of antibodies to 17beta-estradiol and progesterone on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1969 Dec;85(6):1070-8.
32. Freeman MC, Dupke KC, Croteau CM. Extinction of the estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 1976 Jul;99(1):223-9.
33. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of reproduction*. Second Edition. New York: E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, 1994; 613-58.
34. Genazzani AR, Lemarchand-Beraud T, Aubert ML, Felber JP. Pattern of plasma ACTH, hGH, and cortisol during menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1975 Sep;41(3):431-7.
35. Gibson M, Nakajima ST, McAuliffe TL. Short-term modulation of gonadotropin secretion by progesterone during the luteal phase. *Fertil Steril* 1991 Mar;55(3):522-8.
36. Gore AC, Roberts JL. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1995 Mar;136(3):889-96.

37. Gorski FM, Lawton IE. The timing of the adrenal-ovarian interaction period in the prepuberal rat. *Biol Reprod* 1974 Nov;11(4):413-20.
38. Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J. Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 1992 Jul;14(3):239-49.
39. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 1974 Mar;36(3):391-2.
40. Heape W. The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Q. J. Micr. Sci.* 1900; 44:1-70.
41. Helena CV, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Res* 2002 Nov 15;955(1-2):245-52.
42. Herbison AE, Pape JR. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 2001 Oct;22(4):292-308.
43. Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 1993 Apr;57(4):751-9.
44. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998 Jun;19(3):302-30.
45. Ibata Y, Watanabe K, Kinoshita H, Kubo S, Sano Y, Sin S, et al. The location of LH-RH neurons in the rat hypothalamus and their pathways to the median eminence. *Experimental immunohistochemistry and radioimmunoassay. Cell Tissue Res* 1979 May 25;198(3):381-95.
46. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) of the National Academy of Science, Bethesda, MD. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 1996.
47. Judd S, Terry A, Petrucco M, White G. The source of pulsatile secretion of progesterone during the human follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Feb;74(2):299-305.
48. Kalra SP, Kalra PS. Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. *Endocrinology* 1974 Dec;95(6):1711-8.
49. Kalra SP. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 1993 Oct;14(5):507-38.
50. Kalra SP. Observations on facilitation of the preovulatory rise of LH by estrogen. *Endocrinology* 1975 Jan;96(1):23-8.

51. Kang SS, Son GH, Seong JY, Choi D, Kwon HB, Lee CC, Kim K. Noradrenergic neurotoxin suppresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in ovariectomized and steroid-treated rats. *Journal of Neuroendocrinology* 1998 Dec;10(12): 911-18.
52. Karsch FJ. Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Annu Rev Physiol* 1987;49:365-82.
53. Kasa-Vubu JZ, Dahl GE, Evans NP, Thrun LA, Moenter SM, Padmanabhan V, et al. Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1992 Jul;131(1):208-12.
54. Ke FC, Ramirez VD. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 1987 Jun;45(6):514-7.
55. Kerdelhue B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT, Jr., Jones GS, Scholler R, et al. Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology* 2002 Mar;75(3):158-63.
56. Kim K, Lee BJ, Cho BN, Kang SS, Choi WS, Park SD, et al. Blockade of noradrenergic neurotransmission with diethylthiocarbamic acid decreases the mRNA level of gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus of ovariectomized, steroid-treated prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 1994 Jun;59(6):539-44.
57. King JC, Anthony EL, Fitzgerald DM, Stopa EG. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons in human preoptic/hypothalamus: differential intraneuronal localization of immunoreactive forms. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 Jan;60(1):88-97.
58. Labhsetwar AP. Role of estrogens in ovulation: A study using the estrogen-antagonist, I.C.I. 46,474. *Endocrinology* 1970 Sep;87(3):542-51.
59. Lawton IE. Facilitatory feedback effects of adrenal and ovarian hormones on LH secretion. *Endocrinology* 1972 Feb;90(2):575-9.
60. Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975 Jan;96(1):50-6.
61. Legan SJ, Karsch FJ. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 1975 Jan;96(1):57-62.
62. Lehman MN, Karsch FJ. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 1993 Aug;133(2):887-95.
63. Leranth C, MacLusky NJ, Brown TJ, Chen EC, Redmond DE, Jr., Naftolin F. Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive progesterin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1992 Jun;55(6):667-82.

64. Levine JE, Chappell P, Besecke LM, Bauer-Dantoin AC, Wolfe AM, Porkka-Heiskanen T, et al. Amplitude and frequency modulation of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone release. *Cell Mol Neurobiol* 1995 Feb;15(1):117-39.
65. Levine JE. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* 1997 Feb;56(2):293-302.
66. Liu JH, Yen SS. Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983 Oct;57(4):797-802.
67. Lobo RA, Goebelsmann U, Brenner PF, Mishell DR, Jr. The effects of estrogen on adrenal androgens in oophorectomized women. *Am J Obstet Gynecol* 1982 Feb 15;142(4):471-8.
68. Long JA, Evans HM. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer. Calif.* 1922; 6:1-148.
69. Mahesh VB, Brann DW. Interaction between ovarian and adrenal steroids in the regulation of gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992 Mar;41(3-8):495-513.
70. Mahesh VB, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 1998 Dec;63(12):616-29.
71. Mann DR, Cost MG, Jacobson CD, MacFarland LA. Adrenal gland rhythmicity and pituitary regulation of adrenal steroid secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977 Dec;156(3):441-5.
72. Micevych P, Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P, Lu JK. The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 2003 Jul;78(1):29-35.
73. Miller WL. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998 Apr;12(1):67-81.
74. Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 1990 Sep;127(3):1375-84.
75. Naik DV. Immunoreactive LH-RH neurons in the hypothalamus identified by light and fluorescent microscopy. *Cell Tissue Res* 1975;157(4):423-36.
76. Navarro CE, Cabrera RJ, Donoso AO. Release of 3H-noradrenaline by excitatory amino acids from rat mediobasal hypothalamus and the influence of aging. *Brain Res Bull* 1994;33(6):677-82.
77. Neill, J. D.; Freeman, M. E.;Tillson, S. A. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinol* 1971 Dec;89(6): 1448-53,

78. Nequin LG, Schwartz NB. Adrenal participation in the timing of mating and LH release in the cyclic rat. *Endocrinology* 1971 Feb;88(2):325-31.
79. Nuti KM, Meyer RK. Effects of partial lutectomy in PMSG-primed immature pregnant rats. *Biol Reprod* 1975 Nov;13(4):415-22.
80. O'Malley BW, Schrader WT, Mani S, Smith C, Weigel NL, Conneely OM, et al. An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptors. *Recent Prog Horm Res* 1995;50:333-47.
81. Petersen SL, McCrone S, Keller M, Shores S. Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology* 1995 Aug;136(8):3604-10.
82. Peterson RE. Metabolism of adrenal steroids. In: Christy NP (ed) *The human adrenal cortex*. New York: Harper Row; 1971;87-189.
83. Poletini MO, Szawka RE, Freitas Marcon RM, Veiga MD, Franci CR, nselmo-Franci JA. A method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003 Aug;12(1):41-8.
84. Putnam CD, Brann DW, Mahesh VB. Acute activation of the adrenocorticotropin-adrenal axis: effect on gonadotropin and prolactin secretion in the female rat. *Endocrinology* 1991 May;128(5):2558-66.
85. Raps D, Barthe PL, Desaulles PA. Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in normal female rats. *Experientia*. 1971 Mar 15;27(3):339-40.
86. Romano GJ, Krust A, Pfaff DW. Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 1989 Aug;3(8):1295-300.
87. Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ. Norepinephrine neurons in mouse locus coeruleus express c-fos protein after N-methyl-D,L-aspartic acid (NMDA) treatment: relation to LH release. *Brain Res* 1991 Oct 4;561(1):11-9.
88. Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-estrous rats. *Nature* 1976 Dec 2;264(5585):461-3.
89. Sarkar DK, Fink G. Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol* 1980 Sep;86(3):511-24.
90. Scaramuzzi RJ, Tillson SA, Thorneycroft IH, Caldwell BV. Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* 1971 May;88(5):1184-9.

91. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 1971 Sep 10;173(4001):1036-8.
92. Shaikh AA, Shaikh SA. Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocrinology* 1975 Jan;96(1):37-44.
93. Shirley B, Wolinsky J, Schwartz NB. Effects of a single injection of an estrogen antagonist on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1968 May;82(5):959-68.
94. Silverman AJ, Krey LC, Zimmerman EA. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biol Reprod* 1979 Feb;20(1):98-110.
95. Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P, Lu JK, Micevych P. Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Dev Neurosci* 2003 Sep;25(5):343-8.
96. Skinner DC, Evans NP, Delaleu B, Goodman RL, Bouchard P, Caraty A. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 1;95(18):10978-83.
97. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975 Jan;96(1):219-26.
98. Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ. Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 Feb;58(2):378-83.
99. Strott CA, Yoshimi T, Lipsett MB. Plasma progesterone and 17-hydroxyprogesterone in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 1969 May;48(5):930-9.
100. Szawka RE, Franci CR, Nselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol* 2007 May;19(5):374-82.
101. Vermeulen A. The hormonal activity of the postmenopausal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1976 Feb;42(2):247-53.
102. Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE. Persistent estrus and blockade of progesterone-induced LH release follows lesions which do not damage the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1978 May;102(5):1645-8.
103. Wise PM, Rance N, Barraclough CA. Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1981 Jun;108(6):2186-93.

104. Witcher JA, Nearhoof KF, Freeman ME. Secretion of luteinizing hormone (LH) and pituitary receptors for LH-releasing hormone as modified by the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 1984 Dec;115(6):2189-94.
105. Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1982 Dec;35(6):429-38.
106. Xia L, Van VD, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M. A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1992 Dec;131(6):2812-20.
107. Xiao E, Xia-Zhang L, Shanen D, Ferin M. Tonic support of luteinizing hormone secretion by adrenal progesterone in the ovariectomized monkey replaced with midfollicular phase levels of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Jul;82(7):2233-8.
108. Yamaji T, Dierschke DJ, Hotchkiss J, Bhattacharya AN, Surve AH, Knobil E. Estrogen induction of LH release in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1971 Oct;89(4):1034-41.