

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- UNIFAL-MG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

ALINE STIVANIN TEIXEIRA

EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO
SEXUAL DE RATOS MACHOS

Alfenas-MG
2012

ALINE STIVANIN TEIXEIRA

**EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO
SEXUAL DE RATOS MACHOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: neuroendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Alfenas-MG

2012

ALINE STIVANIN TEIXEIRA

**EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO
SEXUAL DE RATOS MACHOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: neuroendocrinologia.

Aprovada em:

Profº. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Profº. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Profº. Dr.

Instituição:

Assinatura:

*“O garoto aprende as regras.
Com o tempo se ilude.
Quando privado de todos os seus pensamentos,
luta cada vez mais.
Até que decide fazer um juramento a si mesmo,
jura, que a partir daquele dia,
nunca, ninguém levará
sua força de vontade ...”*

J. Hetfield; L. Ulrich, K. Hammett (The Unforgiven- Metallica)

*Dedico esse trabalho à **minha mãe, Elenice**, que é meu exemplo, meu norte, meu porto seguro. É quem eu quero que tenha orgulho de mim. É de quem eu espero aprovação. É para quem, literalmente, eu devo a vida e tudo o que estou vivendo agora. Obrigada pelas várias segundas- chances! Te amo!*

***Ao meu pai, Paulo Sergio**, que foi embora cedo e está no céu. Quando eu te perguntei se você estava com medo, na verdade era eu quem estava.*

***Á minha irmã, Simone e ao meu irmão Otávio**, que são a ponte com o meu passado e abriram espaço em suas vidas para que eu pudesse voltar a estudar.*

Amo vocês!!

***Ao meu namorado, Luis Fernando (Nani)**, que sempre esteve do meu lado e me faz buscar ser uma pessoa melhor para merecer o seu amor. Já lhe disse que eu te amo hoje?*

*Aos meus futuros **pacientes**.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho significa muito para mim! Diante das condições em que ele foi realizado, ou seja, concomitante ao curso de Medicina, sem a ajuda de algumas pessoas, ele seria impossível! Algumas palavras não irão retribuir toda a minha consideração, mas quero deixar claro que sempre lembrarei de todo o apoio recebido para que esse sonho se tornasse realidade.

O senso comum espera que os cientistas tenham tendência a serem ateus. Seria pretensão minha me considerar uma cientista e muito mais, desconsiderar a existência de **Deus**. Ao contrário do esperado, quanto mais estudo mais percebo a necessidade de **Deus** orquestrando os enigmas da vida. Agradeço a **Deus** pela força e saúde para ter desenvolvido este trabalho. Por ter aberto janelas após às portas que foram fechadas. E por ter atendido minhas preces toda vez que eu rezava antes de cada experimento.

A minha **mãe, Elenice Stivanin**, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelos esforços para me manter estudando, por acreditar em mim e por ter me dado uma segunda chance. Espero poder retribuir!

Ao meu **pai, Paulo Sergio Teixeira**, pelo exemplo de vida e por estar olhando por mim e me ajudando de um lugar privilegiado.

A minha **irmã, Simone Stivanin Teixeira** e ao meu **irmão, Otávio Henrique Stivanin Teixeira**, pela amizade, por abrirem espaço em sua casa para que eu pudesse voltar, pela compreensão nos momentos difíceis, por estarem do meu lado...

Ao **Luis Fernando Noronha**, pelo amor, companheirismo, por entender minha vida difícil e mesmo assim sempre estar do meu lado me incentivando e me socorrendo nos momentos difíceis.

Ao meu melhor amigo, **Roberto Benzi Munhoz**, por ser meu amigo e por todos os momentos que esteve presente na minha vida.

Quem tem amigos, tem tudo... Obrigada **Alcides de Melo, Aline Marina M. Braga, Ana Luíza Gonçalves, Ary de O. Silva Neto, Maria Aparecida B. Gonçalves, Luciana de O. Marques, Vanessa Cristina Moraes**. A todos os meu amigos, tanto da vida inteira, como agora, os novos amigos da Medicina. Cada um sabe a maneira como me ajudou...Muito obrigada!

Ao **Sr. Luiz Koiti**, administrador do Hospital São Joaquim (Beneficência Portuguesa) que foi responsável por um importante passo para que eu pudesse vir para Alfenas cursar Medicina e o Mestrado.

Muito obrigada ao meu orientador, **Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva**, por ter aceitado me orientar mesmo com a concomitante graduação em Medicina. Por ter aceitado as disciplinas cursadas em São Paulo. Por me mostrar a importância dos pequenos gestos e atitudes. Pelos ensinamentos, pelo apoio, pela confiança no meu trabalho e por abrir espaço no laboratório. Por ter construído a arena para os testes de motivação com a ajuda de seu filho, **Gabriel**. Pelos três ou quatro elogios que me fez... O reconhecimento de alguém exigente como você foi um dos meus maiores incentivos.

À minha primeira orientadora, **Prof. Dra. Carol Fuzeti Elias**, que me inspirou a fazer pesquisa, ensinou-me o rigor do método e a humanidade de mestre. Generosa, ensinou-me com paciência o “bê-a-bá” do laboratório, como me portar, a procurar sempre ser ética, a estudar, a fazer imunoistoquímica, a acreditar no sonho... Que compreendeu minha imaturidade e sempre esteve disponível para ainda orientar meus passos... Por ser um modelo de ser humano e mostrar que o exemplo é a melhor cartilha.

Ao **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**, por sua generosidade e exemplo de vida ao criar meios de difundir o conhecimento em Fisiologia, principalmente através da idéia do Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas. E em conjunto com a **Profa. Dra.**

Lucila Leico Kagohara Elias por disponibilizarem o laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP-SP para as dosagens hormonais. E à técnica do laboratório que realizou as dosagens, **Sra Maria Valci dos Santos**. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Newton Sabino Canteras**, **Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt** e **Prof. Dra. Luciane Valéria Sita**, do Departamento de Anatomia do ICB-USP pela amizade, pela disponibilidade em resolver minhas dúvidas e por abrir espaço no laboratório caso fosse necessário.

Ao **Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion**, atual presidente da SBFis, por manter o incentivo ao Programa Multicêntrico, pela gentileza com que sempre me trata e responde às minhas dúvidas.

À **Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão** por resolver minhas dúvidas práticas, por sua disponibilidade e por ter implantado a imunistoquímica no Laboratório de Fisiologia da Unifal/MG. E também por representar tão bem a Enfermagem na Área Básica!

À **Dra. Patrícia de Sá e Benevides** pelos belos trabalhos de mestrado e doutorado que serviram como guias para o desenvolvimento dos experimentos, e foram imprescindíveis diante da dificuldade de encontrar detalhamento de metodologia nos artigos científicos. E obrigada por resolver minhas dúvidas por e-mail, sempre de maneira tão solícita, mesmo sem me conhecer pessoalmente.

Ao **Dr. José Donato Junior** pela oportunidade de trabalhar como colaboradora em um dos seus artigos, na época de USP ainda. Por me ajudar com a busca bibliográfica e por me enviar diretamente dos EUA os artigos que eu não tinha acesso aqui em Alfenas.

À **Profa. M.e. Helena Alves Soares Chini**. que com a acessoria das secretárias **Andrelina S. Galieta** e **Silvia Ap. dos Reis Cunha**, permitiu o aproveitamento das disciplinas cursadas na Enfermagem no currículo da Medicina, o que foi essencial para que houvesse tempo para dedicação ao Mestrado.

Às **Profa. M.e. Lucélia Galdino Caputo e Profa. M.e. Alessandra C. Pupin Silvério** que ao se preocuparem em ir além de suas disciplinas contribuíram para meu preparo para a prova de seleção do mestrado.

À **Profa. Dra. Evelise Aline Soares** pela amizade, pelo incentivo e apoio diante das dificuldades de sobrevivência no curso de Medicina.

Aos professores na Medicina da Unifenas que sempre entenderam algumas faltas, sempre foram incentivadores e encorajadores da minha luta e por fazerem valer a pena cursar Medicina, em especial: **Adrian N. Bueno; Carlos Eduardo E. Velano; Carlos Henrique V. de Andrade; Cassandro M. Fernandes; Christiane B. G. Fleury; Débora M. Costa Vieira; Douglas Bueno da Silva; Flavia Beatriz de A. Ribeiro; Francisco R. Lello Santos; Luisa Patricia Fogarolli de Carvalho; Márcia de Freitas Godinho; Maristela Marinzeck B. Bareiro; Matheus; Miriam Monteiro de C. Graciano; Orlando Antônio Pereira; Rodrigo Liberato de Oliveira e Ronan Conde Santos.**

Ao **Prof. Dr. João Batista Vieira de Carvalho**, por sempre proporcionar oportunidades de crescimento profissional através da Angioliga e por entender minha ausência na fase final do Mestrado.

Ao amigo **Michael Brian Santiago** que me ajudou muito com os experimentos e com as análises estatísticas. Sou muito grata! Principalmente porque me ajudar envolvia estar no laboratório fora do horário comercial. Obrigada também aos amigos **Alexandre Vieira e Heloísa Helena Vilela Costa** que também me ajudaram com os experimentos, principalmente com as eutanásias. E à amiga **Fabiana Cardoso Vilela**, que me ensinou avaliar o ciclo estral das ratas, cedeu muitos ratos machos experientes e me auxiliou na adaptação ao protocolo de imunistoquímica do laboratório, além de outras coisas.

À **Jaqueline Angélica Dionisio e Camila Marchioni**, que moraram comigo durante grande parte do Mestrado e além de dividir as despesas, dividiram momentos importantes, escutaram meus desabafos, e tiveram paciência comigo.

Aos amigos **Ana Laura de O. Carvalho, Anna Cláudia G. Freire, Daniel A. de A. Galdino e Kriss A. Cabral** que fazem parte da turma ingressante no mestrado em 2010.

À amiga **Vanessa Cardoso Silva**, pelo exemplo de serenidade e foco. Além disso, por me ajudar na revisão da dissertação.

Às companheiras de disciplina em São Paulo **Mara Aparecida Pereira de Ávila e Melissa Santos Ferreira**, não foi fácil, mas vencemos essa batalha.

Adrielle Moreira de Faria, Clarice de C. Veloso, Érika Kristina Incerpi Garcia, Layla D. M. Cabral, Lidiane Orlandi, Luciana Costa Teodoro, Maria Ângela Rodrigues, Viviane Nogueira de Paiva, amigas do laboratório... E a todas as pessoas com quem tive oportunidade de conviver nesse período.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia **Marina Venâncio e José dos Reis Pereira** pela amizade e dedicação com os animais, e a **Maria de Fátima Marcos Silva** pela amizade e por cuidar da limpeza do laboratório.

Aos professores do laboratório de Fisiologia: **Prof. Dr. Carlos Giovani de O Nascimento, Profa. Dra. Jalile Amin Naves Ventura e Profa. Dra. Roseli Soncini**.

À secretaria de Pós- Graduação da Unifal/MG representada pelo **Sr. Thiago é Thiago Bueno Pereira e Sra. Maria Antonieta Nogueira Alvarenga**.

À Biblioteca da Unifal/MG representada pelos bibliotecários **Cecília M. Rodrigues Freitas, Fátima dos Reis Goiatá e Ronan Lázaro Gondim**.

A todos os funcionários do Biotério Central da Unifal/MG representados na pessoa do **Sr. João Francisco Vitório Rodrigues**, chefe da equipe.

Ao **Bruce Dickinson**, meu yorkshire, pelo amor, por me fazer companhia sempre que eu tive que ficar em Alfenas, por fazer uma festa quando eu chego em casa,

pelo carinho, lealdade e por sempre tentar me proteger.

Aos **ratos**, sem os quais o desenvolvimento científico não seria possível. Que cada fio de vida não tenha sido em vão.

À Unifal/MG e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com este trabalho e não foram citadas aqui. Muito obrigada!

“Eppur si muove”
Galileu Galilei, 1633

RESUMO

O estudo do comportamento sexual em ratos machos envolve a análise da motivação e da performance sexuais. A distinção está entre procurar o contato sexual e estar apto para realizar o ato copulatório. Este comportamento é necessário para a preservação da espécie e não para sobrevivência do indivíduo, uma vez que abstinência sexual não tem, em curto prazo, consequências adversas para o organismo. Sendo assim, difere consideravelmente de outros comportamentos espontâneos como alimentação, hidratação, termorregulação ou respiração. Estudos mostram que o estresse e a consequente ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e secreção de glicocorticóides pode alterar diversos parâmetros hormonais e comportamentais. O objetivo deste estudo foi analisar a motivação e performance sexuais de ratos machos, suas possíveis alterações, diante da administração aguda de dexametasona (DEXA), um glicocorticóide sintético. Foram utilizados ratos da linhagem wistar, mantidos em grupos de até 4 animais por caixa, em ciclo claro-escuro de 12hs a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para análise da performance sexual, ratos machos adultos, sexualmente experientes foram expostos a fêmeas receptivas, filmando-se 40 minutos, tratados com veículo ou tratado com DEXA, aguda e cronicamente. A análise do comportamento e da imunoistoquímica para Fos mostrou que a administração aguda melhorou parâmetros do comportamento sexual e reduziu a expressão de Fos no BST, no MnPO d, no MnPOv, PVN e SON. Enquanto a administração crônica não alterou nenhum parâmetro do comportamento e aumentou o número de células positivas para Fos no SON. Para análise da motivação sexual, ratos machos, sexualmente inexperientes, foram colocados em um aparato onde havia uma fêmea receptiva (incentivo sexual) e um macho sexualmente experiente (incentivo social), filmando-se 20 minutos, tratados com veículo ou tratados com DEXA. Os resultados mostram que a administração aguda de dexametasona aumentou a motivação sexual, enquanto a administração crônica não alterou nenhum dos parâmetros. Em conjunto, concluímos que a administração aguda de dexametasona aumentou a motivação sexual em ratos machos sexualmente inexperientes através de mecanismos envolvidos com a supressão do eixo HHA. Além disso, a dexametasona aguda melhorou parâmetros da performance sexual às custas de diminuição da atividade neuronal em áreas hipotalâmicas

relacionadas ao controle neuroendócrino em ratos machos sexualmente experientes.

Palavras-chave: comportamento sexual, glicocorticóides, Fos, corticosterona.

ABSTRACT

The study of sexual behavior in male rats involves the analysis of motivation and sexual performance. The distinction is between seeking sexual contact and being able to perform the copulatory act. This behavior is required for preservation of the species and not for survival of the individual, as abstinence has no short-term adverse effects for the organism. Thus, it differs considerably from other spontaneous behaviors such as feeding, hydration, thermoregulation or respiration. Studies show that stress and consequent activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and secretion of glucocorticoids can alter various hormonal and behavioral parameters. The aim of this study was to analyze the motivation and sexual performance of male rats, the possible changes before the acute administration of dexamethasone (DEXA), a synthetic glucocorticoid. Rats of the Wistar strain, maintained in groups of four animals per cage in a light-dark cycle of 12h at 21 ± 1 ° C. For analysis of sexual performance, adult male rats, sexually experienced were exposed to receptive females, for 40 minutes, treated with vehicle or treated with DEXA, acute and chronic. Behavior analysis and immunohistochemistry for Fos showed that acute administration improved parameters of sexual behavior and decreased the expression of Fos in BST, in MnPO and in MnPOv, PVN and SON. While chronic administration did not alter any parameter of sexual behavior and the number of Fos-positive cells in the SON. For analysis of sexual motivation, male rats, sexually inexperienced, were placed in an apparatus where there was a receptive female (sexual incentive) and a sexually experienced male (social incentive), for 20 minutes, treated with vehicle or treated with DEXA. The results show that the acute administration of dexamethasone increased sexual motivation, while the chronic administration did not affect any of the parameters. Together, we conclude that the acute administration of dexamethasone increased sexual motivation in sexually inexperienced male rats through mechanisms involved in suppression of the HPA axis. Moreover, dexamethasone acute parameters improved sexual performance at the expense of decreased neuronal activity in areas related to the hypothalamic control neuroendocrine sexually experienced male rats.

Key words: sexual behavior, glucocorticoids, Fos, corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotografias de comportamento de cópula de ratos.....28
- Figura 2-** Desenho esquemático representando a regulação do eixo HHA.....35
- Figura 3-** Ilustração esquemática do modelo do aparato utilizado para análise da motivação sexual.....47
- Figura 4 :** Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 6) ou Salina (1 ml/kg; n= 7) sobre o número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número total de entradas (C), número total de *rearing* (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E) em ratos sexualmente inexperientes no campo aberto.....60
- Figura 5 :** Efeito da administração crônica de dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 10) sobre o número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número total de entradas (C), número total de *rearing* (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E) em ratos sexualmente inexperientes no campo aberto.....61
- Figura 6 :** Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 11) ou Salina (1 ml/kg; n= 9) sobre parâmetros da motivação sexual: tempo de permanência na ZIF (A); tempo de permanência na ZIM (B); média de duração das visitas à ZIM (C); média de duração das visitas à ZIM (D); número de visitas à ZIF (E); número de visitas à ZIM (F) e escore de preferência (G)62
- Figura 7 :** Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 8) ou Salina (1 ml/kg; n= 7) sobre parâmetros da motivação sexual: tempo de permanência na ZIF (A); tempo de permanência na ZIM (B); média de duração das visitas à ZIM (C); média de duração das visitas à ZIM (D); número de visitas à ZIF (E); número de visitas à ZIM (F) e escore de preferência (G)63
- Figura 8 :** Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 11) ou salina (1 ml/kg; n= 9) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos sexualmente inesperientes submetidos à avaliação da motivação sexual.....64
- Figura 9:** Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 8) ou salina (1 ml/kg; n= 7) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos sexualmente inesperientes submetidos à avaliação da motivação sexual.....65
- Figura 10 :** Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 17) ou Salina (1 ml/kg; n= 14) sobre parâmetros pré-ejaculatórios da performance sexual: LPM (A); LPI (B); MI (C); NI (D); LPE (E).....66

Figura 11 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 17) ou Salina (1 ml/kg; n= 14) sobre parâmetros pós-ejaculatórios da performance sexual: LPMP (A); LPIP (B); MIP (C); NIP (D); NE (E).....67

Figura 12 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 17) ou Salina (1 ml/kg; n= 14) sobre parâmetros calculados da performance sexual: TM (A); TMT (B); Frequência de montas/minuto (C); Frequência de intromissões/minuto (D); Intervalo Inter- intromissões (E); Eficácia Copulatória (F) e IAS (G).....68

Figura 13 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros pré-ejaculatórios da performance sexual: LPM (A); LPI (B); MI (C); NI (D); LPE (E).....69

Figura 14 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros pós-ejaculatórios da performance sexual: LPMP (A); LPIP (B); MIP (C); NIP (D); NE (E).....70

Figura 15 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros calculados da performance sexual: TM (A); TMT (B); Frequência de montas/minuto (C); Frequência de intromissões/minuto (D); Intervalo Inter- intromissões (E); Eficácia Copulatória (F) e IAS (G).....71

Figura 16: Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando o Córtex Piriforme (A-B), BST (D-E), MnPOd (G-H) e MnPOv (J-K) em ratos machos tratados de forma aguda com salina (1 ml/kg; A, D, G e J) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E, H e K). Observa-se a distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.....72

Figura 17: Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando a MPOA (A-B), PVN (D-E) e SON (G-H) em ratos machos tratados de forma aguda com salina (1 ml/kg; A, D e G) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E e H). Observa-se a distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.....73

Figura 18 : Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando o Córtex Piriforme (A-B), BST (D-E), MnPOd (G-H) e MnPOv (J-K) em ratos machos tratados de forma crônica com salina (1 ml/kg; A, D, G e J) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E, H e K). Observa-se distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.....75

Figura 19 : Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando a MPOA (A-B), PVN (D-E) e SON (G-H) em ratos machos tratados de forma crônica com salina (1 ml/kg; A, D e G) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E e H). Observa-se distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVP	vasopressina
ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
BST	lâmina da estria terminal
cm	centímetros
COX-2	cicloxygenase 2
CRH	hormônio liberador de corticotropina
DAB	diaminobenzidina
DEXA	dexametasona
EC	eficiência copulatória
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
GABA	ácido γ -aminobutírico
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
°C	grau Celsius
h	horas
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HHG	hipotálamo-hipófise-gônadas
IAS	índice de atividade sexual
i.c.v.	intra-cérebro-ventricular
i.p.	intraperitoneal
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 2
kg	quilogramas
l	litros
LH	hormônio luteinizante
LHRH	hormônio liberador de hormônio luteinizante

LPM	latência para primeira monta
LPI	latência para primeira intromissão
LPE	latência para primeira ejaculação
LPIP	latência para primeira intromissão pós- ejaculação
LPMP	latência para primeira monta pós- ejaculação
M	molar
MEA	núcleo medial da amígdala
MEApd	núcleo medial da amígdala
MI	montas incompletas
MIP	montas incompletas pós- ejaculação
µg	microgramas
mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
MnPOd	núcleo pré-óptico mediano dorsal
MnPOv	núcleo pré-óptico mediano ventral
MPO	núcleo pré-óptico medial
MPOA	área pré-óptica medial
NAc	núcleo accumbens
NE	número de ejaculações
NO	óxido nítrico
NI	número de intromissões
NIP	número de intromissões pós- ejaculação
OT	ocitocina
PBS	tampão fosfato
Pir	córtex piriforme
PMv	núcleo pré-mamilar ventral
PVN	núcleo paraventricular

RNAm	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SF	soro fisiológico
SNC	sistema nervoso central
SON	núcleo supraóptico
TBE	tribromoetanol
TM	número total de montas até a primeira ejaculação
TMT	número total de montas no tempo total de observação
U	unidades
ZI	zonas de incentivo
ZIF	zona de incentivo do macho
ZIM	zona de incentivo da fêmea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Comportamento Sexual	26
1.2 Neuroquímica do Comportamento Sexual	31
1.3 Glicocorticóides	33
1.4 “ <i>Cross-talk</i> ” Funcional entre os Eixos Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HHG)	37
1.5 Estresse, Glicocorticóides e Comportamento Sexual	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Animais	42
3.2 Ovariectomia	42
3.3 Drogas utilizadas	43
3.4 Procedimentos Experimentais	44
3.4.1 Avaliação da Atividade Geral	45
3.4.1.2 Campo aberto	45
3.4.2 Avaliação da Motivação Sexual	46
3.4.3 Avaliação da Performance Sexual	48
3.4.4 Avaliações neuroquímicas (c-Fos)	51
3.4.4.1 Perfusão para Imunohistoquímica	51
3.4.5 Dosagem de corticosterona	53
3.4.6 Análise estatística	53
4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	54
4.1 Experimento 1 Efeitos da administração aguda de dexametasona no campo aberto	54

4.2 Experimento 2 Efeitos da administração crônica de dexametasona no campo aberto	54
4.3 Experimento 3 Efeitos da administração aguda dexametasona na motivação sexual de ratos machos	55
4.4 Experimento 4 Efeitos da administração crônica de dexametasona na motivação sexual de ratos machos	56
4.5 Experimento 5 Efeito da administração aguda e crônica de dexametasona na concentração plásmática de corticosterona	57
4.6 Experimento 6 Efeitos da administração aguda de dexametasona na performance sexual de ratos machos	58
4.7 Experimento 7 Efeitos da administração crônica dexametasona na performance sexual de ratos machos	58
4.8 Experimento 8 Efeitos da administração aguda dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos	59
4.9 Experimento 9 Efeitos da administração crônica dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos	60
5 RESULTADOS	60
5.1 Efeitos da administração aguda de dexametasona no campo aberto	60
5.2 Efeitos da administração crônica de dexametasona no campo aberto	61
5.3 Efeitos da administração aguda dexametasona na motivação sexual de ratos machos	61
5.4 Efeitos da administração crônica dexametasona na motivação sexual de ratos machos	63
5.5 Efeito da administração aguda de dexametasona na concentração plásmática de corticosterona	64
5.6 Efeito da administração crônica de dexametasona na concentração plásmática de corticosterona	65
5.7 Efeitos da administração aguda de dexametasona na performance sexual de ratos machos	65

5.8 Efeitos da administração crônica dexametasona na performance sexual de ratos machos	68
5.9 Efeitos da administração aguda dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos	71
5.10 Efeitos da administração crônica dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos	74
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

A dexametasona é um análogo sintético dos hormônios esteróides produzidos pela adrenal, com atividade glicocorticóide, enquadrada no grupo dos corticóides (SCHIMMER e PARKER, 2006). Derivada da hidrocortizona, faz parte do grupo dos chamados compostos esteróides metilados, com maior potência anti-inflamatória e menor retenção de sódio que seus antecessores (BOLAND, 1958; WALTON, 1959; HART, 1960).

Foi sintetizada pelo laboratório norte-americano Merck, Sharp & Dohme, chamada primeiramente pelo nome genérico de hexadecadrol, mais tarde batizada como dexametasona e liberada para ensaios clínicos em 1958, lançada no mercado sob o nome de Decadron®. Desde esta época até a atualidade, possui indicações clássicas, como o tratamento da artrite reumatóide, asma, pênfigo, colite ulcerativa, dentre outras moléstias inflamatórias. Mesmo com potente capacidade de suprimir a função adrenocortical, não é primeira escolha para estados de deficiência da supra-renal como a doença de Addison e para reposição exógena após adrenalectomia, sendo para estes casos indicados os fármacos dos quais se originou. Quanto aos efeitos colaterais, estes são similares aos demais corticosteróides sendo marcante o edema e ganho de peso, hiperglicemia, bem como os sintomas decorrentes da supressão adrenal (BOLAND, 1958; WALTON, 1959; HART, 1960; CATANZARO e GORZALKA, 1980).

A literatura sugere que os glicocorticóides desempenham importante papel na função cardiovascular normal (GRUNFLED, 1990; YANG e ZANG, 2004). Como ações periféricas dos glicocorticóides, temos que eles aumentam às respostas vasoconstritoras das catecolaminas, angiotensina II, vasopressina e endotelina, além de reduzir a síntese de importantes vasodilatadores em células endoteliais, como o Óxido Nítrico (NO) e a prostaciclina (YANG e ZANG, 2004).

Foi demonstrado que os glicocorticóides alteram a atividade de neurônios em áreas cerebrais envolvidas com a modulação da atividade simpática, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (SAPHIER e FELDMAN, 1990).

Como está claro, os glicocorticóides endógenos e os sintéticos, como a dexametasona, possuem ações sistêmicas variáveis de acordo com a dose e tempo

de tratamento, bem como diversos efeitos adversos. Por ser capaz de gerar efeitos de substituição de substâncias constitucionais, a dexametasona representa matriz metodológica interessante para avaliar os efeitos sistêmicos dos glicocorticóides.

Várias metodologias, principalmente as avaliações comportamentais em animais de laboratório são utilizadas para avaliação do efeitos de fármacos em fases iniciais de ensaios clínicos, antes da liberação para testes em seres humanos. Com o desenvolvimento tecnológico e surgimento de novas metodologias, torna-se convidativo avaliar drogas tradicionais no mercado, como a dexametasona (RUGINSK et al., 2009; RUGINSK et al., 2010; VILELA e PAIVA, 2011). Dentre os modelos experimentais, temos possibilidade de avaliar vários aspectos comportamentais estereotipados para vários seguimentos de estudo, dentre eles o comportamento materno, agressivo e sexual (CATANZARO e GORZALKA, 1980; VILELA e PAIVA, 2001).

Cada modelo tem sua particularidade e mostra parcialmente aspectos relevantes, portanto, sendo necessário uma diversificação na escolha da metodologia, bem como associação entre elas para que se possa avaliar os efeitos dos fármacos de maneira global. Neste sentido temos o comportamento sexual como um método promissor para esta finalidade, uma vez que se trata de um modelo complexo capaz de avaliar diversos parâmetros regulatórios simultaneamente. Ou seja, como o comportamento sexual dos ratos machos é ativado por estímulos emitidos pela fêmea é adaptado para estudos da relação entre a ação dos hormônios esteróides no nível celular e suas consequências comportamentais; coordenação sensoriomotora; elaboração e interpretação da informação sensorial, etc. Por esse motivo, este modelo tem sido utilizado como modelo para avaliação da ação de drogas (AGMO, 1997).

1.1 Comportamento Sexual

O comportamento sexual nos animais, incluindo a corte, é caracterizado por uma enorme diversidade de eventos, que visam garantir que o acasalamento irá ocorrer com um parceiro ideal, no tempo e lugar apropriados, a fim de transmitir os

caracteres hereditários para as próximas gerações. Este comportamento é uma expressão da fisiologia reprodutiva que se desenvolve a partir de complexas interações neuroendócrinas (MEISEL e SACHS, 1994; AGMO, 1997; HULL et al, 2002; HULL et al, 2006).

No início do comportamento copulatório em mamíferos, a fêmea receptiva normalmente permanece imobilizada enquanto o macho se aproxima de sua região traseira, abraça seus flancos com suas patas dianteiras, e inicia uma série de movimentos superficiais da pélvis (*thrusting*) (**Figura 1-A**), caracterizando a chamada monta. O pênis está parcialmente ereto durante esses movimentos. A fêmea assume uma rígida postura de lordose, com suas costas planas ou côncavas e sua cauda desviada para um lado, expondo sua vagina. Em alguns casos, mesmo a fêmea receptiva pode rejeitar o macho, principalmente se suas abordagens não são adequadas. Sua postura de rejeição pode incluir a fuga, caracterizada pela manutenção de sua cauda e parte traseira abaixados, chutando a cara do macho com as patas traseiras ou virando-se para ameaçar ou atacar o infausto macho (HULL et al, 2006).

A intromissão é o evento que define a cópula (**Figura 1B**). Montado sobre a fêmea, o macho irá realizar movimentos profundos de penetração vaginal, seguidos da desmonta rápida, quando normalmente realiza a limpeza de sua genitália. O número de intromissões que precedem a ejaculação é um importante fator de promoção da fertilidade, uma vez que o aumento do número de intromissões que precede a ejaculação pode aumentar a quantidade de esperma e facilitar o seu transporte para a fêmea (ADLER, 1986; HULL et al, 2006).

A maioria dos mamíferos machos somente ejacula após a estimulação de várias intromissões. A ejaculação é caracterizada por uma penetração profunda, longa, seguida de uma desmonta lenta e relaxada (**Figura 1C**). Contrações espasmódicas da musculatura esquelética pélvica acompanham a ejaculação. Nos homens, tais contrações musculares estão associadas com o orgasmo, a correlação subjetiva do pico de excitação sexual (HULL et al, 2006).

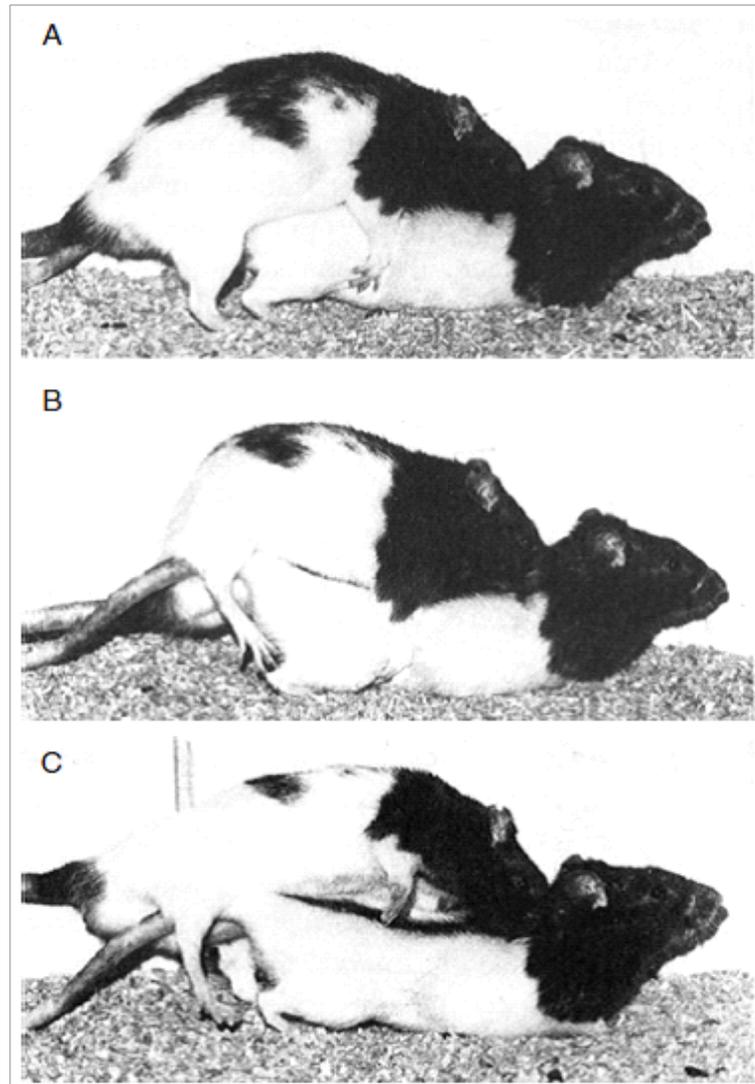


Figura 1-Três fotos da cópula de ratos. **A:** Início da Montagem; **B:** Intromissão ejaculatória e **C:** Desmontagem após ejaculação .

Fonte: HULL et al (2006)

Após a ejaculação, os machos costumam realizar novamente a limpeza genital e entrar em um período de latência. Este intervalo pós-ejaculatório pode ser curto, como 30 segundos em algumas espécies, enquanto em outros podem durar horas ou dias. Nos ratos, este intervalo pode variar de 5 a 10 minutos. Os primeiros 50% a 75% deste intervalo são considerados o período refratário absoluto, quando o macho não irá copular de novo, mesmo se estimulado (HULL et al, 2006).

A experiência sexual prévia aumenta a eficiência sexual. Machos experientes copulam com menor latência para monta, intromissão e ejaculação e com menos montas e intromissões precedendo a ejaculação (HULL et al, 2006). Ratos sexualmente experientes que ejaculam apresentam marcação positiva para Fos mais expressiva na área pré-óptica medial (MPOA) (LUMLEY e HULL, 1999) e no núcleo accumbens (NAc) quando comparado aos ratos inexperientes (LOPEZ e ETTENBERG, 2002). O comportamento sexual é mais intenso durante a fase de escuro, apesar de ratos sexualmente experientes serem capazes de copular durante a fase de claro, desde que o ambiente esteja pouco iluminado (AGMO, 1997).

Estudos sobre o comportamento sexual dos ratos machos distinguem a motivação sexual (“libido”) da execução da cópula (“performance”, “potência”) (AGMO, 1997). Esta distinção é similar à distinção clássica entre comportamentos apetitivos e consumatórios. Comportamentos apetitivos são as atividades que trazem ao organismo o contato com certos estímulos, os quais poderiam trazer à tona comportamentos consumatórios esteriotipados. Comportamentos apetitivos são comportamentos que refletem um subjacente estado motivacional (HULL et al, 2006).

O processo pelo qual um animal procura contato sexual com outro, geralmente, é agrupado no termo motivação sexual (AGMO, 1999). Fazendo parte dos eventos computados durante a análise da performance sexual, está a latência para primeira monta ou intromissão, que são parâmetros de motivação sexual. É sabido que drogas ou lesões podem prejudicar o processo sensorial, a performance do padrão motor, ou a habilidade de alcançar uma ereção, tudo isso pode atrasar o início da cópula sem afetar a motivação sexual. Várias formas de medir esta motivação não atingem diretamente o comportamento copulatório (HULL et al, 2006).

A motivação sexual é ativada por estímulos externos e não por eventos endógenos. Esses estímulos iniciam alguns processos dentro do Sistema Nervoso Central (SNC) que são traduzidos em comportamentos passíveis de serem observados, ou seja, atividade da musculatura esquelética. Sabe-se que esta resposta pode ou não estar associada com alterações no Sistema Nervoso Autônomo (AGMO, 1999; 2007).

Os estímulos ambientais podem ser divididos em três classes: os neutros, são a grande maioria e como o próprio nome diz, não produzem efeitos sobre o comportamento do organismo; os de aproximação, que são incentivos positivos e incluem exemplos como a comida e a interação coespecífica; e por fim, os estímulos que produzem retirada, incentivos negativos, como calor excessivo, cheiro de putrefação e estímulos dolorosos. Os estímulos sexuais fazem parte da classe de estímulos ambientais de aproximação, e diante de condições adequadas, as interações sexuais podem ser iniciadas (AGMO, 2007 apud BRINDA, 1974¹).

Além das respostas comportamentais de aproximação ou retirada, os estímulos de incentivo podem ativar respostas viscerais mediadas pelo Sistema Nervoso Autônomo ou Endócrino, como exemplo a resposta autônoma de ereção diante de incentivos sexuais apropriados (AGMO, 1999; 2007). Assim, apesar dos incentivos produzirem atividade organizada da musculatura esquelética, podem ou não produzir diversos tipos de respostas de ordem visceral (AGMO, 1999; 2007).

Uma característica importante da análise da motivação sexual é que não há associação obrigatória entre um incentivo em particular e um padrão motor em para aproximar-se do incentivo. O sujeito escolhe o padrão motor mais provável para levar ao sucesso de acordo com a situação específica e sua experiência anterior com situações semelhantes (AGMO, 2007).

É necessário ressaltar que o comportamento sexual é um comportamento importante para preservação da espécie, não sendo necessário para sobrevivência do indivíduo, portanto, difere consideravelmente de outros comportamentos espontâneos, como comer, beber, evitar a dor, respirar ou controlar a temperatura corporal. Esta diferença torna esse tipo de modelo experimental adequado e vantajoso em relação aos outros comportamentos motivados, uma vez que a motivação não é desencadeada pela privação das necessidades fisiológicas e, portanto, não geram desconforto ou danos conhecidos ao animal (AGMO, 1997; 2003). A motivação para comer ou beber pode ser expressa como a quantidade de privação (como exemplo, pelo número de horas da última refeição ou bebida), ao passo que isso não é possível em relação à motivação sexual uma vez que a ausência de atividade sexual não produz acumulação de qualquer necessidade

¹ BRINDA, D. A motivacional view of learning, performance, and behavior modification. *Psychol. Rev.*, v. 81, p. 199-213, 1974.

corporal como a privação de alimentos ou água faz (AGMO, 1999).

O acasalamento requer a participação ativa de dois indivíduos, entretanto estudos deste comportamento tradicionalmente são delineados pela perspectiva de um dos sexos. Por isso, é importante estar consciente de que nem os estudos centrados nos machos ou nas fêmeas fornecem uma descrição completa da complexa interação reprodutiva (HULL et al, 2006).

1.2 Neuroquímica do Comportamento Sexual

Em estudos sobre o comportamento copulatório de ratos machos foram observadas elevação de expressão de proteína Fos em áreas encefálicas como exemplo, a área pré-ótica medial (MPOA), lâmina da estria terminal (BST), núcleo medial da amígdala (MEA) e campo tegumentar central (BIALY e KACZMAREK, 1996).

Substâncias químicas olfativas de relevância social coespecífica, chamadas de feromônios ativam o bulbo olfatório (OB) que possui aferências para o núcleo medial da amígdala (MEA). Este núcleo faz parte do sistema vômero-nasal do qual também fazem parte o órgão vômero-nasal, o bulbo olfatório acessório, a lâmina da estria terminal (BST) e alguns núcleos hipotalâmicos, como o núcleo pré-ótico medial (MPO) e o núcleo ventro-medial do hipotálamo (VMH). Este sistema é responsável pela detecção, processamento e desencadeamento de respostas aos feromônios (HALPERN e MARTINEZ-MARCOS, 2003). Além do MEA, o núcleo pré-mamilar ventral (PMV) também possui relações neuroquímicas com os núcleos hipotalâmicos associados ao sistema vômero-nasal (CANTERAS, SIMERLY, SWANSON, 1992). A expressão da proteína Fos está aumentada no PMV de ratos machos após exposição ao odor de fêmeas adultas, ou seja, esses neurônios são ativados por feromônios das fêmeas (CAVALCANTE, BITTENCOURT e ELIAS, 2006).

Estudos revisados por Agmo (2003), concluem que somente a MPOA é essencial para o comportamento sexual do macho. Outras áreas cerebrais, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), somente modulam o comportamento.

Implantes de hormônios gonadais na MPOA são capazes de ativar o comportamento sexual dos ratos machos, ao passo que lesões desse núcleo eliminam este comportamento e diminuem muito a busca por fêmeas receptivas, mostrando a sua importância tanto na performance como na motivação sexual (AGMO, 1999; DOMINGUEZ et al., 2001; DOMINGUEZ e HULL, 2001, 2003; AGMO, 2003). Além disso, Mas e colaboradores (1995) mostraram que durante a fase de exaustão ou saciedade sexual, período no qual o macho que foi exposto a uma única fêmea receptiva e permitido acasalar *ad libitum*, não exhibe tentativas de cópula (RODRIGUEZ-MANZO, e FERNANDEZ-GUASTI, 1994), observa-se aumento dos metabólitos da dopamina no MPOA (MAS et al, 1995)

O PVN representa um centro de integração entre as repostas centrais e periféricas do Sistema Nervoso Autônomo (ARGIOLAS e MELIS, 2005). Entre os compostos originados no PVN está a ocitocina (OT), um neuropeptídeo sintetizado também no núcleo supraóptico do hipotálamo (SON) e liberado pela hipófise posterior tanto na circulação sistêmica, como dentro do SNC. O nível sérico da ocitocina aumenta após cópula em ratos inexperientes, mas não nos sexualmente experientes, sendo neste primeiro caso correlacionado com a intensidade da cópula. O efeito facilitatório da ocitocina endógena na cópula é sustentado pelos efeitos inibitórios do antagonista de ocitocina administrado intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) (ARGIOLAS, 1999; HULL et al, 2006). Este peptídeo pode aumentar a secreção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) sob certas condições, como estresse (GILLIES e LOWRY, 1979; MCCANN et al, 2000). É interessante ressaltar que estudos em animais mostram que a secreção de ocitocina durante a cópula resulta em redução do comportamento ansioso mesmo após 40 minutos do acasalamento (FERGUSON et al, 2001).

Hillegaart e colaboradores (1998) demonstraram que durante o desafio emocional e situações que demandam ação, criadas pelo encontro com uma fêmea sexualmente receptiva, são acompanhadas por um aumento na concentração plasmática de ocitocina no rato sexualmente inexperiente. Além disso, foi observado aumento nos níveis séricos de glicose e prolactina nos ratos machos, independentemente da experiência sexual (HILLEGAART et al, 1998).

Como citado anteriormente, de maneira sucinta, o odor de machos e fêmeas, através dos feromônios é capaz de estimular a expressão de proteína Fos em

populações neuronais delimitadas, como no MEA e no PMV. Em ratos machos sexualmente inexperientes foi observado maior imunorreatividade a Fos na subdivisão posterodorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd) e no PMV após a exposição ao odor feminino (DONATO et al, 2009).

Estudos clássicos, como o de Purvis e Haynes (1978), mostram que o odor da urina de fêmeas é capaz promover a elevação de testosterona em machos, independente da experiência sexual (PURVIS e HAYNES, 1978).

Em relação ao controle hormonal deste comportamento, estudos mostram claramente que hormônios esteróides, andrógenos e estrógenos modificam a excitabilidade neuronal no SNC. Esses hormônios são necessários não só para a motivação sexual, mas também para a exibição normal da performance. Entretanto, ainda não foi descrito o exato mecanismo como esses hormônios ativam este comportamento. O papel dos hormônios não-esteróides na modulação do comportamento sexual é parcialmente conhecido, bem como as consequências das manipulações dos sistemas de neurotransmissores (AGMO, 1997; 1999).

Estudos recentes, como o de Alvarenga, Andersen e Tufik (2010), confirmam a participação da testosterona no comportamento sexual de ratos machos e ainda associam a progesterona como um fator limitante para a performance sexual, uma vez que o nível sérico deste hormônio encontra-se relativamente baixo em animais com pouca atividade sexual quando comparado aos mais experientes (ALVARENGA; ANDERSEN e TUFIK et al, 2010).

1.3 Glicocorticóides

Os glicocorticóides, cortisol (humanos e primatas) e corticosterona (roedores), são sintetizados a partir do colesterol na zona fasciculada no córtex das adrenais (JACOBSON, 2005). A produção dos glicocorticóides circulantes é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que é ativado por estresse físico ou psicológico, bem como por citocinas inflamatórias, interleucinas e fatores de crescimento, resultantes do processo inflamatório (MARQUES-DEAK, MARQUES-DEAK, CIZZA e STERNBERG, 2005). Os neurônios parvocelulares do PVN

representam o ramo neuroendócrino do eixo HHA, representando a via final pela qual o cérebro recruta os corticotrofos da hipófise anterior para produção e liberação do ACTH, que por sua vez estimula a síntese e liberação dos esteróides adrenais (NESTLER, et al, 2002; VIAU, 2002). Temos o CRH (hormônio liberador de corticotrofina) como principal regulador fisiológico do ACTH, e o nível sérico deste é tido como o principal regulador da secreção de glicocorticóide pelo córtex da adrenal (DeBOLD, et al, 1984; RIVIER e PLOTSKY, 1986; HINSON, 1990). Além disso, outros hormônios, fatores ou citocinas, assim como o Sistema Nervoso Autônomo através da sua inervação do córtex da adrenal podem contribuir com a secreção de glicocorticóides (HINSON, 1990).

A atividade do eixo HHA é controlada por diversos circuitos cerebrais, incluindo o hipocampo, o qual exerce uma influencia inibitória sobre os neurônios contendo CRH e a amígdala, responsável por uma influência direta excitatória (NESTLER, et al, 2002).

Por retroalimentação negativa, os glicocorticóides exercem controle inibitório sobre a atividade circadiana e ativação do eixo HHA (DALLMAN et al, 1987).

O resumo do funcionamento geral do eixo HHA está esquematizado na figura a seguir (**Figura 2**):

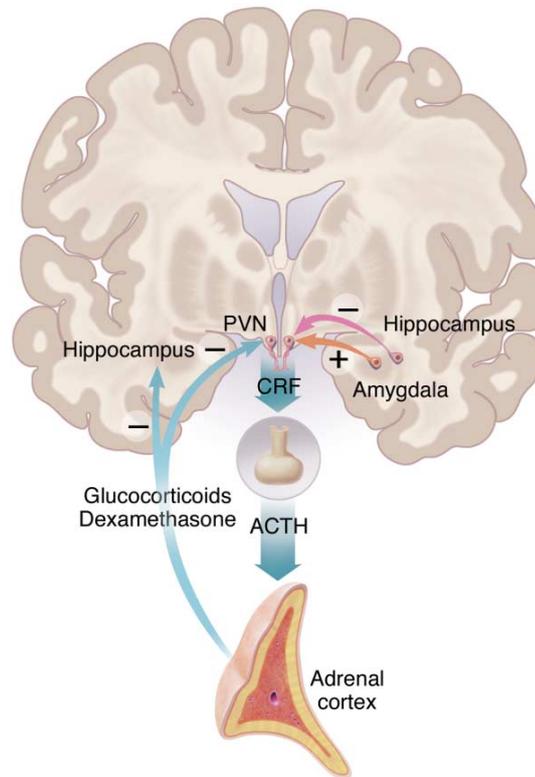


Figura 2. Desenho esquemático representando a regulação do eixo HHA. Neurônios parvocelulares do PVN contendo CRH integram as informações relevantes ao estresse. A figura mostra a chegada de aferências ao PVN, tanto excitatórias, originadas da amígdala, quanto inibitórias, a partir do hipocampo. O CRH é liberado no sistema portal hipofisário e age sobre corticotrofos da adeno-hipófise para liberar ACTH. Este hormônio atinge o córtex supra-renal através da corrente sanguínea, onde estimula a liberação de glicocorticóides. Além de suas várias funções, os glicocorticóides (incluindo formas sintéticas, como a dexametasona) suprimem a síntese e liberação de CRF e ACTH. Desta maneira, os glicocorticóides inibir a sua própria síntese.
Fonte: NESTLER *et al* (2002).

Os corticosteróides são secretados em pulsos de hora em hora que têm amplitude mais expressiva durante o período de atividade do animal, resultando em um padrão circadiano global de secreção (YOUNG, ABELSON e LIGHTMAN, 2004).

Além de exercer profundos efeitos sobre o metabolismo, os glicocorticóides afetam o comportamento através de sua ação direta em várias áreas cerebrais (NESTLER *et al*, 2002). Eles atingem o cérebro e tão logo se ligam a dois tipos de

receptores: receptor mineralocorticóide ou tipo I, que apresenta a mesma afinidade pelo glico e mineralocorticóide; e receptor glicocorticóide ou tipo II, o qual apresenta baixa afinidade mineralocorticóide (REUL e De KLOET, 1985; De KLOET, OITZL e JOELS, 1993).

De maneira geral temos que os glicocorticóides agem sobre seus receptores localizados no hipotálamo, mais especificamente no PVN e na adeno-hipófise suprimindo a liberação de vasopressina e CRH, através de mecanismos ainda não totalmente elucidados (MCCANN et al, 2000; YOUNG, ABELSON e LIGHTMAN, 2004).

Demonstrou-se que a ativação do eixo HHA e a consequente secreção de glicocorticóide (corticosterona) pode reduzir a secreção de prolactina, ocitocina e vasopressina estimulada pela expansão de volume isotônica e hipertônica em ratos (DURLO et al., 2004, RUGINSK et al., 2007; LAUAND et al., 2007). Além disso, os glicocorticóides diminuem a expressão hipotalâmica de Fos em resposta a essa expansão de volume, bem como pela estimulação osmótica, colinérgica e angiotensinérgica centrais em ratos machos (RUGINSK et al., 2007; LAUAND et al., 2007). Isto indica que o estresse, e a consequente ativação do eixo HHA, pode interferir com a secreção de outros hormônios neuro-hipofisários.

Os neurônios parvocelulares mediais produtores de CRH também expressam vasopressina (AVP), que é um secretagogo fraco, mas potencializa os efeitos do CRH sobre a secreção do ACTH em condições normais (ANTONI, 1993). Sob condições de estresse crônico ou através da remoção da retroalimentação negativa dos glicocorticóides após adrenalectomia, temos um aumento da síntese de AVP por estes neurônios parvocelulares. Conseqüentemente, ocorre a potencialização dos efeitos sobre a secreção do ACTH, o que pode caracterizar o AVP como mediador da secreção sustentada deste hormônio em situações de estresse agudo e crônico (VIAU, 2002).

A ação dos glicocorticóides nos neurônios magnocelulares parece ser predominantemente inibitória. Pesquisadores propuseram que os glicocorticóides agem através de proteína transmembrana ligada a proteína G, que estimulam a secreção de endocanabinóides no hipotálamo (DI et al, 2003; DI et al, 2005; EVANSON et al, 2010).

A dexametasona, como um glicocorticóide, através de *feedback* negativo é

capaz de diminuir os níveis circulantes do ACTH (CATANZARO e GORZALKA, 1980; FOOTE, 1999). Além disso, é especialmente potente ao diminuir a imunorreatividade ao CRH e à vasopressina nas células do PVN após adrenalectomia (SAWCHENKO, 1987).

Dados recentemente publicados de nosso laboratório mostram que a dexametasona reduz o comportamento materno, bem como o comportamento agressivo da mãe, interrompe o aleitamento induzido pela ocitocina e prolactina e reduz a ejeção de leite em ratas lactantes (VILELA e GIUSTI-PAIVA, 2011).

1.4 “*Cross-talk*” Funcional entre os Eixos Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HHG)

A interrelação entre os eixos HHA e HHG é, em grande parte, devido aos efeitos interativos entre os esteróides sexuais e os glicocorticóides. Geralmente, os estudos sobre as interações entre os produtos finais desses eixos são focados na perspectiva dos mecanismos de como o estresse é capaz de comprometer o comportamento reprodutivo (VIAU, 2002).

Essa interrelação entre estes eixos não ocorre de forma unidirecional e as variações na intensidade da atividade HHA estresse-dependente em machos e fêmeas são justificáveis como uma função dos esteróides sexuais, como exemplo, a natureza inibitória com que a testosterona regula a função do eixo HHA relacionada ao estresse. Entretanto, como esses hormônios sexuais atuam no sistema nervoso central para regular o eixo HHA continua não desvendado (KERR e KERR, 2001; VIAU, 2002). Como parte do controle da homeostase, vários mecanismos incluindo mudanças comportamentais, endócrinas e viscerais são ativadas durante condições de estresse (AGUILERA, 1994).

Os hormônios relacionados ao estresse podem afetar a função sexual nos três níveis do eixo HHG: no hipotálamo, ao inibir a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); na hipófise, com a consequente interferência na liberação de LH, que é dependente do GnRH; e por fim, nas gônadas ao alterar o efeito estimulatório das gonadotrofinas sobre a liberação de esteróides sexuais

(RIVIER e RIVEST, 1991; TILBROOK, TURNER e CLARKE, 2000). É interessante ressaltar que estudos mostram que os componentes do eixo gonadal que sofrem influencia do estresse e dos glicocorticóides, exercem efeitos recíprocos sobre o eixo HHA, como exemplo temos o aumento sérico de glicocorticóides após administração central de hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) em ovelhas (PORTER, LINCOLN e NAYLOR, 1990; VIAU, 2002).

As interações recíprocas são mais aparentes entre os produtos esteróides finais do dois eixos. Em situações de estresse e de altas doses de glicocorticóides, tanto em humanos, ratos, como em outros mamíferos, geralmente podem ser observadas falhas sobre todo eixo HHG, incluindo o comportamento reprodutivo, expressão de LHRH, secreção plasmática de hormônio luteinizante (LH) e síntese seguida de liberação dos esteróides sexuais (RIVIER e RIVEST, 1991; TILBROOK, TURNER e CLARKE, 2000; VIAU, 2002). De maneira recíproca, os produtos finais do eixo HHG (estrogênios e androgênios), os quais formam a base para as diferenças sexuais e individuais no funcionamento do eixo HHA, atuam em vários níveis desse eixo, incluindo a síntese de corticóides adrenais, secreção de ACTH e glicocorticóides induzida por estresse e síntese de AVP e CRH no PVN (GOMEZ , HOUSHYAR e DALLMAN, 2002; VIAU, 2002).

1.5 Estresse, Glicocorticóides e Comportamento Sexual

O estresse pode ser definido como qualquer estímulo que cause algum distúrbio na homeostase do organismo. Desta forma, o estresse pode ser físico, como excesso de calor ou frio, trauma, cirurgia ou infecções; ou ainda pode ser de origem emocional, psicológico. Ele é capaz de afetar qualquer sistema do corpo, mas os principais mediadores da resposta ao estresse são o Sistema Nervoso Simpático e o eixo HHA, com o conseqüente aumento do nível sérico de glicocorticóides (MCCANN et al, 2000). Sendo assim, temos o aumento dos glicocorticóides como um dos principais parâmetros alterados durante o estresse em ratos (DALLMAN et al., 1992).

Os glicocorticóides são capazes de promover a sobrevivência do indivíduo sob condições estressantes através da modulação de funções essenciais como o metabolismo, imunidade e função cardiovascular. Simultaneamente esses hormônios suprimem as funções ditas não essenciais, como os comportamentos sexual e parental, assim como a fisiologia reprodutiva (WINGFIELD e SAPOLSKY, 2003). Diante disso, diversos autores sugerem que o eixo HHA é hipoativado em resposta ao estresse durante períodos de alto investimento na reprodução para proteger o indivíduo contra falhas nos esforços reprodutivos induzidas pelo estresse (WINGFIELD e SAPOLSKY, 2003; BÓKONY, LENDVAI, e LIKER, 2009).

Marquez e colaboradores (1996) concluíram com seus experimentos que diferentes estressores podem modificar o comportamento sexual de ratos machos, e estas mudanças são diferentemente afetadas pela natureza e duração do estressor (MARQUEZ, SALAZAR e VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, 1996).

Renata-Marques, Bonilla-Jaime e Velazquez-Montezuma (1998) visando correlacionar a elevação dos níveis de corticoesteróides com os efeitos comportamentais do estresse, submeteram ratos machos a doses agudas e crônicas deste hormônio, na expectativa de reproduzir os efeitos do estresse no comportamento sexual destes animais. Observaram que o aumento do nível sérico de corticosterona não alterou a dosagem de testosterona e que nenhum parâmetro do comportamento sexual foi alterado, mostrando que os efeitos do estresse sobre o comportamento sexual não poderiam ser explicados somente pelo aumento de glicocorticóides (RENATA-MARQUEZ, BONILLA-JAIME e VELAZQUEZ-MONTEZUMA, 1998).

Em contrapartida, Maeda e Tsukamura (2006) propõem que os glicocorticóides endógenos liberados em condições de estresse teriam um efeito protetor sobre a secreção de gonadotrofinas. Este efeito difere da administração exógena, em que se observa em estudos realizados em fêmeas, a diminuição da secreção de LH após tratamento crônico ou agudo com corticosteróides. Descrevem que o estresse induz a supressão de liberação de GnRH mediada por prostaglandinas no cérebro e sugerem que os glicocorticóides liberados pelo córtex da adrenal, seriam capazes de manter a atividade do eixo HHG durante o estresse, pois bloqueariam a COX-2 cerebral (cicloxigenase 2) e portanto, promoveriam a inibição da síntese de prostaglandinas no SNC (MAEDA e TSUKAMURA, 2006).

Porém, como dito anteriormente, este estudo foi realizado em fêmeas.

Outro estudo, também realizado em fêmeas, analisou os efeitos da dexametasona, corticosterona e ACTH no comportamento sexual de ratas ovariectomizadas comparados à fêmeas que além dos ovários retirados eram submetidas à adrenalectomia. Os pesquisadores concluíram, entre outras coisas, que a elevação do ACTH endógeno é capaz de facilitar a lordose nas fêmeas intactas e que a administração crônica de dexametasona, bloqueia esta elevação e, portanto, suprime fortemente a lordose, sendo estes efeitos mais pronunciados nas fêmeas ovariectomizadas. Os autores sugerem que o papel desempenhado pelo ACTH, ocorre via efeitos dos corticóides da adrenal (CATANZARO e GORZALKA, 1980). Entretanto, não há na literatura trabalho semelhante realizado em ratos machos. E além disso, este trabalho avaliou somente a administração crônica da dexametasona e as outras drogas.

Está claro que existem evidências na literatura de que os glicocorticóides participam da modulação do comportamento sexual. Porém, não há artigos que abrangem em um mesmo estudo, o efeito da administração das drogas, a análise comportamental e o mapeamento das áreas cerebrais ativadas. Estes estudos também não deixam claro quais fatores predominam na modulação neuroendócrina do estresse, bem como se as alterações hormonais do estresse, por si só, são capazes de alterar um comportamento estereotipado. Além disso, o comportamento sexual é um método de estudo em que o animal fica próximo de suas condições naturais, o que torna essa metodologia atraente para o estudo dos eventos neuroendócrinos, bem como a ação de drogas. Daqui partiram os objetivos deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral estudar os efeitos da dexametasona em aspectos do comportamento sexual de ratos machos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a motivação e desempenho sexuais;
- Comparar os resultados da administração aguda e crônica da dexametasona sobre o comportamento sexual dos ratos machos;
- Mapear as áreas cerebrais ativadas por esse comportamento através da expressão da proteína Fos e comparar o número de células imunorreativas a esta proteína em animais que receberam a dexametasona e animais controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, fêmeas, pesando entre 220-300g e machos, pesando entre 350-450g, a partir de 8 semanas de vida. provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL- MG. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, adequadas à sua manutenção, em número máximo de cinco por caixa, tratados com ração comercial e água “*ad libitum*”. Estas caixas foram mantidas em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7:00am. Cada animal foi utilizado em apenas um experimento.

3.2 Ovariectomia

As ratas destinadas a servirem como iscas sexuais foram submetidas à ovariectomia. Sucintamente, elas foram anestesiadas com 1ml/ 100g (250mg/kg) de uma solução de TBE, administrado via i.p.. O animal foi posicionado na mesa cirúrgica em decúbito horizontal ventral. Após a constatação da anestesia, realizou-se a tricotomia e assepsia da pele (com álcool e iodopovidona tópicos). Após, feita uma incisão em flanco direito para exposição do ovário; foi realizada ligadura no ligamento meso-ovariano com fio de algodão preto e retirada a gônada com auxílio de uma tesoura. A seguir, feito a sutura do peritônio, tecido subcutâneo e pele com pontos contínuos. O mesmo procedimento foi repetido para retirada do ovário esquerdo. As ratas ovariectomizadas receberam 1ml de antibiótico profilático, via intramuscular; 0,03 ml de cetoprofeno, via subcutânea e utilizadas somente 21 dias após o procedimento, no mínimo, sendo este o tempo necessário para a eliminação dos hormônios circulantes AGMO (1997). No período pós-operatório imediato, as ratas foram colocadas em caixas individuais e mantidas sob a luz, para aquece-las até a recuperação anestésica, quando foram colocadas em grupo de quatro animais

por caixa (no máximo) e levadas para o biotério do laboratório. No período de 4 a 5 dias após a cirurgia foi oferecido paracetamol, 5 gotas em 200ml, através do bebedouro, ou crônica a dose de cetoprofeno no primeiro dia pós operatório para analgesia das fêmeas.

3.3 Drogas utilizadas

Antimicrobiano (Baytril® injetável 5%- Bayer): usado como profilaxia nas fêmeas submetidas à ovariectomia.

B-Estradiol 3-Benzoato (Sigma): usado para tratamento das fêmeas receptivas, conforme descrito abaixo.

Cetoprofeno (Ketoflex® 1%- Biofarm Ltda- Jaboticabal- SP): usado como antiinflamatório e analgésico nas fêmeas submetidas à ovariectomia.

Dexametasona fosfato dissódico (Decadron®- Aché).

Halotano (Tanohalo®- Cristália- Itapira- SP): usado para eutanasia de animais que foram submetidos a algum dos protocolos experimentais e que não foram selecionados para coleta de sangue ou encéfalo, bem como animais que não apresentaram ejaculação ou apresentaram-se fora de condições para os experimentos, como exemplo, muito acima do peso.

Iodopovidona (Riodeine®- Rioquímica- Ribeirão Preto-SP): usado para a antissepsia da pele das fêmeas submetidas à ovariectomia.

Óleo de Canola (Purilev®- Cargil Agrícola S.A.Marinque-SP): usado como veículo do estrógeno e da progesterona administrados como tratamento para as fêmeas ovariectomizadas, conforme descrito abaixo.

Paracetamol (Medicamento genérico- Neo Química- Anápolis-GO): utilizado como analgésico no pós-operatório das fêmeas ovariectomizadas.

Progesterona (Sigma): usado para tratamento das fêmeas receptivas, conforme descrito abaixo.

Soro Fisiológico 0,9% (Isofarma): usado como veículo para a administração da dexametasona.

Tribromoetanol (TBE- Sigma): usado como anestésico para as fêmeas

submetidas à ovariectomia e para os machos submetidos à perfusão intracardíaca.

A ampola de Dexametasona foi diluída em SF0,9% (veículo), obtendo-se a concentração de 1mg/ml. Os ratos machos deste grupo receberam 1ml/kg desta preparação, por via intraperitoneal (i.p.) 2 horas antes da observação (administração aguda) ou por quatro dias consecutivos (administração crônica). Os animais controle receberam o mesmo volume (1ml/kg) de veículo, por via i.p. 2 horas antes da observação (administração aguda) ou por quatro dias consecutivos (administração crônica).

O Tribromoetanol foi utilizado por via intraperitoneal (i.p.) para anestesiá-las as fêmeas submetidas à ovariectomia bilateral, na dose de 250mg/kg do animal. O antimicrobiano profilático foi administrado ao final do procedimento na dose de 0,2ml/ rato, bem como o Cetoprofeno 1% (antiinflamatório), na dose de 0,03ml/rato. No período pós-operatório utilizou-se paracetamol, 5 gotas em 200ml de água, oferecidas às fêmeas pelo bebedouro, por 4 a 5 dias, sendo trocada diariamente.

O 17- β -estradiol e a progesterona foram diluídos em óleo de canola, na concentração 50 μ g/ml e 2 mg/ml, respectivamente, e administrados, por via SC, nas fêmeas ovariectomizadas destinadas à avaliação do comportamento sexual, em volume de 0,1ml/kg. O estradiol foi administrado 54 horas antes do início da sessão experimental enquanto a progesterona foi administrada 6 horas antes.

3.4 Procedimentos Experimentais

Os animais submetidos a todos os procedimentos experimentais permaneceram em biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7:00am. Os testes experimentais foram realizados entre às 20:00 e 0:00h, ou seja, durante a fase escura do ciclo, em uma sala de observação iluminada por uma lâmpada de cor vermelha de 20 Watts, 2 horas após a administração da droga ou do veículo.

3.4.1 Avaliação da Atividade Geral

Servindo como base para um controle dos possíveis efeitos da dexametasona sobre a atividade geral dos animais, foram realizados testes de campo aberto para avaliação da atividade motora.

3.4.1.2 Campo aberto

Cada animal foi colocado individualmente em uma arena circular de acrílico de 60 cm de diâmetro, com parede transparente de 50 cm de altura e com o piso dividido em 12 áreas, dos quais, as 8 áreas junto às paredes da arena foram consideradas periferia e as 4 demais, as centrais. Cada rato foi colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise. Sua atividade motora foi avaliada quando o animal atravessava uma linha e colocava as 4 patas dentro de uma mesma área. Foram registrados o número total de linhas centrais, linhas periféricas e o total de linhas cruzadas, bem como o efeito anti-tigmotático (razão entre o número de linhas centrais sobre o número total de linhas cruzadas). Foi avaliado também a frequência de levantar (*rearing*).

Os animais do grupo controle foram intercalados aos animais experimentais para cada observação. Após cada teste e antes de colocar um novo animal, o campo aberto foi limpo com álcool 70% a fim de homogeneizar a situação experimental, eliminando possíveis odores deixados pelo animal anterior na arena.

O teste de campo aberto (“open field”) permite a quantificação da atividade motora espontânea. Além disso, a avaliação do efeito anti-tigmotático mostra a diminuição da preferência típica (VALLE, 1970).

3.4.2 Avaliação da Motivação Sexual

Para avaliação da motivação sexual dos ratos machos foram utilizadas fêmeas ovariectomizadas com cio induzido por hormônios (iscas), conforme descrito anteriormente.

Como descrito por Rodrigues-Alves (2007) com base em protocolo experimental de Agmo (2003), foi confeccionada a arena de observação de madeira, com aberturas destinadas aos compartimentos dos animais iscas (ou incentivos). Estes compartimentos, diametralmente opostos, foram adaptados com o uso de gaiolas metabólicas que permitiram apenas contato visual e olfativo entre os animais iscas e teste (AGMO, 2003; RODRIGUES-ALVES, 2007). O piso da arena foi encapado com plástico branco fosco, com exceção das paredes que mantiveram a cor de madeira natural (cor bege) e da grade de metal da gaiola metabólica (cor cinza). No piso em frente a cada compartimento foram delimitada, com linhas pretas, as zonas de incentivo (ZI) com 30 x 20 cm, conforme esquema abaixo (**Figura 3**):

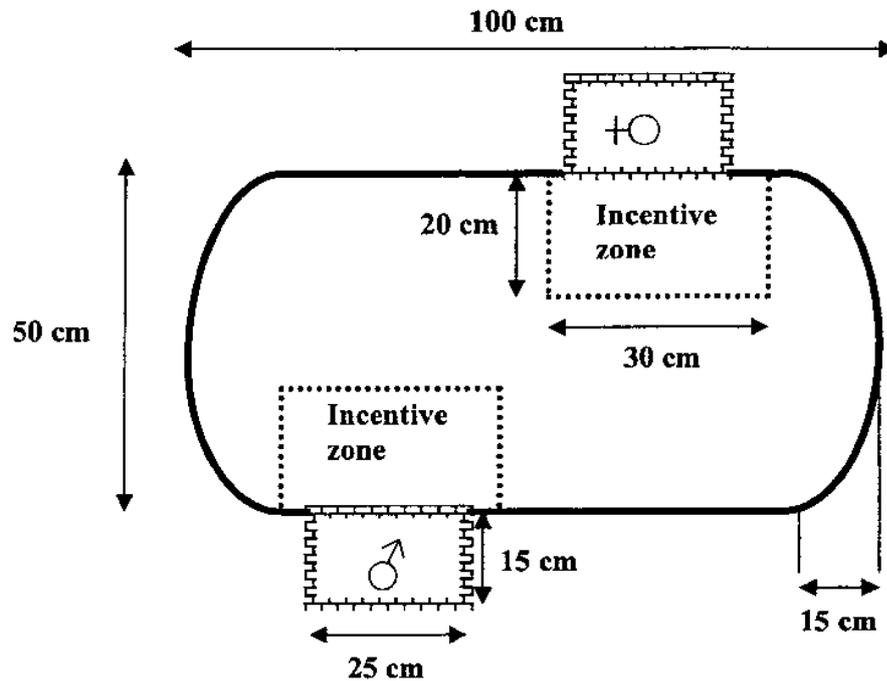


Figura 3- Modelo do aparato utilizado para análise da motivação sexual. As gaiolas matebólicas, contendo os animais iscas eram encaixadas nas laterais do aparato permitindo que esses animais ficassem no mesmo nível do macho teste.
Fonte: AGMO (2003).

Uma semana antes do teste, para familiarizar os ratos sexualmente inexperientes com a arena de observação, eles foram colocados individualmente, sem a presença das iscas, para explorar a área, por cinco minutos em três dias consecutivos (AGMO, 2003).

Para o teste da motivação sexual foram colocadas na arena, as iscas: uma fêmea receptiva (incentivo sexual) e um macho sexualmente experiente (incentivo social). Eles foram colocados nos compartimentos contíguos à arena 20 min antes do início das observações dos animais testes. Cada rato a ser testado foi colocado individualmente no centro da arena e filmado em vídeo por 20 minutos, para posteriormente serem avaliados os seguintes parâmetros: tempo em segundos de permanência nas zonas de incentivo da fêmea (ZIF), e do macho (ZIM); frequência de visitas a cada ZI (número de vezes que o animal entra com as quatro patas na ZIF ou ZIM).

A partir dos dados registrados, foram calculados as médias de duração de

visitas às ZIF ou à ZIM e o escore de preferência, ou seja, a razão entre o tempo de permanência na ZIF e o tempo de permanência nas duas ZI, conforme descrito abaixo:

$$\text{Escore de Preferência} = \frac{\text{tempo de permanência na ZIF}}{\text{tempo de permanência na ZIF} + \text{tempo de permanência na ZIM}}$$

3.4.3 Avaliação da Performance Sexual

O comportamento sexual foi avaliado com base em protocolo experimental descrito por AGMO (1997). Para tanto, foi utilizado um aquário de vidro medindo 30 x 30 x 30 cm, com tampa móvel e piso coberto com uma camada de $\pm 3,0$ cm de maravalha de madeira (caixa de observação).

As fêmeas utilizadas para avaliação do comportamento sexual foram induzidas à receptividade sexual (iscas), através da ovariectomia e posterior injeção de hormônios. A receptividade sexual das ratas foi induzida pela administração de 50 μ g/kg de 17- β -estradiol e 2 mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início da observação do comportamento sexual. Cerca de 20 minutos antes dessa observação, a receptividade das fêmeas era testada colocando-se a fêmea com um macho ativo na caixa de observação, sendo permitidas a realização de algumas montas e observado a presença de postura de lordose nas ratas, o que indica receptividade sexual efetiva. Caso a fêmea não apresentasse este padrão de comportamento, era prontamente substituída. As fêmeas iscas foram utilizadas após intervalo mínimo de 2 semanas.

Para avaliação do comportamento sexual, os animais foram transportados para sala de observação pelo menos 10 minutos antes do experimento, para ambientação. O macho era colocado na caixa de observação e mantido sozinho por 5 minutos. O experimento iniciou-se após esse período através da introdução da fêmea receptiva e início da filmagem com duração de 40 minutos contados a partir

da primeira monta. Os seguintes parâmetros foram analisados:

- a) LPM (latência para a primeira monta): tempo transcorrido até a primeira monta do macho sobre a fêmea a partir da introdução da fêmea na caixa de observação. Foram consideradas a monta com ou sem intromissão vaginal;
- b) LPI (latência para primeira intromissão): tempo decorrido até a primeira monta com intromissão vaginal computado a partir da introdução da fêmea na caixa de observação. A intromissão foi considerada quando, montado sobre a fêmea, o macho realizou movimentos profundos de penetração vaginal (*thrusting*), seguidos da desmonta rápida, quando normalmente realizava a limpeza de sua genitália. Este não monta em seguida;
- c) MI (número de montas incompletas): montas sem intromissão vaginal, até a primeira ejaculação;
- d) NI (número de intromissões): montas com intromissão vaginal até a primeira ejaculação, incluindo a intromissão ejaculatória;
- e) LPE (latência para a primeira ejaculação): tempo decorrido até a primeira ejaculação computado desde a introdução da fêmea na caixa de observação menos a LPI, ou seja, é o intervalo entre a primeira intromissão e a primeira ejaculação. A ejaculação é considerada como uma monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea, levantar e balouçar do tronco pelo macho, seguida do período refratário, ou seja, ausência de interesse sexual do macho nos minutos seguintes (período refratário- duração normal entre 4 a 8 min);
- f) LPMP (latência para primeira monta pós- ejaculação): tempo computado entre a primeira ejaculação até a primeira monta pós-ejaculatória;
- g) LPIP (latência para primeira intromissão pós-ejaculação): representa o período refratário ou latência pós-ejaculatória, que é o tempo decorrido desde a primeira ejaculação até a primeira intromissão pós-ejaculatória;
- h) MIP (número de montas incompletas pós-ejaculação): idêntico a MI desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação;
- i) NIP (número de intromissões pós-ejaculação): idêntico a NI desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação, incluindo as intromissões ejaculatórias.
- j) NE (número total de ejaculações): número de ejaculações realizadas pelo animal no tempo total de observação.

As latências foram registradas com auxílio de cronômetros manuais e expressas em segundos. Somente para o cálculo do índice de atividade sexual (IAS) foram utilizados os tempos expressos em minutos.

Foram calculados, através estes parâmetros, somente para os animais que ejacularam pelo menos uma vez durante o período de observação (40 min) os seguintes índices:

- a) TM (número total de montas até a primeira ejaculação): MI somado a NI;
- b) TMT (número total de montas no tempo total de observação): a soma das montas incompletas e das intromissões em todo o tempo de observação, ou seja:

$$TMT = MI + NI + MIP + NIP$$

- c) Frequência de montas por minuto: a razão entre a TM e o tempo transcorrido entre a primeira monta e a primeira ejaculação;
- d) Frequência de intromissões por minuto: a razão entre NI e LPE;
- e) Intervalo inter-intromissões: é a latência para a primeira ejaculação (LE) dividida pelo número de intromissões até a primeira ejaculação (NI);
- f) Eficiência copulatória (EC em %): o número de intromissões dividido pelo número total de montas até a primeira ejaculação vezes 100, isto é:

$$EC = (NI/TM) \times 100$$

- g) Índice de atividade sexual (IAS): este, conforme proposto por AGMO et al (1987), calculou-se, para todos os animais do experimento, da seguinte forma:

$$IAS = \{ [\text{Log} (1/LPM) \times t] + [\text{Log}(1/LPI) \times t] + [\text{Log} (1/LE) \times t] + \sqrt{TM} + e \}$$

Onde:

LPM = Latência para primeira monta

LPI = Latência para primeira intromissão

LPE = Latência para primeira ejaculação

$\sqrt{TM40}$ = Raiz quadrada do número total de montas incompletas e intromissões no tempo total de observação (40 min)

t = tempo total de observação

e = "0" se o animal não ejacular e "4" se o animal ejacular

3.4.4 Avaliações neuroquímicas (c-Fos)

Conforme estudos citados anteriormente, como exemplo, Bialy e Kaczmarek (1996), as áreas encefálicas relacionadas ao comportamento sexual já foram descritas através da expressão da proteína Fos. Sabe-se que a administração crônica de dexametasona, através de sua ação glicocorticóide, pode atenuar determinados comportamentos e conseqüentemente diminuir o número de células imunorreativas à Fos em determinados núcleos (CATANZO;GORZALKA, 1980).

Para avaliar o efeito da dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de fos em áreas encefálicas classicamente relacionadas ao comportamento sexual, alguns animais utilizados nos testes de performance sexual foram submetidos a perfusão cerebral e posterior imunohistoquímica para a proteína Fos.

3.4.4.1 Perfusão para Imunohistoquímica

Após 90 minutos da introdução do macho na caixa de observação, estes animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) e perfundidos através de uma punção intracardiaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1

M; 500 mL)

Após sua remoção, os encéfalos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1 M) a 4°C, sendo armazenados até a véspera dos procedimentos de imunistoquímica, quando os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um micrótomo de congelamento e coletados em PBS (0,01 M).

No dia seguinte a coleta dos cortes, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ ,1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS (0,01 M) 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1 M de PBS durante uma hora.

Os cortes foram processados para imunorreatividade para c-Fos ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS (0,1 M) contendo 2% de normal goat serum e 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotinilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, diluído 1:200 em 1.5% de normal goat serum - PBS) seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite, 1:200 em PBS) ambos por 1 hora a temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma -Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%. O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro preto ao núcleo (FLEMING e WALSH, 1994).

Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%). As lâminas foram secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan.

As áreas hipotalâmicas em estudo, córtex piriforme (Pir: 0.48 mm anterior ao bregma), estria da lâmina terminal (BST: -0.72 mm posterior ao bregma), núcleo pré-óptico mediano dorsal (MnPOd: -0.26 mm posterior ao bregma) e ventral (MnPOv: -0.26 mm posterior ao bregma), área pré-óptica medial (MPOA; -0.30mm posterior ao bregma), núcleo paraventricular (PVN: -0.96 mm posterior ao bregma) e núcleo supraóptico (SON: -1.08 mm posterior ao bregma), foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997). As células imunorreativas para c-Fos foram contadas no córtex piriforme; BST; MnPOd e

MnPOv; MPOA; PVN e SON

As células imunorreativas para c-Fos foram contadas com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L. As imagens foram capturadas e o número de cortes representativos para cada grupo experimental foi de 4.

3.4.5 Dosagem de corticosterona

Os animais submetidos aos testes de motivação sexual sofreram eutanásia por decaptação para coleta de sangue. O procedimento de decaptação foi realizado por experimentador experiente, que não teve contato com os animais antes ou durante os testes observacionais.

Cerca de 4ml sangue foram coletados de cada anina em tubos contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min) e as alíquotas foram mantidas a -20°C até o momento das dosagens hormonais.

As dosagens de corticosterona foram feitas por técnica de radioimunoensaio em colaboração no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.4.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados, os dados foram computados utilizando o software estatístico GraphPad versão 3.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de Student. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 Experimento 1 Efeitos da administração aguda de dexametasona no campo aberto

Ratos machos sexualmente inexperientes foram divididos em dois grupos: um controle com 7 animais e um experimental com 6 animais. No dia do experimento, por volta das 18 horas, 2 horas antes do início do teste, os animais receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/kg de peso do animal), via intraperitoneal (i.p.). No mínimo 10 minutos antes do início das filmagens os animais foram alocados na sala de experimento e mantidos em suas respectivas caixas moradia.

Para análise da atividade motora, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato e filmado por 5 minutos para posterior análise, conforme descrito no item 3.4.1.2. Os animais do grupo controle foram intercalados aos animais experimentais para cada observação, lembrando que após cada teste e antes de colocar um novo animal na arena, o campo aberto foi limpo com álcool 70% a fim de homogeneizar a situação experimental, eliminando possíveis odores deixados pelo animal anterior na arena.

Após os testes, os animais foram recolocados em suas caixas moradia e no dia seguinte, foram submetidos a eutanásia com Halotano.

4.2 Experimento 2 Efeitos da administração crônica de dexametasona no campo aberto

Ratos machos sexualmente inexperientes foram divididos em dois grupos: um controle com 10 animais e um experiencial com 10 animais. Quatro dias antes

do experimento, por volta das 18 horas, os animais receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/ kg de peso do animal), via i.p.. Esse procedimento foi repetido no mesmo horário, por mais três dias consecutivos, sendo o dia do experimento o quarto dia de administração da droga. No mínimo 10 minutos antes do início das filmagens os animais foram alocados na sala de experimento e mantidos em suas respectivas caixas moradia.

Para análise da atividade motora, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato e filmado por 5 minutos para posterior análise, conforme descrito no item 3.4.1.2. Os animais do grupo controle foram intercalados aos animais experimentais para cada observação, lembrando que após cada teste e antes de colocar um novo animal na arena, o campo aberto foi limpo com álcool 70% a fim de homogeneizar a situação experimental, eliminando possíveis odores deixados pelo animal anterior na arena.

Após os testes, os animais foram recolocados em suas caixas moradia e no dia seguinte, foram submetidos a eutanásia com Halotano.

4.3 Experimento 3 Efeitos da administração aguda dexametasona na motivação sexual de ratos machos

Os ratos foram divididos em dois grupos: um controle com 9 animais e um experimental com 11 animais. Os ratos de ambos os grupos eram sexualmente inexperientes, nunca tiveram contato com fêmeas (ratos ingênuos) e foram habituados à estrutura da arena sem as iscas por 5 minutos, durante 3 dias consecutivos, conforme descrito no item 3.4.2. Após uma semana, os animais do grupo experimental receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/ kg de peso do animal), via intraperitoneal (IP), por volta das 18hs, cerca de duas horas antes do início da observação.

Para a análise da motivação sexual, os animais foram alocados na sala de experimentação no mínimo 30 minutos antes do início das filmagens, mantidos em suas respectivas caixas moradia. As gaiolas metabólicas, contendo os animais iscas, isto é, uma fêmea receptiva e um macho experiente, foram colocadas em frente as suas respectivas zonas de incentivo, no mínimo 20 minutos antes do início das filmagens. Cada animal teste foi colocado individualmente no centro da arena e filmados por 20 minutos para posterior análise do tempo de permanência nas zonas de incentivo da fêmea (ZIF), e do macho (ZIM); frequência de visitas a cada ZI (número de vezes que o animal entra com as quatro patas na ZIF ou ZIM). A partir desses dados foram calculados as médias de duração de visitas às ZIF ou à ZIM e o escore de preferência, ou seja, a razão entre o tempo de permanência na ZIF e o tempo de permanência nas duas ZI, conforme descrito no item 3.4.2.

Logo após os teste, os animais submetidos a análise de motivação sexual sofreram eutanásia por decaptação para coleta de sangue, realizada por experimentador experiente, que não teve contato com os animais antes ou durante os testes observacionais.

4.4 Experimento 4 Efeitos da administração crônica de dexametasona na motivação sexual de ratos machos

Os ratos foram divididos em dois grupos: um controle com 7 animais e um experimental com 8 animais. Como no experimento anterior, os ratos de ambos os grupos eram ingênuos e foram habituados à estrutura da arena sem as iscas por 5 minutos, durante 3 dias consecutivos, conforme descrito no item 3.4.2. Após três dias, os animais do grupo experimental receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/kg de peso do animal), via i.p., por volta das 18hs. O mesmo procedimento foi repetido no mesmo horário, por mais três dias consecutivos, sendo o dia do experimento o quarto dia de administração da droga e o sétimo após a habituação dos animais na arena.

Para a análise da motivação sexual, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no protocolo 4.3

4.5 Experimento 5 Efeito da administração aguda e crônica de dexametasona na concentração plasmática de corticosterona

Os animais submetidos ao protocolo 4.3 e 4.4 sofreram eutanásia por decaptação para coleta de sangue, realizada por experimentador experiente, que não teve contato com os animais antes ou durante os testes observacionais.

Cerca de 4ml sangue foram coletados de cada animal em tubos contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4C, 15 min) e as alíquotas foram mantidas a -20C até o momento das dosagens hormonais, conforme descrito no item 3.4.5.

As dosagens de corticosterona foram feitas por técnica de radioimunoensaio em colaboração no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

4.6 Experimento 6 Efeitos da administração aguda de dexametasona na performance sexual de ratos machos

Ratos sexualmente experientes, ou seja, que tiveram contato com fêmeas e engravidaram pelo menos duas fêmeas em 1 semana foram divididos em dois grupos: um controle com 14 animais e um experimental com 17 animais. No dia do experimento, por volta das 18 horas, 2 horas antes do início do teste, os animais receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/ kg de peso do animal), via intraperitoneal (IP).

Para avaliação do comportamento sexual, os animais foram transportados para sala de observação pelo menos 10 minutos antes do experimento, para ambientação. O macho era colocado na caixa de observação e mantido sozinho por 5 minutos. O experimento iniciou-se após esse período através da introdução da fêmea receptiva e início da filmagem com duração de 40 minutos contados a partir

da primeira monta, procedimentos realizados conforme descrito no item 3.4.3.

4.7 Experimento 7 Efeitos da administração crônica dexametasona na performance sexual de ratos machos

Ratos sexualmente experientes foram divididos em dois grupos: um controle com 11 animais e um experimental com 10 animais. Quatro dias antes do experimento, por volta das 18 horas, os animais receberam dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal (diluição da droga em SF0,9%: 1mg/ml) e os animais controle receberam o veículo, ou seja, SF0,9% no mesmo volume do grupo experimental (1ml/kg de peso do animal), via i.p.. Esse procedimento foi repetido no mesmo horário, por mais três dias consecutivos, sendo o dia do experimento o quarto dia de administração da droga.

Para avaliação do comportamento sexual foram realizados os mesmos procedimentos descritos no protocolo 4.6.

4.8 Experimento 8 Efeitos da administração aguda dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos

Entre os animais submetidos aos testes descritos no protocolo 4.7, foram selecionados aleatoriamente 4 animais. Após 90 minutos da introdução do macho na caixa de observação, estes animais foram anestesiados e perfundidos através de uma punção intracardíaca com salina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato. Após sua remoção, os encéfalos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30%, sendo armazenados até a véspera dos procedimentos de imunistoquímica, quando os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um micrótomo de congelamento e coletados em PBS, conforme descrito no item 3.4.4.1.

No dia seguinte a coleta dos cortes, foi iniciado o procedimento de imunistoquímica, conforme descrição anterior (item 3.4.4.1), para posterior análise das áreas cerebrais: córtex piriforme; BST; MnPOd e MnPOv; MPOA; PVN e SON.

4.9 Experimento 9 Efeitos da administração crônica dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos

Entre os animais submetidos aos testes descritos no protocolo 4.8, foram selecionados aleatoriamente 4 animais. Após 90 minutos da introdução do macho na caixa de observação, estes animais foram anestesiados e perfundidos através de uma punção intracardíaca com salina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato. Após sua remoção, os encéfalos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30%, sendo armazenados até a véspera dos procedimentos de imunistoquímica, quando os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 μ m de espessura utilizando um micrótomo de congelamento e coletados em PBS, conforme descrito no item 3.4.4.1.

No dia seguinte a coleta dos cortes, foi iniciado o procedimento de imunistoquímica, conforme descrição anterior (item 3.4.4.1), para posterior análise das áreas cerebrais: córtex piriforme; BST; MnPOd e MnPOv; MPOA; PVN e SON.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da administração aguda de dexametasona no campo aberto

A figura 4 mostra os efeitos da administração aguda de dexametasona sobre a atividade geral de ratos sexualmente inexperientes observados no campo aberto.

Observamos que não houve diferença significativa no número de entradas no centro (Figura 4A), entradas na periferia (Figura 4B), número total de entradas (Figura 4C), número total de *rearing* (Figura 4D) e na razão entre as entradas no centro sobre o total de entradas (Figura 4E), entre os animais que receberam dexametasona quando comparados aos animais controle.

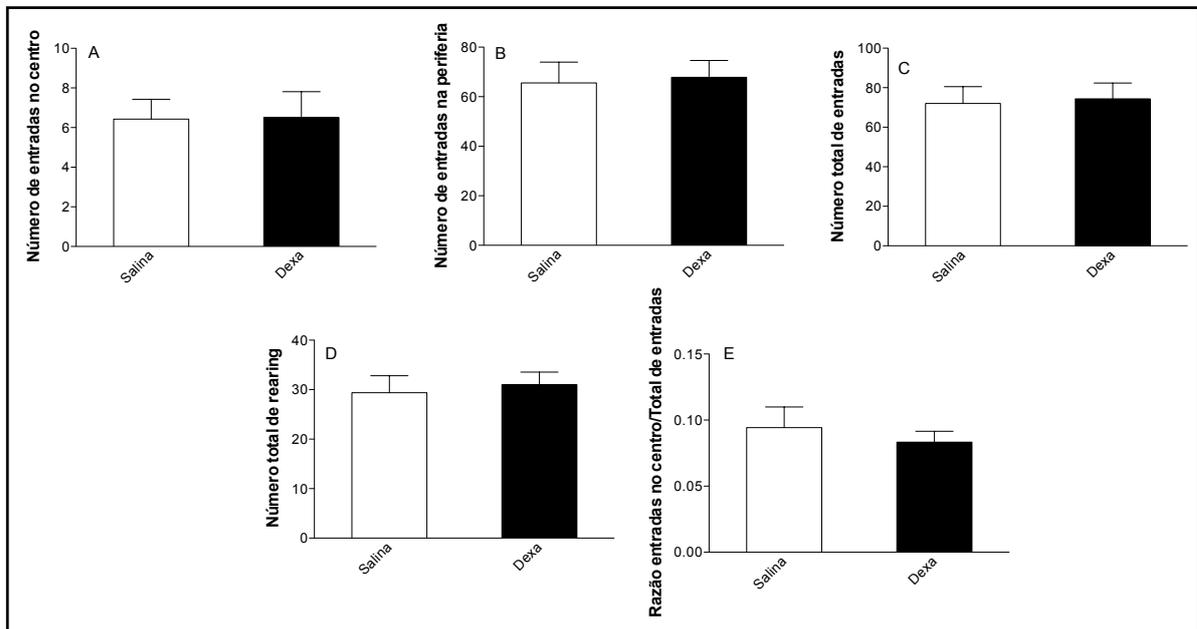


Figura 4 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 6) ou Salina (1 ml/kg; n= 7) sobre o número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número total de entradas (C), número total de *rearing* (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E) em ratos sexualmente inexperientes no campo aberto. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.2 Efeitos da administração crônica de dexametasona no campo aberto

Os efeitos da administração crônica de dexametasona no campo aberto são mostrados na Figura 5. Foi observado que não houve diferença no número de entradas no centro (Figura 5A), entradas na periferia (Figura 5B), número total de entradas (Figura 5C), número total de *rearing* (Figura 5D) e na razão entre as entradas no centro sobre o total de entradas (Figura 5E), entre os animais que receberam dexametasona quando comparados aos animais controle.

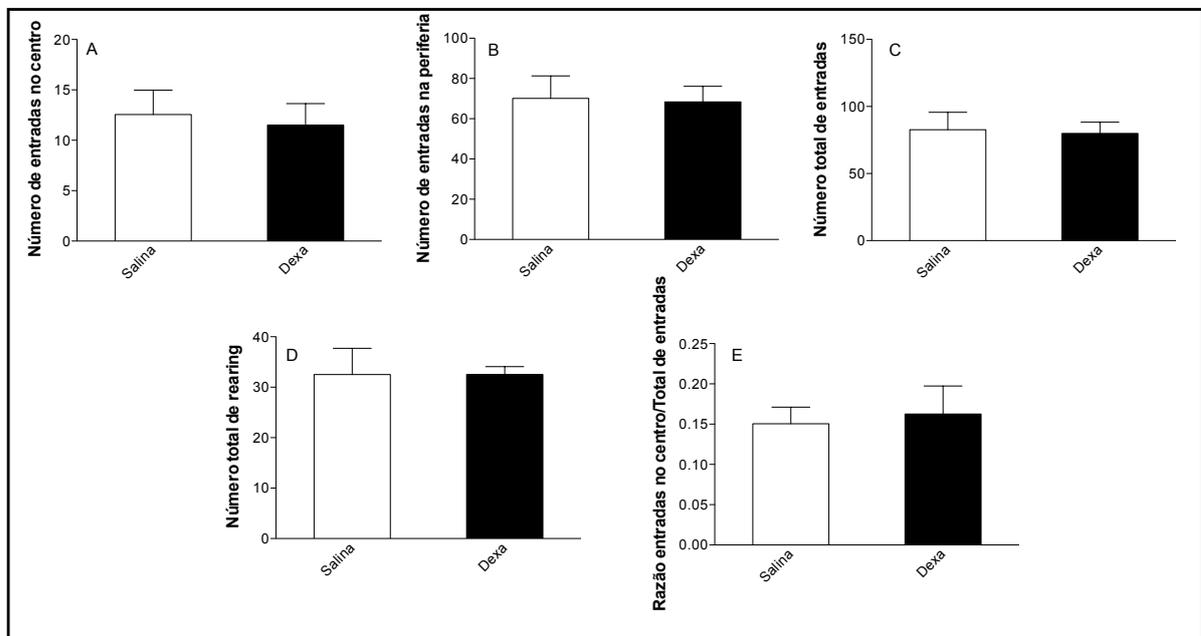


Figura 5 : Efeito da administração crônica de dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 10) sobre o número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número total de entradas (C), número total de *rearing* (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E) em ratos sexualmente inexperientes no campo aberto. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.3 Efeitos da administração aguda dexametasona na motivação sexual de ratos machos

A análise da motivação sexual mostrou que o tratamento agudo com dexametasona aumentou a preferência pelo incentivo sexual, uma vez que

observamos nos animais experimentais aumento no tempo de permanência na ZIF ($p < 0,05$; Figura 6A); diminuição no tempo de permanência na ZIM ($p < 0,05$; Figura 6B); diminuição no número de visitas à ZIM ($p < 0,01$; Figura 6F) e aumento no escore de preferência ($p < 0,05$; Figura 6G) quando comparados aos animais controle. Notamos também que o tratamento não alterou significativamente a média de duração às visitas tanto na ZIF (Figura 6C) quanto na ZIM (Figura 6D) e no número de visitas à ZIF (Figura 6E).

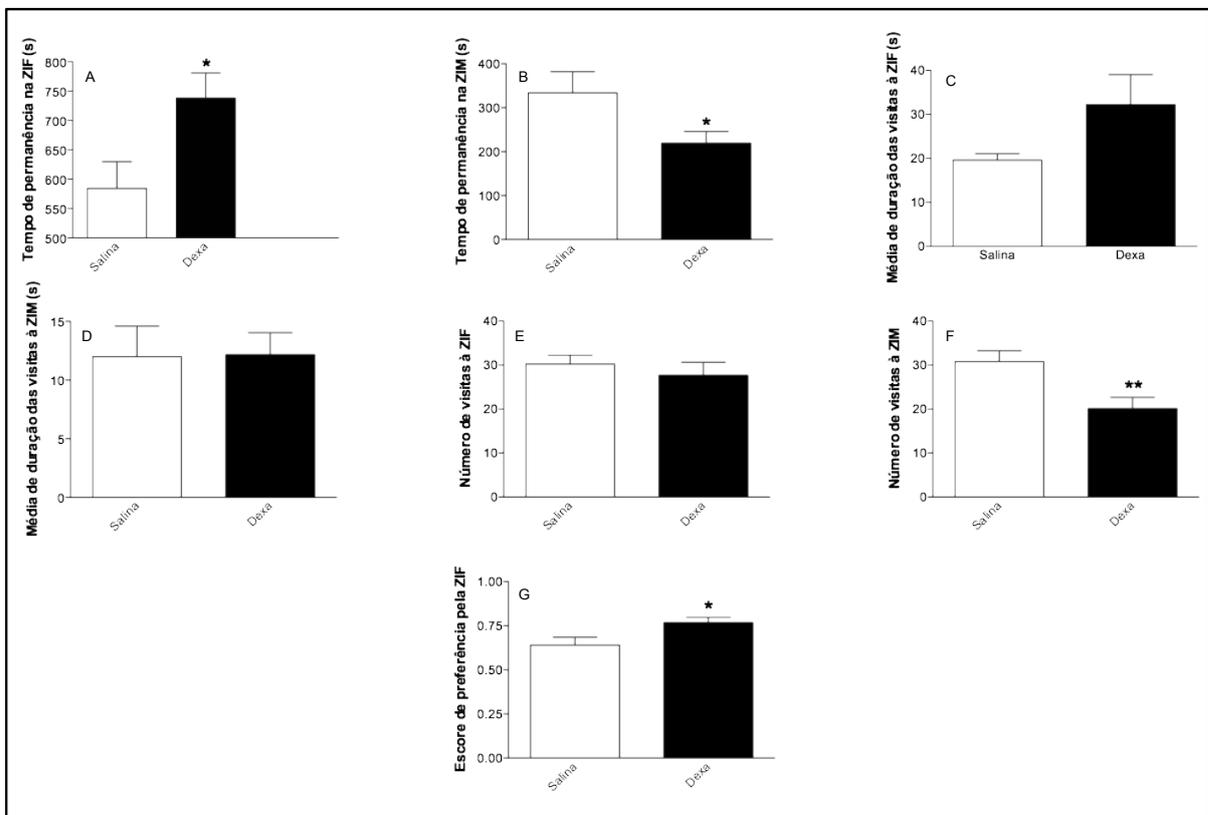


Figura 6 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 11) ou Salina (1 ml/kg; n= 9) sobre parâmetros da motivação sexual: tempo de permanência na ZIF (A); tempo de permanência na ZIM (B); média de duração das visitas à ZIM (C); média de duração das visitas à ZIM (D); número de visitas à ZIF (E); número de visitas à ZIM (F) e escore de preferência (G) São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.4 Efeitos da administração crônica dexametasona na motivação sexual de ratos machos

A análise dos resultados da motivação sexual mostrou que o tratamento crônico não alterou de maneira significativa nenhum dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle. O tratamento não alterou o tempo de permanência na ZIF (Figura 7A); o tempo de permanência na ZIM (Figura 7B); a média de duração das visitas tanto à ZIF (Figura 7C), quanto à ZIM (Figura 7D); o número de visitas à ZIF (Figura 7E) e à ZIM (Figura 7F) e o escore de preferência (Figura 7G).

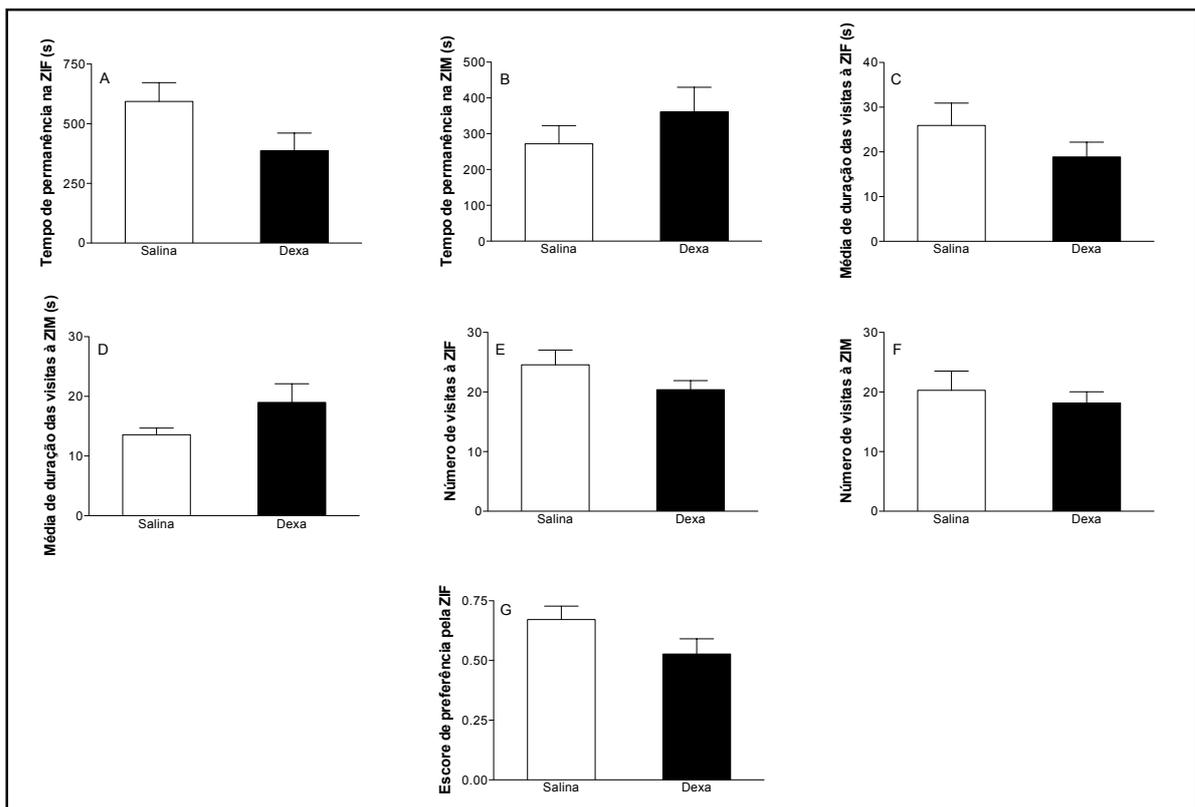


Figura 07 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 8) ou Salina (1 ml/kg; n= 7) sobre parâmetros da motivação sexual: tempo de permanência na ZIF (A); tempo de permanência na ZIM (B); média de duração das visitas à ZIM (C); média de duração das visitas à ZIM (D); número de visitas à ZIF (E); número de visitas à ZIM (F) e escore de preferência (G) São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.5 Efeito da administração aguda de dexametasona na concentração plasmática de corticosterona

Os animais submetidos ao experimento descrito protocolo 4.3, que avaliou a administração aguda da dexametasona sobre a motivação sexual, sofreram eutanásia por decaptação para coleta de sangue, realizada por experimentador experiente, que não teve contato com os animais antes ou durante os testes observacionais.

O resultado da dosagem hormonal está representado na Figura 8, onde observamos que a diminuição significativa e acentuada dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais que receberam dexametasona (Figura 8, $p < 0,0001$) em relação aos animais que receberam veículo.

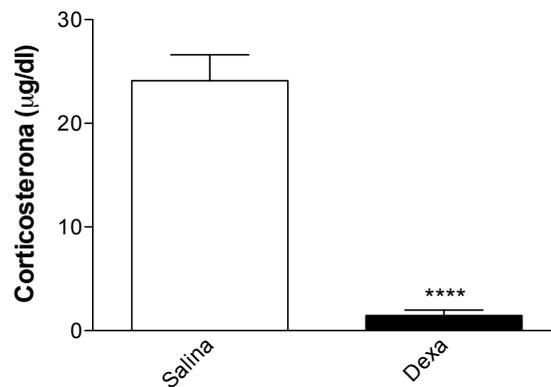


Figura 08 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 11) ou salina (1 ml/kg; n= 9) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos sexualmente inesperientes submetidos à avaliação da motivação sexual. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; **** $p < 0.0001$; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.6 Efeito da administração crônica de dexametasona na concentração plasmática de corticosterona

O resultado, representado na figura 9 mostra níveis praticamente indetectáveis de corticosterona plasmática nos animais que receberam dexametasona cronicamente (Figura 9; $p < 0,0001$) em comparação aos que receberam salina.

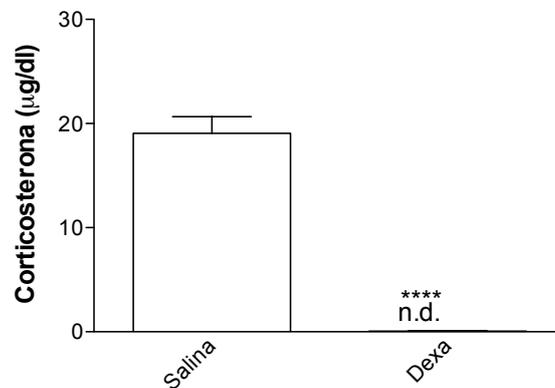


Figura 09: Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 8) ou salina (1 ml/kg; n= 7) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos sexualmente inesperientes submetidos à avaliação da motivação sexual. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; **** $p < 0.0001$; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.7 Efeitos da administração aguda de dexametasona na performance sexual de ratos machos

A figura 10 abrange os parâmetros pré-ejaculatórios e mostra que a administração aguda de dexametasona diminuiu significativamente a latência para primeira ejaculação (LPE) nos animais tratados (Figura10E; $p < 0,01$) em relação aos animais controle. Os demais parâmetros não foram alterados pelo tratamento, ou

seja, a droga não alterou a latência para primeira monta (LPM; Figura 10A); a latência para a primeira intromissão (LPI; Figura 10B); número de montas incompletas (MI, Figura 10C) e número de intromissões (NI, Figura 10D).

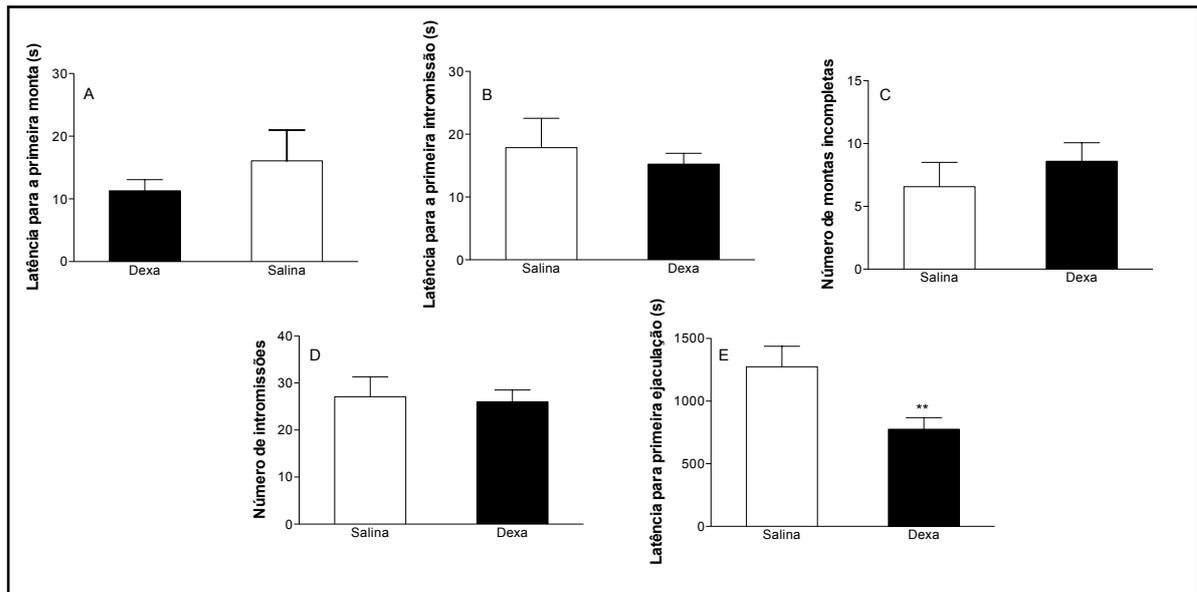


Figura 10 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 17) ou Salina (1 ml/kg; n= 14) sobre parâmetros pré-ejaculatórios da performance sexual: LPM (A); LPI (B); MI (C); NI (D); LPE (E). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; **p<0,01 teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Em relação aos parâmetros pós-ejaculatórios, observamos que a administração de dexametasona aumentou significamente o número de montas incompletas pós-ejaculação (MIP; Figura 11C; $p < 0,001$) e aumentou o número de ejaculações (NE; Figura 11E; $p < 0,05$). Por outro lado, não observamos diferença em relação a latência para primeira monta pós- ejaculação (LPMP; Figura 11A); latência para primeira intromissão pós- ejaculação (LPIP; Figura 11B) e número de intromissões pós- ejaculação (NIP; Figura 11D), quando comparado aos animais que receberam salina.

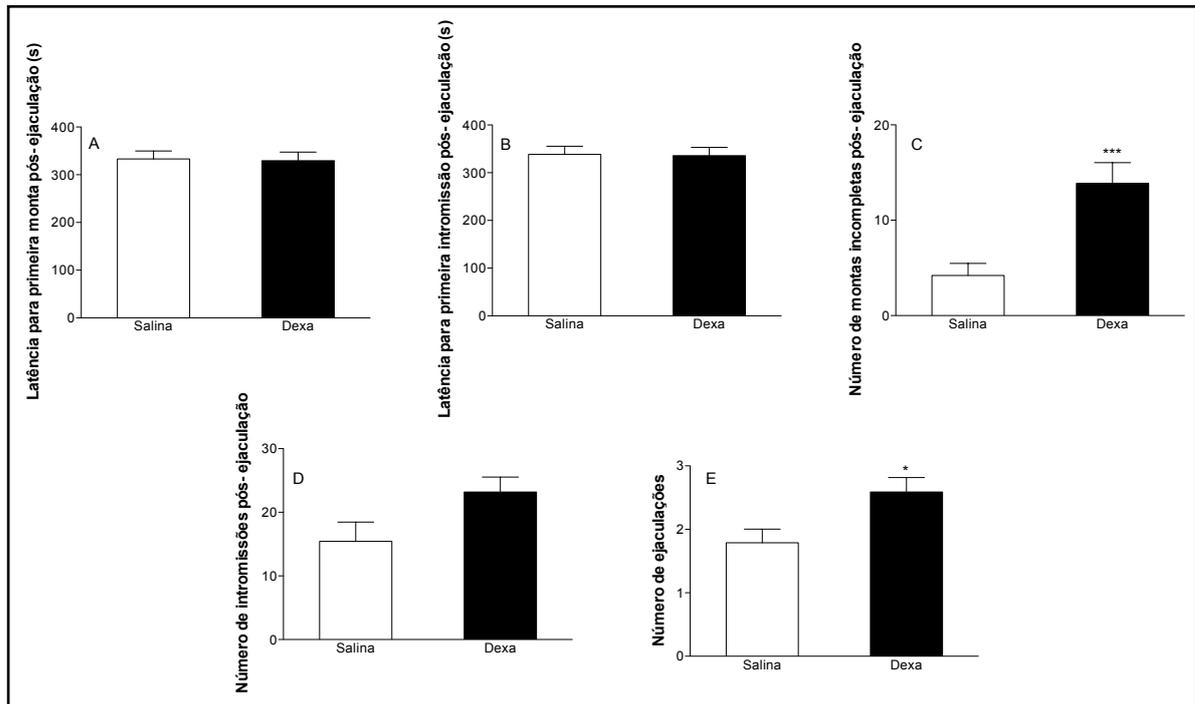


Figura 11 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 17) ou Salina (1 ml/kg; n= 14) sobre parâmetros pós-ejaculatórios da performance sexual: LPMP (A); LPIP (B); MIP (C); NIP (D); NE (E). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Através dos parâmetros analisados, foram calculados, somente para os animais que ejacularam pelo menos uma vez durante o período de observação (40 min) os seguintes índices: número total de montas até a primeira ejaculação (TM; Figura 12A); número total de montas no tempo total de observação (TMT; Figura 12B); frequência de montas por minuto (Figura 12C); frequência de intromissões por minuto (Figura 12D); intervalo inter-intromissões (Figura 12E); eficiência copulatória (Figura 12F) e índice de atividade sexual (IAS; Figura 12G).

Observamos que o tratamento agudo com dexametasona aumentou o número total de montas (Figura 12B; $p < 0,05$); aumentou a frequência de montas por minuto (Figura 12C; $p < 0,001$) e a frequência de intromissões por minuto (Figura 12D; $p < 0,001$), quando comparado a administração de salina. Enquanto isso, os resultados mostram que a administração aguda de dexametasona diminuiu ao

intervalo inter-intromissões (Figura 12; $p < 0,05$). Não observamos diferença significativa nos outros parâmetros.

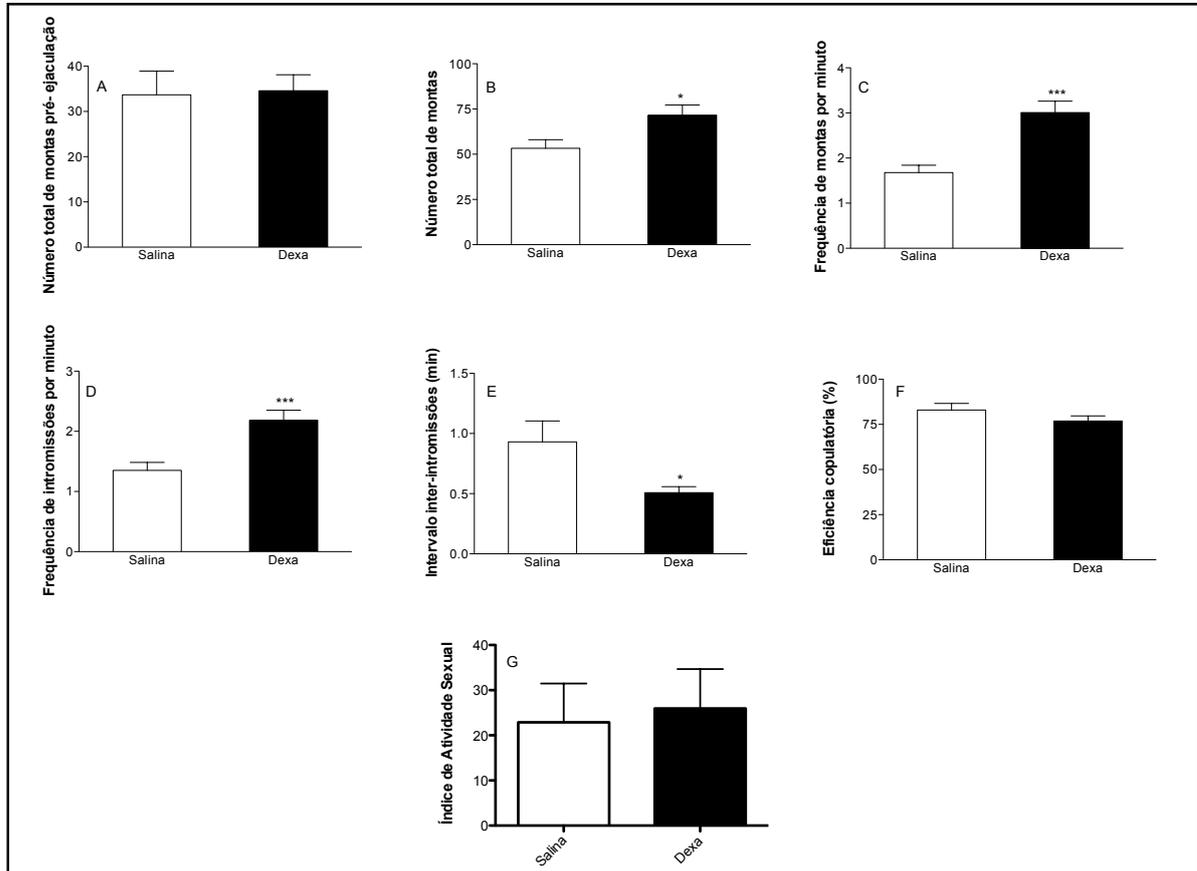


Figura 12 : Efeito da administração aguda da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; $n = 17$) ou Salina (1 ml/kg; $n = 14$) sobre parâmetros calculados da performance sexual: TM (A); TMT (B); Frequência de montas/minuto (C); Frequência de intromissões/minuto (D); Intervalo Inter- intromissões (E); Eficácia Copulatória (F) e IAS (G). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.8 Efeitos da administração crônica dexametasona na performance sexual de ratos machos

A figura 13 representa os parâmetros pré-ejaculatórios e mostra que a administração aguda de dexametasona não alterou de maneira significativa a latência para primeira monta (LPM; Figura 13A); a latência para a primeira

intromissão (LPI; Figura 13B); número de montas incompletas (MI, Figura 13C) e número de intromissões (NI, Figura 13D); a latência para primeira ejaculação (LPE) nos animais tratados (Figura 13E) em relação aos animais controle.

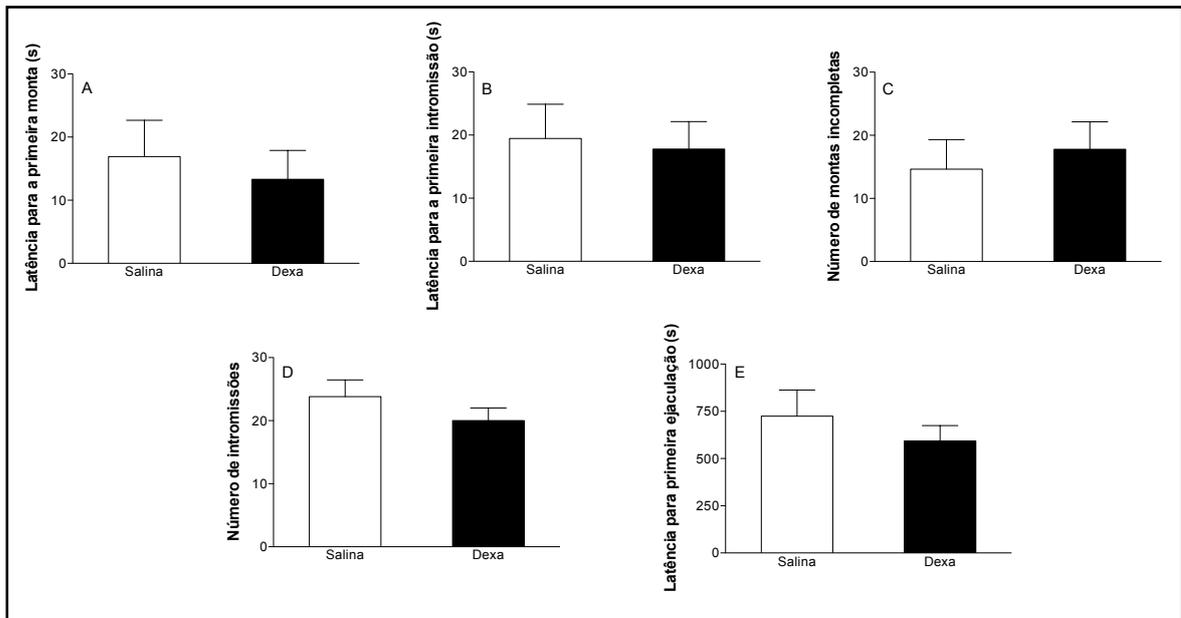


Figura 13 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros pré-ejaculatórios da performance sexual: LPM (A); LPI (B); MI (C); NI (D); LPE (E). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões. Teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Em relação aos parâmetros pós-ejaculatórios, ilustrados na Figura 14, observamos que a administração crônica de dexametasona não alterou significamente a latência para primeira monta pós- ejaculação (LPMP; Figura 14A); latência para primeira intromissão pós- ejaculação (LPIP; Figura 14B); número de montas incompletas pós- ejaculação (NIP; Figura 14C); número de intromissões pós- ejaculação (NIP; Figura 14D) e número de ejaculações (NE; Figura 14E), quando comparado aos animais que receberam salina.

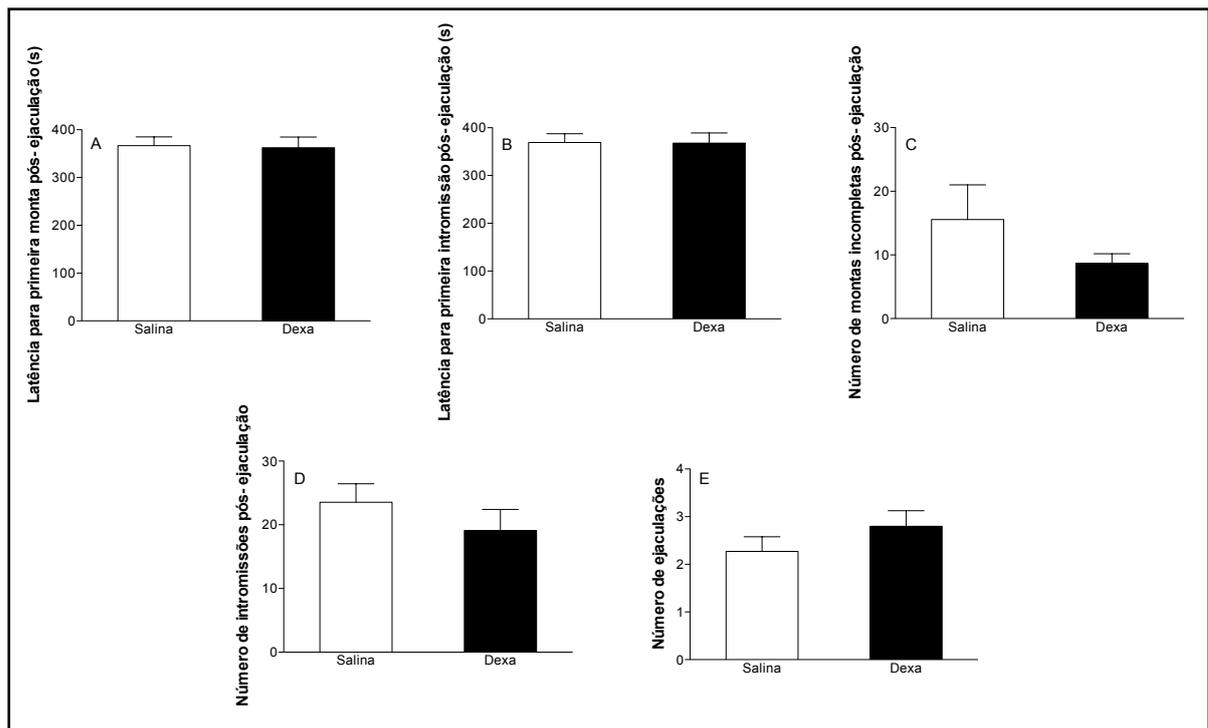


Figura 14 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros pós-ejaculatórios da performance sexual: LPMP (A); LPIP (B); MIP (C); NIP (D); NE (E). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; Teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Através dos parâmetros analisados, foram calculados, somente para os animais que ejacularam pelo menos uma vez durante o período de observação (40 min) os seguintes índices: número total de montas até a primeira ejaculação (TM; Figura 15A); número total de montas no tempo total de observação (TMT; Figura 15B); frequência de montas por minuto (Figura 15C); frequência de intromissões por minuto (Figura 15D); intervalo inter-intromissões (Figura 15E); eficiência copulatória (Figura 15F) e índice de atividade sexual (IAS; Figura 15G).

Observamos que o tratamento crônico não alterou de maneira significativa nenhum dos parâmetros calculados.

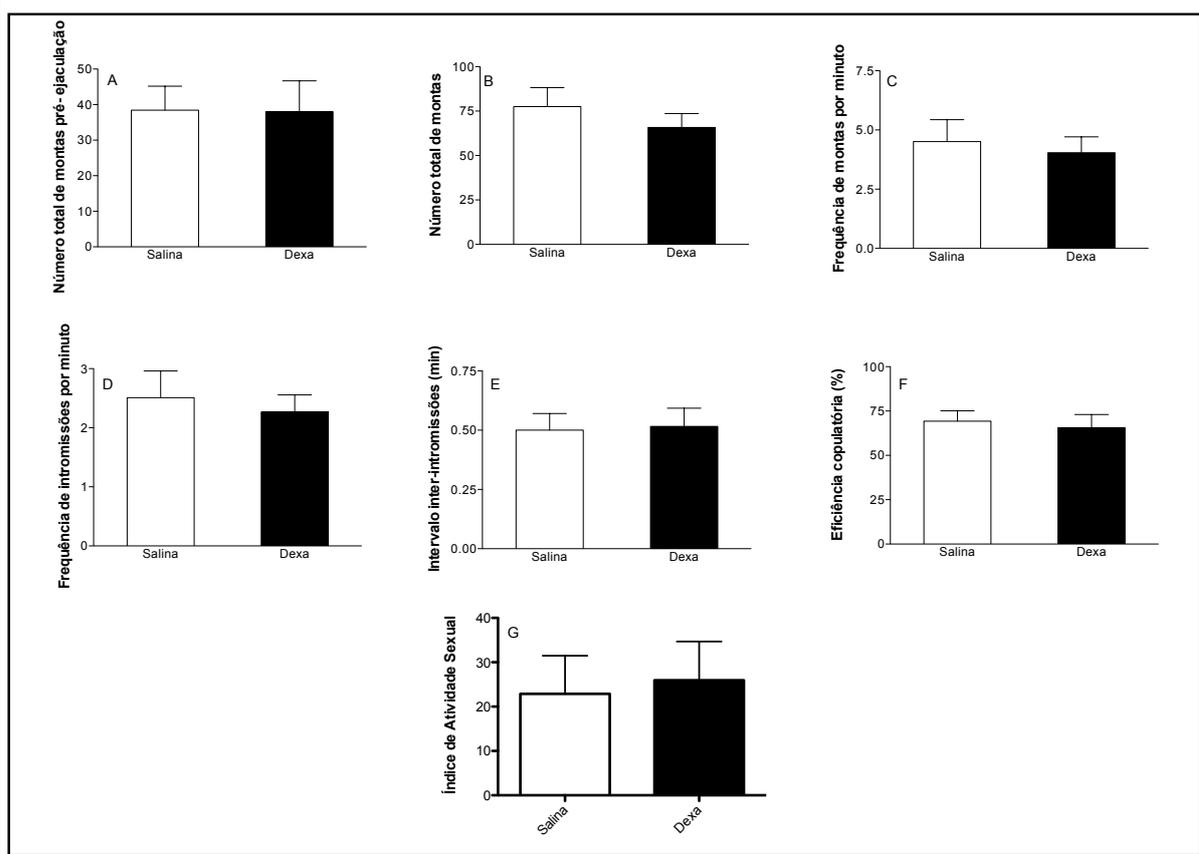


Figura 15 : Efeito da administração crônica da dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; n= 10) ou Salina (1 ml/kg; n= 11) sobre parâmetros calculados da performance sexual: TM (A); TMT (B); Frequência de montas/minuto (C); Frequência de intromissões/minuto (D); Intervalo Inter- intromissões (E); Eficácia Copulatória (F) e IAS (G). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões. Teste “t” de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.9 Efeitos da administração aguda dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos

Na figura 16 podemos observar que a administração aguda da dexametasona diminuiu o número de células imunorreativas a Fos (Fos-IR) no BST (Figura 16F; $p < 0,01$), no MnPO d (Figura 16I; $p < 0,01$) e no MnPOv (Figura 16L; $p < 0,01$) quando comparado aos animais que receberam salina. O tratamento agudo com dexametasona não alterou o número de células positivas para c-Fos no córtex piriforme (Figura 16C).

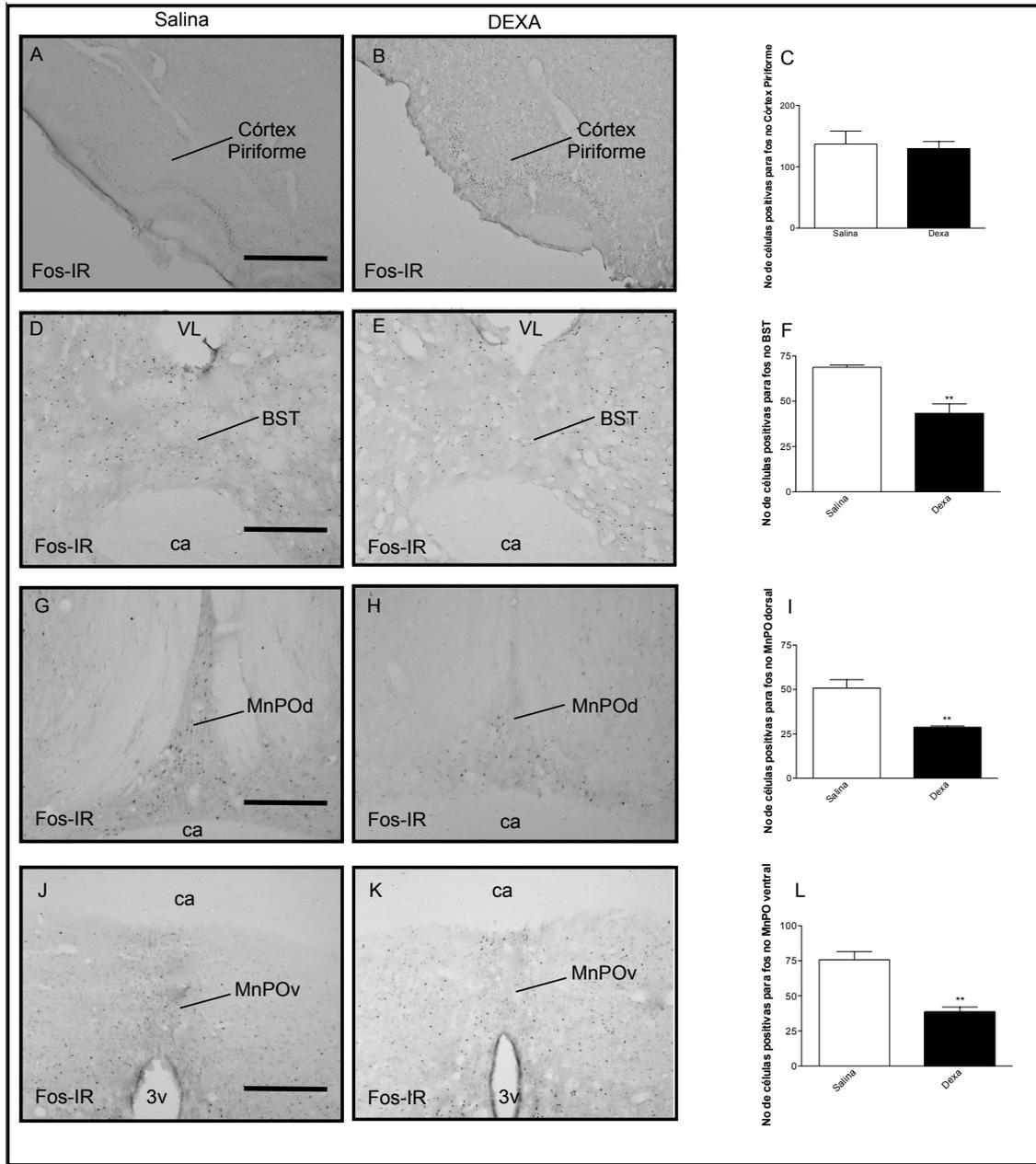


Figura 16 : Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptoras e que apresentaram ejaculação.

Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando o Córtex Piriforme (A-B), BST (D-E), MnPOd (G-H) e MnPOv (J-K) em ratos machos tratados de forma aguda com salina (1 ml/kg; A, D, G e J) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E, H e K). Abreviações: ca: comissura anterior; VL: ventrículo lateral e 3v: terceiro ventrículo. Barras: A: 50 μ m; D, G e J: 100 μ m. Ao lado estão os gráficos (C, F, I e L) do número de células imunorreativas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$. teste "t" de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Na figura 17 podemos observar que o tratamento agudo com dexametasona diminuiu a expressão de C-Fos em neurônios do PVN (Figura 17F; $p < 0,05$) e no SON (Figura 17I; $p < 0,05$). Por outro lado, o tratamento não alterou a relação na MPOA (Figura 17C).

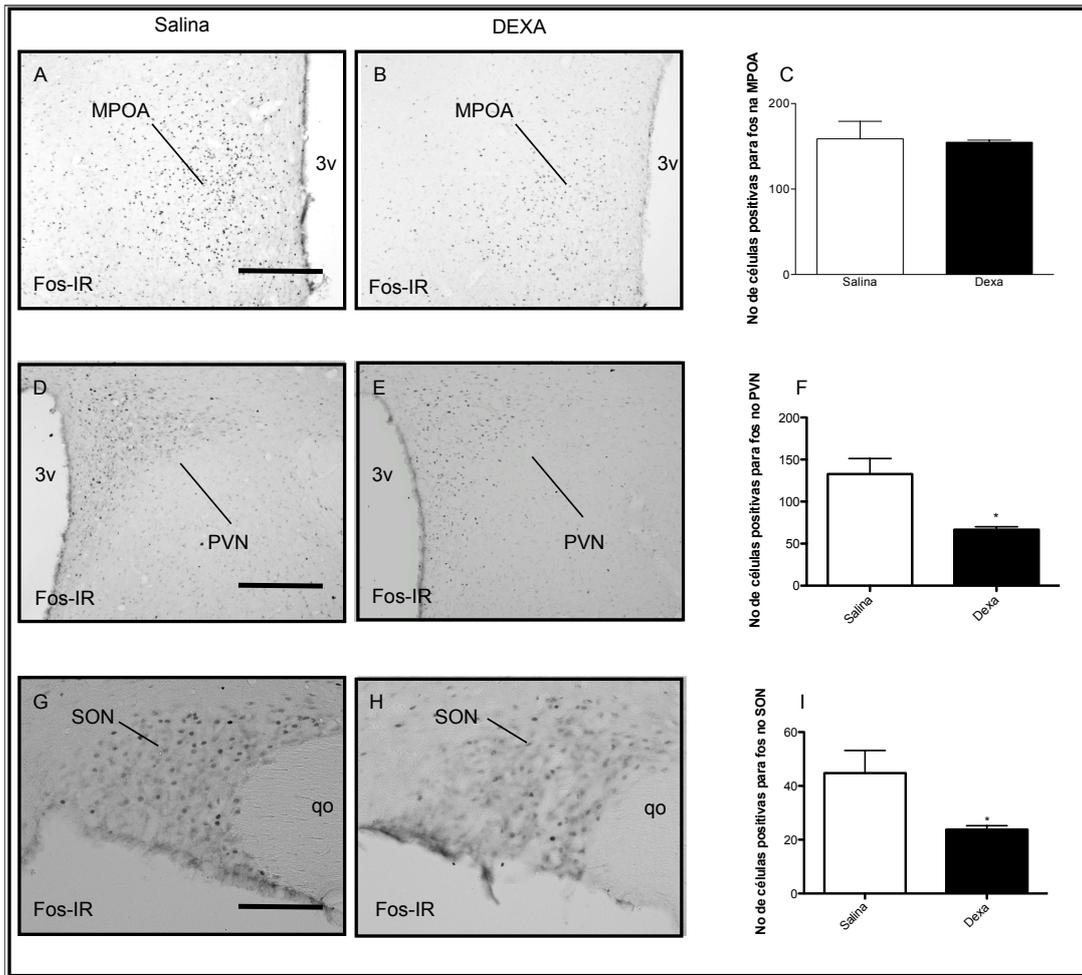


Figura 17 : Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.

Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando a MPOA (A-B), PVN (D-E) e SON (G-H) em ratos machos tratados de forma aguda com salina (1 ml/kg; A, D e G) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E e H). Abreviações: 3v: terceiro ventrículo e qo: quiasma óptico. Barras: A e D: 100 μ m; G: 400 μ m. Ao lado estão os gráficos (C, F e I) do número de células imunorreativas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$. teste "t" de Student em relação ao grupo controle (Salina).

5.10 Efeitos da administração crônica dexametasona e do comportamento sexual sobre a expressão de c-fos

Na figura 18 observamos que o tratamento crônico com dexametasona não alterou a expressão de células imunorreativas a Fos no córtex piriforme (Figura 18C), no BST (Figura 18F), no MnPOd (Figura 18I) e no MnPOv (Figura 18L)

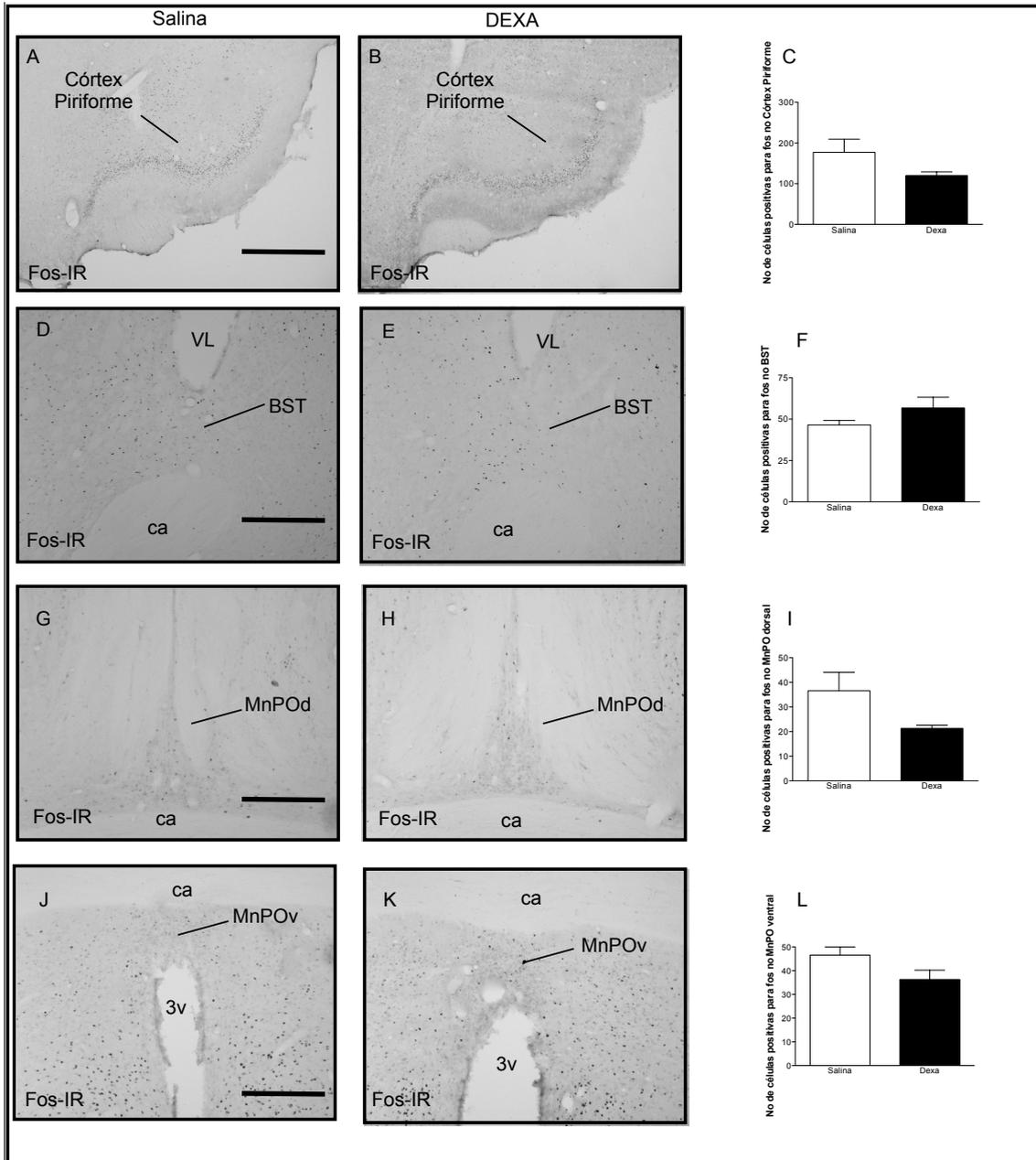


Figura 18 : Distribuição de imunoreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptivas e que apresentaram ejaculação.

Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando o CórteX Piriforme (A-B), BST (D-E), MnPOd (G-H) e MnPOv (J-K) em ratos machos tratados de forma crônica com salina (1 ml/kg; A, D, G e J) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E, H e K). Abreviações: ca: comissura anterior; VL: ventrículo lateral e 3v: terceiro ventrículo. Barras: A: 50 μ m; D, G e J: 100 μ m. Ao lado estão os gráficos (C, F, I e L) do número de células imunorreativas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. teste "t" de Student em relação ao grupo controle (Salina).

Na figura 19 observamos que a administração crônica de dexametasona aumentou o número de células imunorreativas a Fos no SON (Figura 19I; $p < 0,05$) quando comparados aos animais que receberam salina. Entretanto, não observamos diferença no MPOA (Figura 19C) e no PVN (Figura 19F).

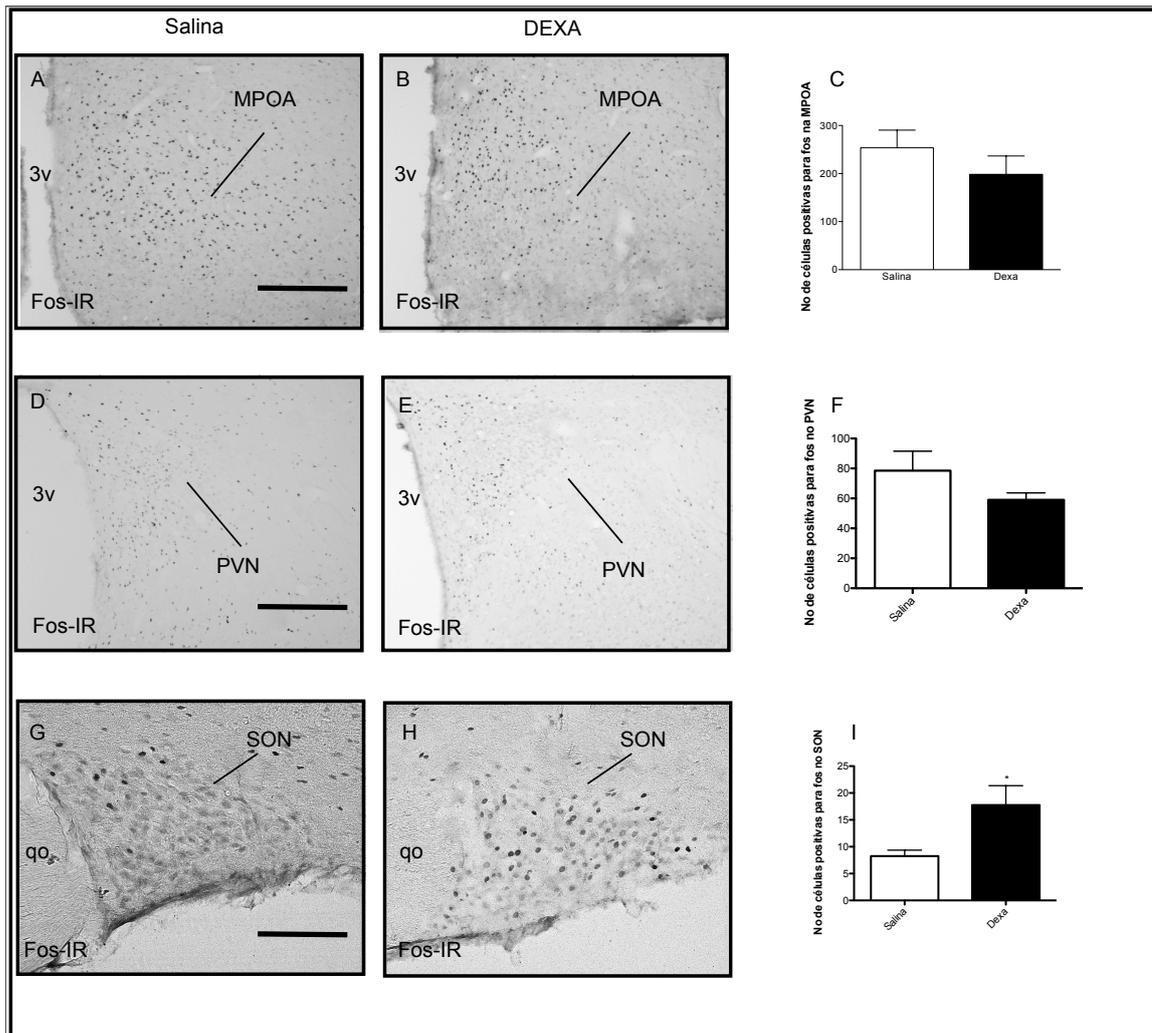


Figura 19 : Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-IR) em áreas encefálicas de ratos machos expostos a fêmeas receptoras e que apresentaram ejaculação.

Fotomicrografias em campo claro representativas de cortes de encéfalos mostrando a MPOA (A-B), PVN (D-E) e SON (G-H) em ratos machos tratados de forma crônica com salina (1 ml/kg; A, D e G) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; B, E e H). Abreviações: 3v: terceiro ventrículo e qo: quiasma óptico. Barras: A e D: 100 μ m; G: 400 μ m. Ao lado estão os gráficos (C, F e I) do número de células imunorreativas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$. teste "t" de Student em relação ao grupo controle (Salina).

6 DISCUSSÃO

As avaliações comportamentais são úteis e efetivas para a análise dos possíveis efeitos das drogas em geral no Sistema Nervoso Central, o que corriqueiramente são chamados de efeitos centrais das drogas. Neste trabalho, diferentes modelos comportamentais foram utilizados para avaliar os efeitos centrais da dexametasona, um potente glicocorticóide exógeno, principalmente sobre o comportamento sexual dos ratos machos.

Utilizou-se a dose de 1mg/kg via intra-peritoneal (i.p.) com o intuito de promover a maior penetração da droga no SNC. Esta dose foi efetiva tanto para promover alterações comportamentais como para modificar a expressão de imunorreatividade a Fos em ratas lactantes em projeto desenvolvido em nosso laboratório (VILELA, 2011). Para analisar os possíveis efeitos da administração crônica de dexametasona optamos por repetir a dose de 1mg/kg durante 4 dias consecutivos no mesmo horário de administração.

Todos os protocolos experimentais foram realizados na fase de escuro do ciclo claro/ escuro a fim de promover condições semelhantes para os testes, diminuir possíveis diferenças relacionadas ao ritmo circadiano e promover o período ideal para observação eficiente do comportamento sexual, uma vez que é durante a fase de escuro (AGMO, 1997).

Para promover um controle sobre os possíveis efeitos motores e ansiolíticos da droga, a atividade geral foi avaliada através do campo aberto. Este teste, vastamente utilizado como metodologia na psicofarmacologia, permite a quantificação da atividade motora espontânea. Além disso, a avaliação do efeito anti-tigmotático mostra a diminuição da preferência típica, relacionado à ansiedade (VALLE, 1970; PRUT e BELZUNG, 2003; VILELA et al, 2009).

A metodologia de campo aberto ou “open field” contribuiu para a análise dos possíveis efeitos da administração aguda e crônica de dexametasona sobre a locomoção dos animais. Observamos que para as duas formas de administração não houve alteração significativa de nenhum dos parâmetros analisados, ou seja, no número de entradas no centro, entradas na periferia, número total de entradas,

número total de *rearing* e na razão entre as entradas no centro sobre o total de entradas entre os animais que receberam dexametasona quando comparados aos animais controle, que receberam veículo. Isso mostra que a dexametasona não alterou o padrão motor dos animais e que os grupos se comportaram de maneira homogênea no que tange o controle periféricos na musculatura esquelética, coordenação sensoriomotora e elaboração e interpretação da informação sensorial, bem como em relação a aspectos relacionados à ansiedade e medo (VALLE, 1970; PRUT e BELZUNG, 2003; VILELA et al, 2009).

Como descrito anteriormente, para melhor avaliar os eventos observados na análise do comportamento sexual, faz-se necessário distinguir a motivação sexual da execução da cópula, ou performance, assim como fazem os estudos clássicos da área (AGMO, 1997).

Muitas vezes, os parâmetros de motivação sexual podem estar misturados aos de performance, como exemplo, a latência para primeira monta ou primeira intromissão. Sendo assim, a metodologia escolhida para avaliação da motivação sexual contou com um método específico, no qual estudos prévios mostraram sua eficácia e reprodutibilidade. Agmo (2003), testando profundamente este método, estabeleceu que os animais sexualmente inexperientes, quando expostos à fêmea receptiva (incentivo sexual) e ao macho experiente (incentivo social), permaneciam mais tempo próximo às fêmeas. Quando as opções eram fêmeas receptivas e não receptivas, as primeiras seriam novamente as preferidas. Se fossem expostos a machos experientes e fêmeas não receptivas, nenhuma preferência era observada (AGMO, 2003).

Assim, para avaliação do efeitos da dexametasona sobre a motivação sexual de ratos machos, os Experimentos 3 e 4 foram destinados à análise dos efeitos agudos e crônicos, respectivamente, sobre ratos machos sexualmente inexperientes. É importante ressaltar que os dados obtidos mostram que a média de permanência dos animais do grupo controle agudo na ZI (zona de incentivo) da fêmea receptiva foi 1,89 vezes a mais do que na ZI do macho experiente; e que os animais do grupo controle crônico, permaneceram, em média, 1,86 vezes mais na ZI da fêmea em relação à ZI do macho. Portanto, de acordo com a literatura e com os resultados de Agmo (2003) descritos acima, os resultados obtidos com o grupo controle validam o método empregado em nosso laboratório para a avaliação da

motivação sexual de ratos machos sexualmente inexperientes tratados com dexametasona tanto aguda como cronicamente.

Em relação à administração aguda do fármaco, os parâmetros modificados pela administração do glicocorticóide exógeno relacionam-se à preferência pela fêmea e evidenciam aumento significativo da motivação sexual. Assim, os resultados sugerem que a administração aguda de dexametasona aumentaram a motivação sexual de ratos machos inexperientes, uma vez que o macho que recebeu o fármaco permaneceu mais tempo na ZIF, e portanto, teve maior escore de preferência pela fêmea em comparação aos controles. Aliado a isto, os animais DEXA permaneceram menor tempo na ZIM, onde observou-se também frequência de visitas menor.

Em contrapartida, a administração crônica de dexametasona não alterou significativamente nenhum dos parâmetros analisados, mostrando que não há influência sobre a motivação sexual. Entretanto, os resultados analisados se mostram concordantes com estudos clássicos, no qual se observa preferência pela fêmea.

Com o intuito de avaliar os níveis plasmáticos de corticosterona após a administração aguda e crônica de dexametasona, foi realizado o Experimento 5.

A dosagem hormonal dos animais que receberam dose aguda de dexametasona e foram submetidos ao Experimento 3 mostra uma diminuição significativa e acentuada dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos animais que receberam veículo. Esta diminuição foi mais acentuada nos animais que receberam a droga no esquema crônico e foram submetidos ao Experimento 4. Em conjunto, os resultados mostram que a dose de dexametasona administrada foi capaz de bloquear o Eixo HHA e suprimir a secreção endógena de CRH, ACTH e consequentemente de corticosterona.

No Experimento 6, dentre os vários parâmetros de performance sexual avaliados, podemos afirmar que a administração aguda de dexametasona melhorou parâmetros da performance sexual em relação aos animais tratados com veículo.

Temos como parâmetros capazes de refletir além da performance sexual, também a motivação sexual, o intervalo pós- ejaculatório (período refratário) e total de montas (AGMO, 1997), sendo que este último está aumentando nos animais que receberam dexametasona.

A LPMP e LPIP, representantes do período refratário, observados neste

estudo, estão dentro dos limites descritos, ou seja, entre 5 e 10 minutos (HULL et al, 2006). Estudos mostram que estes animais, sexualmente satisfeitos, são capazes de andar e de explorar o ambiente da mesma maneira que animais não sexualmente satisfeitos e, o mais interessante, é que são capazes de reiniciar prontamente a cópula quando expostos a uma nova fêmea receptiva, caracterizando o chamado “Efeito Coolidge” (RODRIGUEZ-MANZO, 1999). Este efeito não foi avaliado no presente estudo, uma vez que os ratos machos foram expostos durante toda a observação à mesma fêmea receptiva.

Em relação ao Experimento 7, podemos observar que a administração crônica de dexametasona não foi capaz de induzir diferenças comportamentais significativas em relação ao grupo controle.

A literatura mostra que a experiência sexual promove uma melhora quantitativa na performance sexual, principalmente sobre os parâmetros de motivação sexual considerados mais sensíveis ao aprendizado, que são a latência para primeira monta e para a primeira intromissão (CRUZ-CASALLAS, NASELLO e FELÍCIO; 2000). Não observamos diferença significativa entre os animais tratados com dexametasona, tanto aguda como cronicamente, e os animais controle. Isso pode ser atribuído ao fato de todos os grupos utilizados para análise da performance sexual serem compostos por animais sexualmente experientes. Com treinamento dos ratos machos e consequente aquisição de experiência sexual, otimizou-se a performance, o que permitiu uso racional dos animais, uma vez que a frequência de cópulas efetivas foi maior. Além disso, atingiu-se um padrão de semelhança dos grupos comprovados pela análise estatística em relação ao treinamento.

A avaliação de imunorreatividade neuronal à proteína Fos (Fos-IR) nos animais submetidos ao protocolo de performance sexual permite-nos observar que a administração aguda da dexametasona diminuiu o número de células imunorreativas a Fos no BST (**Figura 16**), no MnPO d (**Figura 16**) e no MnPOv (**Figura 16**) quando comparado aos animais que receberam salina. Além disso, o tratamento agudo com dexametasona diminuiu a expressão de c-Fos em neurônios do PVN (**Figura 17**) e no SON (**Figura 17**). Por outro lado, o tratamento não alterou a relação na MPOA (**Figura 17C**).

Nos animais que receberam tratamento crônico, observamos alteração significativa somente no SON (**Figura 19**), onde houve um aumento de células

positivas para Fos quando comparado aos animais do grupo controle.

O presente trabalho mostra coerência em relação a positividade para proteína Fos no encéfalo dos animais avaliados, uma vez que todos os grupos de animais apresentaram marcação nas mesmas áreas encefálicas, mesmo que com intensidades diferentes. Isso fala a favor de que os efeitos observados da droga são relacionados à frequência das células imunorreativas à Fos e que sua administração não foi capaz de inibir totalmente a expressão de Fos em nenhuma das áreas analisadas. .

As áreas cerebrais responsáveis pelo controle do comportamento sexual são alvo de grande interesse há muito tempo, porém mesmo com o uso de variadas técnicas neuroquímicas, ainda há muitas especulações sobre este controle. Estudos que avaliam a expressão de proteína Fos induzidas pelo acasalamento e satisfação sexual em áreas encefálicas de ratos machos, mostram imunorreatividade aumentada no BST, MPOA, NAc e no córtex piriforme, sendo as três primeiras consideradas essenciais para este comportamento (BAUM e EVERITT, 1992; GRECO et al, 1996; ROBERTSON et al, 1991; RODRIGUEZ-MANZO, 1999; PHILLIPS-FARFÁN e FERNÁNDEZ-GUASTI, 2007). Os resultados do presente estudo mostram-se concordantes com esses achados descritos na literatura, tanto em animais que receberam dexametasona aguda e cronicamente, como os animais que receberam salina, uma vez que observamos expressão de proteína Fos no córtex piriforme, BST e MPOA. Além disso, a ejaculação presente corrobora para os achados que indicam satisfação sexual, porém este parâmetro não foi analisado no presente estudo. É interessante ressaltar que uma vez que a saciedade sexual é um resultado de ejaculações repetidas, o circuito neural para a saciedade sexual pode ser semelhante ao que regula o comportamento sexual (PHILLIPS-FARFÁN e FERNÁNDEZ-GUASTI, 2007). Esse fato fala a favor da seleção de ratos já experientes como forma de padronizar os sujeitos e diminuir a expressão de Fos em áreas inespecíficas do encéfalo, otimizando a análise dos resultados. É importante ressaltar este fato, uma vez que vários estudos de performance são realizados em animais sexualmente inexperientes (“naives”). Por outro lado, o número de ejaculações é um fator capaz de influenciar a frequência de células imunorreativas a Fos (BAUM e EVERITT, 1992; PHILLIPS-FARFÁN e FERNÁNDEZ-GUASTI, 2007) associada a administração da droga, porém esta medida não foi analisada no

presente estudo devido ao número de sujeitos insuficientes para este tipo de abordagem.

Phillips-Farfán e Fernández-Guasti (2007) embasados em seus resultados associados à dados publicados por Petruslis e Eichenbaum (2003), sugerem que o córtex piriforme junto ao córtex entorrinal possuem papel regulatório sobre a saciedade sexual e sobre o Efeito Coolidge. Especulam que a expressão de c-Fos nestas regiões poderiam iniciar uma cascata que codifica a “memória sensorial” da parceira sexual durante o acasalamento (PETRULIS e EICHENBAUM, 2003). De acordo com essa idéia, a expressão de Fos aumentaria durante fases iniciais do acasalamento, quando esta memória estaria se consolidando, e diminuiria com a satisfação sexual, voltando a aumentar na reativação do comportamento em machos sob efeito Coolidge. É interessante ressaltar que odores sexualmente condicionados podem ativar a expressão de proteína Fos no córtex piriforme (KIPPIN et al, 2003), conferindo a esta área mais uma evidência de que é relacionada à experiência sexual e que o aprendizado pode modular a memória olfativa (PHILLIPS-FARFÁN e FERNÁNDEZ-GUASTI, 2007). Nossos achados são condizentes com estes estudos, uma vez que os animais sexualmente experientes não apresentaram diferença na frequência de células positivas para Fos no córtex piriforme.

Diante da expressão de proteína Fos em áreas responsáveis pela produção de Ocitocina, como o PVN e o SON é importante ressaltar o papel deste hormônio no macho e especular sobre seus efeitos regulatórios sobre o comportamento sexual em condições de estresse (BURBACH, YOUNG e RUSSEL, 2006). Nos ratos, a ocitocina é um hormônio de estresse, uma vez que sua expressão está aumentada em situações diversas, como inflamação (NAITO, FUKATA e SHINDO, 1991), estresse emocional e sob o estímulo do eixo HHA (ONAKA, 1995; MIYATA, ITOH e LIN, 1995; HASHIGUCHI et al, 1997; BURBACH, YOUNG e RUSSEL, 2006). Lembrando que o aumento de ocitocina pelo estresse durante a gravidez é capaz de antecipar o trabalho de parto. No entanto, a literatura atual é coerente, e os estudos em ratos demonstraram que há mecanismos poderosos capazes de inibir o esse estresse ocitocina-dependente na gravidez. Se estes mecanismos estão sobrecarregados, então o parto poderia ser desencadeado, dada a sensibilidade miometrial à ocitocina (BURBACH, YOUNG e RUSSEL, 2006). No puerpério, as fêmeas lactantes podem expressar duas motivações opostas simultaneamente, ou

seja, o comportamento agressivo e o sexual. Em estudos com animais, motivações apetitivas e aversivas são muitas vezes vistas como opostas, ou simplesmente: positiva ou negativa (LANG, BRADLEY e CURTHBERT, 1990). No entanto, os resultados de Agrati e colaboradores (2011) revelam que a fêmea pode perceber o macho como atraente e aversivo ao mesmo tempo, exibindo opostas respostas motivacionais (AGRATI et al, 2011).

Nos machos, a função da ocitocina não tem sido extensivamente estudada como nas fêmeas. No entanto, sabe-se que nos machos, a oxitocina liberada periféricamente afeta a genitália e a liberação de sêmem, ao passo que a oxitocina liberada centralmente modula a expressão do comportamento sexual, bem como as aferências simpática e parassimpática para órgãos reprodutivos (BURBACH, YOUNG e RUSSEL, 2006). Estudos comprovam o importante papel da ocitocina sobre o comportamento sexual de ratos machos, sendo o PVN a área do cérebro mais sensível para a indução de ereção peniana por este neuropeptídeo (ARGIOLAS e MELIS, 2005; BURBACH, YOUNG e RUSSEL, 2006). No presente estudo, temos o aumento dos níveis de glicocorticóides através da administração exógena e consequente inibição do HHA por *feed back* negativo associados à expressão de proteína Fos em áreas responsáveis pela produção de ocitocina e à presença de ejaculações, possibilitando assim especulações sobre a ação deste neuropeptídeo na modulação do comportamento sexual de ratos machos. Porém seria necessário associar técnicas de dupla-marcação para Fos e ocitocina, bem como dosagem sérica deste peptídeo para completar o raciocínio.

Além da função da ocitocina como peptídeo neuromodulador de vários comportamentos, temos que ela potencializa o efeito do CRH, que além de atuar na integração do processo adaptativo ao estresse, é mediador das repostas autonômica, comportamental e imune. Sawchenko demonstrou em 1987 que após a adrenalectomia, há um reforço na imunorreatividade de células ao CRH e à vasopressina, o que em estudos recentes confirmou-se pela colocalização destes hormônios em uma população substancial de neurônios secretores parvocelulares. Esse aumento não foi restrito ao PVN, mas abrangeu outras áreas cerebrais, como córtex cerebral, amígdala e núcleo intersticial da estria terminal. A hipofisectomia produziu um padrão de coloração no PVN, comparável à adrenalectomia, confirmando o papel dos esteróides adrenais como reguladores primários destes

peptídeos neste sistema (SAWCHENKO, 1987; ANTONI, 1993).

Gorsalka, Morrish e Hill (2008) mostram que antagonistas do CB1, um receptor canabinóide, facilitam processos ejacutórios (GORSALKA, MORRISH e HILL, 2008). Uma possível explicação para este achado seria que a predominante ação inibitória dos glicocorticóides nos neurônios magnocelulares é fundamentada através da liberação de endocanabinóides no hipotálamo estimulada pela ação destes glicocorticóides sobre receptores transmembrana acoplados à proteína G (DI et al., 2003; DI et al., 2005). Uma vez liberados, os endocanabinóides teriam função de mensageiros retrógrados que além de inibir a liberação de glutamato, também estimulariam a liberação de GABA (ácido γ -aminobutírico) promovendo assim a diminuição da atividade de neurônios hipotalâmicos parvocelulares e magnocelulares (RUGINSK et al., 2009; RUGINSK et al., 2010). Para comprovar esta teoria seriam necessários novos experimentos com a utilização de antagonistas e agonistas dos endocanabinóides, bem como antagonistas dos glicocorticóides.

Aqui é importante ressaltar que por ser medida indireta da atividade neuronal, a imunistoquímica para Fos é capaz de mostrar expressão desencadeada por vários estímulos, como odores, barulhos, luminosidade. Sendo assim, é imprescindível que os animais dos diferentes grupos animais sejam submetidos às mesmas condições de manipulação, a fim de diminuir a influência externa nos resultados. Em contrapartida, a expressão de proteína Fos reflete atividade genômica e não necessariamente despolarização neural (HOFFMAN e MURPHY, 2000).

Conscientes de que a quantidade total de proteína Fos presentes no tecido não tem correlação direta com a variabilidade da intensidade de marcação (SITA e BITTENCOURT, 2007), assumimos uma desvantagem inerente ao método de imunistoquímica, porém tranquilos com o fato de que este trabalho cumpriu seu objetivo de mapear as áreas cerebrais ativadas por esse comportamento e comparar o número de células imunorreativas a esta proteína, capacidade efetiva e contemplada pelo método. Ressaltando que para análise de quantificação da intensidade de marcação, seria necessário lançar mão de técnicas sofisticadas, como hibridização *in situ* ou mesmo *Western blot*, porém esta última não permite a preservação da estrutura anatômica (SITA e BITTENCOURT, 2007).

Nossos achados referentes a diminuição de expressão de proteína Fos nos

animais que receberam dexametasona condizem com a literatura. Temos que a dexametasona foi capaz de reduzir a expressão de c-Fos em neurônios magnocelulares do PVN e SON em ratos machos submetidos à expansão de volume sanguíneo e estimulação colinérgica central, além disso, promoveu supressão na secreção de ocitocina (RUGINSK et al., 2007; LAUAND et al., 2007). Da mesma maneira, em projeto desenvolvido em nosso laboratório, foi observado que o tratamento agudo com a dexametasona reduziu o número de células positivas para c-Fos na BST, no MnPOd e MnPOv e, diminuiu o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON em ratas lactantes, quando comparadas ao grupo controle (VILELA, 2011). Assim, podemos inferir que a dexametasona pode promover uma modulação inibitória nestas áreas. Os achados comportamentais de otimização da performance sexual após administração aguda de dexametasona aliados a diminuição de expressão de proteína Fos em áreas sabidamente relacionadas ao comportamento sexual, como BST, MnPO d e SON, trazem a tona a hipótese de que essas áreas podem modular negativamente o comportamento sexual e que quando inibidas pela dexametasona, facilitam este comportamento.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, concluímos que a administração aguda de dexametasona aumentou a motivação sexual em ratos machos sexualmente inexperientes. Além disso, a dexametasona aguda melhorou parâmetros da performance sexual às custas de diminuição da atividade neuronal em áreas hipotalâmicas relacionadas ao controle neuroendócrino em ratos machos sexualmente experientes. Assim, nossos resultados sugerem que a administração aguda de dexametasona promove *upregulation* sobre mecanismos relacionados ao comportamento sexual através da supressão do eixo HHA, que pode estar relacionado à inibição de áreas contra-regulatórias deste comportamento.

Os resultados mostram também que a administração crônica de dexametasona, apesar de promover discretas alterações neuroquímicas, não foi capaz de alterar o comportamento sexual dos ratos machos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, N. T; TONER, J. P. The effects of copulatory behavior on sperm transport and fertility in rats. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 474, p. 21–32, 1986.

AGMO, A. Male sexual behavior (Protocol). **Brain Research Protocols**, v. 1, p. 203-209, 1997.

AGMO, A. Sexual motivation—an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 105, p. 129–150, 1999.

AGMO, A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway Rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 117, n. 1, p.3–14, 2003.

AGMO, A. an incentive motivacional framework and the description of sexual behaviors. In: AGMO, A. **Functional and Dysfunctional Sexual Behavior. A Synthesis of Neuroscience and Comparative Psychology**, 1. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, cap.2, p. 30-75, 2007.

AGRATI, D.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; FERREÑO, M.; FERREIRA, A. Coexpression of sexual behavior and maternal aggression: the ambivalence of sexually active mother rats toward male intruders. **Behav Neurosci**, v. 125, n. 3, p.

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 15, p. 321-350, 1994.

ALVARENGA, T. A.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Influence of progesterone on sexual performance in male rats. **J. Sex.Med.**, v. 7, p. 2435-2444, 2010.

ANTONI, F. A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 14, p. 76–122, 1993

ARGIOLAS, A. Neuropeptides and sexual behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 1127–1142, 1999.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M. R. Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of hypothalamus. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n.1, p. 1-21, 2005.

BAUM, M.J.; EVERITT, B.J. Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. **Neuroscience**.v. 50, p. 627-46, 1992.

BIALY, M.; KACZMAREK, L. *C-fos* expression as a toll to search for the neurobiological base of the sexual behavior. **Acta Neurbiologiae Experimentalis**. v. 56, p. 567-577, 1996.

BOLAND, E.W. Clinical observations with 16 alpha-methyl corticosteroid compounds; preliminary therapeutic trials with dexamethasone (16 alpha-methyl 9 alpha-fluoroprednisolone) in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v.17, n.4, p.376-82, 1958.

BÓKONY, V.; LENDVAI, A. Z.; LIKER, A. et al. Stress response and the value of reproduction: are birds prudent parents? **Am Nat.**, v. 173, p. 589-598, 2009.

BURBACH, J. P.; YOUNG, L. J.; RUSSEL, J. A. Oxytocin: Synthesis, Secretion, and Reproductive Functions. In: KNOBIL, E. and NEILL, J. D. (Eds.), **The Physiology of Reproduction**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press. c. 58, p. 3055-3128, 2006.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the ventral premammillary nucleus. **J Comp Neurol**, v. 324, p. 195-212, 1992.

CATANZARO, D.; GORZALKA, B. B. Effects of dexamethasone, corticosterone, and ACTH on lordosis in ovariectomized and adrenalectomized-ovariectomized rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.12, p. 201-206, 1980.

CAVALCANTE, J. C.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. **Physiol Behav.**, v. 88, p.160-6, 2006.

CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; FELÍCIO, L. F. A Quantitative analysis of the role of experience in the regulation of sexual behavior in male rats. **Psychobiology**, v. 28, p. 406-410, 2000.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; CASIO, C. S.; DARLINGTON, D. N.; JACOBSON, L.; LEVIN, N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. **Recent Prog Horm Res**, v. 43, p. 113-73, 1987.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; SCRIBNER, K. A., BRADBURY, M. J.; WALKER, C. D.; STRACK, A. M.; CASIO, C. S. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. **J. Neuroendocrinol.**, v. 4, p. 517-526, 1992.

DeBOLD, C. R.; SHELDON, W. R.; DeCHERNEY, G. S.; JACKSON, R. V.; ALEXANDER, A. N.; VALE, W.; RIVIER, J.; ORTH, D. N. Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor. **J. Clin. Invest.**, v. 73, n. 2, p. 533-538, 1984.

De KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOELS, M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. **Cell Mol Neurobiol.**, n 13, p. 433-55, 1993.

DI, S.; MALCHER-LOPES, R.; HALMOS, K. C.; TASKER, J. G. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. **J. Neurosci.**, n. 23, p. 4850-4857, 2003.

DI, S.; MALCHER-LOPES, R.; MARCHESSELLI, V. L.; BAZAN, N. G.; TASKER, J. G. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation to glutamate and γ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. **Endocrinology**. v.146, p. 4292-4301, 2005.

DOMINGUEZ, J., HULL, E. M. Stimulation of the medial amygdala enhances preoptic dopamine release: implications for male sexual behavior. **Brain Res.**, v. 917, p. 225-229, 2001.

DOMINGUEZ, J., RIOLO, J. V., XU, Z., HULL, E. M. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 349-355, 2001.

DOMINGUEZ, J. M., HULL, E. M. Medial amygdala regulates mating-induced dopamine release in medial preoptic area. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 985, p. 515-518, 2003.

DONATO, J. JR.; CAVALCANTE, J. C.; SILVA, R. J.; TEIXEIRA, A. S.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. **Physiol Behav.**, v. 99, n. 1, p. 67-77, 2010.

DURLO, F. V.; CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Exp. Physiol.**, n. 89, v. 5, p.541-8, 2004.

EVANSON, N. K.; TASKER, J. G.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J.; HERMAN, J. P. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. **Endocrinology**, v. 151, p. 4811-4819, 2010.

FERGUSON, J. N.; ALDAG, J. M.; INSEL, T. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8278-8285, 2001.

FLEMING, A. S.; WALSH, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. *Psychoneuroendocrinology*. 19:429-443. 1994.

FOOTE, S. L.. Locus coeruleus. In:Adelman G & Smith BH (Editors), **Encyclopedia of Neuroscience**. New York: Elsevier, p. 1062-1063,1999.

GILLIES, G.; LOWRY, P. J. Corticotrophin releasing factor may be modulated by vasopressin. **Nature**, v. 278, p. 463-464,1979.

GOMEZ, F.; HOUSHYAR, H.; DALLMAN, M. F. Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 2852-62, 2002.

GRECO, B.; EDWARDS, D. A.; MICHAEL, R. P.; CLANCY, A. N. Androgen receptor immunoreactivity and mating-induced Fos expression in forebrain and midbrain structures in the male rat. **Neuroscience**, v. 75; p. 161-71, 1996.

GRUNFLED, J. P. Glucocorticoids in blood pressure regulation. **Horm. Res.**, v. 34, p. 111-113, 1990.

HALPERN, M.; MARTINEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Prog Neurobiol.**, v. 70, p. 245-318, 2003.

HART, F.D. Dexamethasone. **Postgrad Med J**.v. 36, p.26-7, 1960.

HASHIGUCHI, H.; YE, S. H.; MORRIS, M.; ALEXANDER, N. Single and repeated environmental stress: effect on plasma oxytocin, corticosterone, catecholamines, and behavior. **Physiol. Behav.**, v. 61,p. 731–736, 1997.

HILLEGAART, V.; ALSTER, P.; UVNÄS-MOBERG, K.; AHLENIUS, S. Sexual motivation promotes oxytocin secretion in male rats. **Peptides**, v. 19, n. 1, p.39-40, 1998.

HINSON, J. P. Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla? **J Endocrinol.**, v. 124, p. 7-9, 1990.

HOFFMAN, G. E.; MURPHY, A. Z. Anatomical markers of activity in hypothalamic systems. In: CONN, P. M.; FREEMAN, M. F. (Eds.). **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. New Jersey: Humana Press. p.541-52, 2000.

HULL, E. M.; MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. Male sexual behavior. In: PFAFF, D. W, ARNOLD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T.(Eds.) **Hormones, Brain and Behavior**. San Diego: Academic Press. p.3–137, 2002.

HULL, E. M.; WOOD, R. I.; MCKENNA, K. E. Neurobiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E. and NEILL, J. D. (Eds.), **The Physiology of Reproduction**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press. c. 33, p. 1729-1824, 2006.

JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitaryadrenocortical axis regulation. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 34, p. 271–292, 2005.

KERR, L. K.; KERR, L. D. Screening tools for depression in primary care: the effects of culture, gender, and somatic symptoms on the detection of depression. **West J Med.**, v 175, n 5, p. 349-52, 2001.

KIPPIN, T. E.; CAIN, S. W.; PFAUS, J. G. Estrous odors and sexually conditioned neutral odors activate separate neural pathways in the male rat. **Neuroscience**, v. 117, p. 971-9, 2003.

LANG, P. J.; BRADLEY, M. M.; CUTHBERT, B. N. Emotion, attention, and the startle reflex. **Psychological Review**, V. 97, P. 377-395, 1990.

LAUAND, F.; RUGINSK, S. G.; RODRIGUES, H. L.; REIS, W. L.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. **Neuroscience**. n. 147, v. 1, p. 247-57, 2007.

LOPEZ, H. H.; ETTEBERG, A. Exposure to female rats produces differences in c-fos induction between sexually naïve and experienced male rats. **Brain Res**. n. 947, p.57–66, 2002.

LUMLEY, L. A.; HULL, E. M. Effects of a DI antagonist and of sexual experience on copulation-induced Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic nucleus. **Brain Res**. v.829, p.55–68,1999.

MAEDA, K.; TSUKAMURA, H. The impact of stress on reproduction: are glucocorticoids inhibitory or protective to gonadotropin secretion? **Endocrinology**, n. 147, v. 3, p. 1085–1086, 2006.

MARQUES-DEAK, A., CIZZA, G.; STERNBERG, E. Brain-immune interactions and disease susceptibility. **Mol. Psychiatry**, v. 10, p. 239–250, 2005.

MARQUEZ, S. R.; SALAZAR, E. D.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21,n. 1, p. 39-50, 1996.

MAS, M.; FUMERO, B.; FERNANDEZ-VERA, J. R.; GONZALEZ-MORA, J. L. Neurochemical correlates of sexual exhaustion and recovery as assessed by in vivo microdialysis. **Brain Res**., v. 675, p. 13-9, 1995.

MCCANN, S. M.;ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KARANTH, S. ; RETTORI, V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1121-1131, 2000.

MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. The physiology of male sexual behavior. In: E. Knobil, and J. D. Neill (Eds). **Physiology of Reproduction**. New York : Raven Press. p. 3–106, 1994.

MIYATA, S.; ITOH, T.; LIN, S. H; et al. Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress. **Brain Res. Bull**. v. 37, p. 391–395, 1995.

NAITO, Y.; FUKATA, J. SHINDO, K.; et al. Effects of interleukins on plasma arginine vasopressin and oxytocin levels in conscious, freely moving rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 174, p. 1189–1195, 1991.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DiLEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.

ONAKA, T. Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 16, p. 308–312, 2004.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3th ed. San Diego: Academic Press; 1997.

PETRULIS, A.; EICHENBAUM, H. The perirhinal- entorhinal cortex, but the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect. **Neuroscience**, v. 122, p. 599-607, 2003.

PHILLIPS-FARFÁN, B.V.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. **Physiology & Behavior**, v. 91,p. 609–619, 2007.

PORTER, D. W.; LINCOLN, D. W; NAYLOR, A. M. Plasma cortisol is increased during the inhibition of LH secretion by central LHRH in the ewe. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 6, p. 705-12, 1990.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PURVIS, K.; HAYNES, N. B. Effect of the odor of female rat urine on plasma testosterone concentrations in male rats. **J Reprod Fertil**, v. 53, p 63-5, 1978.

RENATA-MARQUEZ, S.;BONILLA-JAIME, H.;VELAZQUEZ-MONTEZUMA, J. Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. **Physiol.Behav.**, v.63, n. 3, p.367-70, 1998.

REUL, J. M.; De KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology.**, v. 117, p. 2505-2511, 1985.

RIVIER, C. L.; PLOTSKY, P. M. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenyhypophysial hormone secretion. **Annu Rev Physiol.**, v. 48, p. 475-94, 1986.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol Reprod.**, v. 45, n. 4, p. 523-32, 1991.

ROBERTSON, G. S.; PFAUS, J. G.; ATKINSON, L. J.; MATSUMURA, H.; PHILLIPS, A. G.; FIBIGER, H. C. Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. **Brain Res.**, v. 564, p. 352-7, 1991.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B. **Interferência da moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais.** 2007.73f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento)- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RODRIGUEZ-MANZO, G.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. **Behav Brain Res.** v. 62, p.127-134, 1994.

RODRIGUEZ-MANZO, G. Blockade of the establishment of the sexual inhibition resulting from sexual exhaustion by Coolidge effect. **Behav Brain Res.**, v. 100, p. 245-54, 1999.

RUGINSK, S. G.; OLIVEIRA, F. R.; MARGATHO, L. O.; VIVAS, L.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. **Exp Neurol.**, v. 206, n. 2, p. 192-200, 2007.

RUGINSK, S. G. et al. Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 61–67, 2009.

RUGINSK, S. G. et al. CB(1) modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression following extracellular volume expansion. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 114-22, 2010.

SAPHIER, D.; FELDMAN, S. Iontophoresis of cortisol inhibits responses of identified paraventricular nucleus neurones to sciatic nerve stimulation. **Brain Res.**, v. 535, n.1, p. 159-162, 1990.

SAWCHENKO, P. E.; Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. **J Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 1093-106, 1987.

SCHIMMER, B. P.; PARKER K. L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. p. 1433-1457, 2006.

SITA, L. V.; BITTENCOURT, J.C. Imunoistoquímica. In: BITTENCOURT, J.C; ELIAS, C. F. **Métodos em neurociências**. 1ed. São Paulo: Rocca. p.57-80, 2007.

TILBROOK, A. J.; TURNER, A. I.; CLARKE, I. J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Rev Reprod.**, v. 5, n. 2, p. 105-13, 2000.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n 1, p. 103-11, 1970.

VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. **J Neuroendocrinol.**, v. 14, n. 6, p.506-13, 2002.

VILELA, F.C. et al. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 325-327, 2009.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**. v. 152, n. 12, p. 4838-45, 2011.

VILELA, F. **Endocanabinóides modulam os efeitos inibitórios dos glicocorticóides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação.**2011.134f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

WALTON, CH. Clinical experience with dexamethasone. **Can Med Assoc J.** v.1, n. 81, p. 724-6, 1959.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **J Neuroendocrinol**, v. 15, p.711-724, 2003.

YANG, S.; ZHANG, L. Glucocorticoids and vascular reactivity. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 2, p. 1-12, 2004.

YOUNG, E. A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S. L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 25, p. 69-76, 2004.