

ANDREA MICHIELIN DELLA COLLETA

**EIXO HIPOTÁLAMO - HIPÓFISE – ADRENAL E SECREÇÃO
DE VASOPRESSINA E OCITOCINA EM RATOS
SUBMETIDOS À ADRENALECTOMIA E AO ESTRESSE
DE IMOBILIZAÇÃO.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção de título de Mestre
em Ciências Médicas, área de concentração Ciências
Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARGARET DE CASTRO

CAMPINAS

2000

UNIDADE Be
 L. CHAMADA: 77 UNICAMP
2.533.2
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 44085
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 25/04/01
 N.º CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

CM-00154700-1

C688e Colleta, Andrea Michelin Della
 Eixo hipotálamo – hipófise – adrenal e secreção de vasopressina e
 ocitocina em ratos submetidos à adrenalectomia e ao estresse de
 imobilização / Andrea Michelin Della Colleta. Campinas, SP : [s.n.],
 2000.

Orientador : Margaret de Castro
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

1. Vasopressina. I. Margaret de Castro. II. Universidade Estadual
 de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Margaret de Castro

Membros:

1. Profa. Dra. Lucila Leico K. Elias - *Lucila Leico K. Elias*

2. Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes - *Gilberto D'Assunção Fernandes*

3. Profa. Dra. Margaret de Castro - *Margaret de Castro*

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18.10.2000

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz e Maria Izabel, pelo apoio irrestrito que sempre me deram no decorrer do meu trabalho.

À minha irmã Cláudia, meu cunhado Eduardo e meus sobrinhos, Caio e André, pela hospedagem e incentivo, durante todo o tempo em que permaneci em Ribeirão Preto.

Ao meu marido Nelson, que com muito amor e carinho, entendeu e deu apoio às minhas ausências de casa.

À todos vocês, minha eterna gratidão e carinho, pois sem a força e compreensão dada, nada teria sentido.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por que é só através dele que podemos realizar nossas tarefas. Ele é que nos dá forças quando achamos que o impossível chegou.

À minha orientadora, Dra. Margaret, obrigada por me receber em seu laboratório e pela oportunidade de aprender cada dia algo novo e pela boa convivência nesse tempo todo.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da USP, Marina, Valci, Flávia, Natália, Vagner e Fernando, o meu muito obrigada pela colaboração nas dosagens realizadas no laboratório.

À Prof. Dra. Lucila, pelo auxílio na montagem da tese e pela revisão criteriosa da mesma, agradeço sua ajuda.

Às amigas Theresa e Silvinha pela amizade e preciosa ajuda na elaboração e montagem desse trabalho.

À Adriana, Mara, José Roberto e Débora, pelas dosagens realizadas, no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

À Paula pela preciosa ajuda, quando da montagem dos gráficos e tabelas.

Ao Prof. Dr. Gilberto A Fernandes pela leitura criteriosa e sugestões para a elaboração final da tese.

Ao pessoal do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, da Unicamp, pela ajuda com os animais, especialmente ao Roberto e Jamilson, e à Emico, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, Cíntia, Laurione, Davi, Rosa, Beth, Floriza, pelo apoio e amizade dedicados.

Aos meus companheiros de mestrado, especialmente à Mônica e ao Alexandre pelo ótimo tempo de convivência e pela amizade.

Aos meus amigos de Araras, que muito me apoiaram nesta Jornada em especial ao Prof. Ronilson Moreno, pela amizade e colaboração nesse trabalho, e ao Prof. Alcyr José Matthiensen , meu companheiro de muitas viagens para Campinas, o meu muito obrigada.

	PÁG.
RESUMO.....	x
INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	41
SUMMARY.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO.....	72

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela I: Média (X) e erro padrão da média (EPM) dos valores de corticosterona plasmática B (ug/dl), ACTH plasmático (pg/ml), AVP plasmática (pg/ml), OT plasmática (pg/ml) e osmolalidade plasmática (mOsm/kg), em animais do grupo basal, após diferentes períodos de ADX ou ADX-S.....	31
Tabela II: Média (X) e erro padrão da média (EPM) dos valores de corticosterona plasmática B (ug/dl), ACTH plasmático (pg/ml) e AVP plasmática (pg/ml), de animais controle, ADX-S e ADX, submetidos ao estresse de imobilização, após diferentes tempos de cirurgia.....	34

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Concentração plasmática de corticosterona (B), em ug/dl, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 1A, condição basal; 1B, submetido ao estresse.....	36
Figura 2: Concentração plasmática de ACTH, em pg/ml, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 2A, condição basal; 2B, submetido ao estresse.....	37
Figura 3: Concentração plasmática de vasopressina (AVP), em pg/ml, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 3A, condição basal; 3B, submetido ao estresse.....	38
Figura 4: Concentração plasmática de ocitocina (OT) em pg/ml, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias).....	39
Figura 5: Valores de osmolalidade plasmática (pOsm) em mOsm/kg, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias), em condição basal.....	40

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

O CRH é o principal regulador da secreção de ACTH e coordenador da resposta endócrina, autonômica, comportamental e imune ao estresse, estando presente no sistema hipotálamo-hipofisário, além de outras regiões do sistema nervoso central e órgãos periféricos. A divisão parvicelular do núcleo paraventricular (NPV) contém e libera além do CRH, vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). Estes hormônios estão co-localizados em muitos dos grânulos neuro-secretórios no NPV, além de se localizarem nos neurônios do sistema magnocelular, cujos corpos celulares estão no núcleo supra-óptico (NSO).

A adrenalectomia (ADX) induz alterações no eixo HHA de grande magnitude e duração. AVP e OT têm atraído um particular interesse em resposta à ADX e a uma variedade de agentes estressores. Estes peptídeos chegariam ao sistema porta-hipofisário e à hipófise posterior através dos vasos portais, promovendo dessa forma uma ligação entre o sistema hipotalâmico neuro-hipofisário e o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal. No presente estudo avaliamos a concentração destes peptídeos em animais submetidos a diferentes períodos (3h, 1,3, 7 e 14 dias) de ADX-S ou ADX. Investigamos, também, a resposta desses animais ADX ao estresse de imobilização, para caracterizar as possíveis alterações da capacidade secretória de AVP e OT, na regulação da secreção de ACTH sob estas condições experimentais.

Nos animais ADX, a corticosterona permaneceu indetectável, enquanto nos animais ADX-S observamos um importante aumento nas concentrações de B e de ACTH após 3h da cirurgia, que retornaram rapidamente aos níveis do controle, sugerindo uma resposta ao estresse anestésico, cirúrgico e à dor, nesses animais com o eixo HHA íntegro. Nos animais ADX, a concentração plasmática de ACTH apresentou elevação após 3h da ADX, seguida por diminuição no 1º dia; a partir do 3º dia apresentou um lento e progressivo aumento até a estabilização em valores cerca de 10 vezes maiores que o controle. Estes eventos, após diferentes períodos de ADX, resultam nesta curva trifásica, refletem a resposta ao estresse e a influência da inibição do feedback. Não houve diferença significativa dos valores de AVP nos animais submetidos a diferentes períodos de cirurgia ADX-S e ADX. Portanto, os diferentes períodos de ADX não modificaram a liberação de AVP plasmática, cuja principal fonte são os neurônios magnocelulares, sugerindo que estes neurônios não são fundamentais na manutenção da secreção de ACTH, após a ADX. Os

valores de OT nos animais do grupo ADX-S após 3 horas de cirurgia, e nos grupos ADX, após 3 horas e 1 dia da ADX foram maiores que os do grupo controle. Os grupos ADX 3h e 1d apresentaram valores de OT maiores que os dos respectivos grupos ADX-S. Estes resultados confirmam que a OT é um hormônio responsivo ao estresse induzido por alguns estímulos, incluindo a inalação de éter. No entanto, quando comparamos o grupo ADX-S com o grupo ADX as concentrações deste último foram mais elevadas, sugerindo que a elevação de OT pode ser secundária à alterações no eixo HH ocorridas após ADX além do estresse.

Os animais ADX-S apresentaram elevação de B e ACTH, após estresse de imobilização em todos os períodos. Entretanto, não houve resposta do ACTH ao estresse de imobilização, em nenhum dos períodos após ADX estudados, pois estes animais já apresentavam valores elevados de ACTH antes do estímulo de estresse. Mais uma vez, não houve liberação de AVP frente ao estresse de imobilização, tanto no grupo ADX-S como no grupo ADX, em nenhum dos períodos estudados. Concluindo, há diferentes pontos de ajuste do eixo HHA, dependendo do período da retirada do mecanismo de retro-alimentação negativa. O papel dos principais neuro-hormônios periféricos na secreção de ACTH secundária à ADX ou ao estresse parecem diferir, enquanto a AVP periférica parece não participar na liberação de ACTH frente à ADX e ao estresse de imobilização, a OT, um hormônio responsivo ao estresse, parece contribuir para a secreção de ACTH, durante a fase inicial da resposta à ADX.

INTRODUÇÃO

Eustáquio descobriu as glândulas adrenais há quase 500 anos atrás, porém o controle do córtex adrenal permaneceu desconhecido até 1927, quando Smith demonstrou que a remoção da hipófise, no rato, resultava em atrofia adrenocortical. Em 1936, Selye notou que ratos expostos a estresse apresentavam adrenais aumentadas. Em 1948, Sayers & Sayers demonstraram o efeito regulatório da hipófise em estimular extratos adrenocorticais. No final da década de quarenta, já se acumulavam evidências de que o sistema nervoso central, especialmente o hipotálamo, influenciava a atividade neuro-secretória da hipófise anterior (HA).

As primeiras comprovações da existência do fator liberador da corticotrofina (CRF) foram divulgadas por Saffran e Schally, 1955, seguidas por Guillemin & Rosemberg em 1955, que demonstraram ser o extrato de hipotálamo capaz de liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), em tecido hipofisário, "in vitro". Entretanto, foi somente em 1981 que Vale et al., conseguiram isolar e caracterizar quimicamente o hormônio liberador da corticotrofina ovino (oCRH), uma molécula com 41 aminoácidos, que difere do CRH do rato e do humano (r/h CRH) por apenas 7 resíduos de aminoácidos.

O CRH é o principal coordenador da resposta endócrina, autonômica, comportamental e imune ao estresse. Este peptídeo foi inicialmente caracterizado no sistema hipotálamo-hipofisário, entretanto, está largamente distribuído através do sistema nervoso central (SNC) e em múltiplos órgãos periféricos (Orth, 1992.), incluindo placenta, medula adrenal, pâncreas, pulmões, estômago, além de células imunológicas e do sistema inflamatório (Crofford et al., 1992; Karalis et al., 1991). As ações do CRH são mediadas através de receptores de membrana de alta afinidade (CRH-R), os quais acoplados ao nucleotídeo guanina da proteína G estimulatória (Gs) traduzem seu sinal através da estimulação da produção de cAMP (Guigueri et al., 1982).

Recentemente, o gene do CRH-R humano foi isolado e clonado de bibliotecas genômicas de diferentes regiões do cérebro humano (Chen et al., 1993; Liaw et al., 1995) e o gene do CRH-R de rato também foi isolado e clonado de cérebro destes animais (Perrin et al., 1993). Em humanos e em ratos existem dois subtipos de receptores do CRH (CRH-R1 e CRH-R2) cujas seqüências do cDNA divergem significativamente na região 5'. Apresentam, ainda, diferentes localizações no cérebro e diferentes perfis farmacológicos,

com o subtipo CRH-R2 apresentando menor afinidade pelo CRH e sauvagina do que o CRH-R1 (Lovenberg et al., 1995). No rato, o subtipo CRH-R2 apresenta 2 isoformas (CRH-R2 α e CRH-R2 β) produzidas por um *splicing* alternativo do gene, e estas duas isoformas apresentam distribuição distinta nos tecidos (Perrin et al., 1993; Lovenberg et al., 1995).

No hipotálamo de ratos, os sítios de ligação do CRH têm sido descritos no núcleo dorso medial, núcleo arqueado e área pré-óptica, onde parecem influenciar a regulação da secreção de gonadotrofinas e do hormônio de crescimento. Por outro lado, a presença de receptores do CRH no núcleo paraventricular (NPV), a principal fonte hipotalâmica de CRH, não é muito clara. O NPV apresenta interconexões com outros núcleos hipotalâmicos, como a amígdala, locus cerúleo e o núcleo do trato solitário, a ativação dos receptores do CRH nestas áreas parece influenciar a função do NPV. Recentemente, foi demonstrado que frente à exposição a alguns paradigmas de estresse, tais como imobilização aguda ou repetida, estimulação osmótica por privação de água e injeção de salina hipertônica, há indução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) CRH-R no NPV de forma estresse específica (Luo et al., 1994).

A divisão parvicelular do NPV contém e libera além do CRH, a vasopressina (AVP). Estes hormônios estariam co-localizados em muitos dos grânulos neuro-secretórios. Entretanto, cerca de 60% dos terminais imunorreativos ao CRH parecem não conter vasopressina, no rato normal. Possivelmente, haveria duas populações de neurônios CRH cujas atividades poderiam ser independentemente reguladas por diferentes estímulos estressores (Whitnall, 1993). Um outro trajeto neuronal hipotalâmico que transporta AVP à EM é a clássica via neuro-secretória do sistema magnocelular, cujos corpos celulares estão no núcleo supra-óptico (NSO) e no NPV; seus axônios trafegam pela camada interna da EM e se dirigem à hipófise posterior (Sawchenko et al., 1985, Antoni, 1986).

Outro aspecto de fundamental importância no controle da regulação do eixo HHA é aquele exercido pelos glicocorticóides através da retroalimentação (feedback) negativa. Este é, quantitativamente, o aspecto mais proeminente na regulação do eixo adrenocortical. Está bem estabelecido que a injeção de glicocorticóides, segundos antes da

administração de um estímulo adequado, inibe o aumento do ACTH no plasma. Após 10-12 minutos, a ação inibitória é demonstrável e este fenômeno é chamado feedback de resposta rápida. Uma a duas horas após, a liberação de ACTH está novamente supressa, sendo esta a fase inicial do feedback de resposta lenta ou de resposta intermediária. Uma terceira fase ocorre após 24 horas da administração do corticosteróide (Keller-Wood & Dallman, 1984).

Com o desenvolvimento de análogos dos glicocorticóides, das técnicas de imunohistoquímica e de biologia molecular foi possível determinar a existência de diferentes receptores para os corticosteróides no SNC (Kloet et al., 1987). Estes são distintos em topografia, afinidade de ligação, especificidade e cinética. No rato, o tipo 1, sítio preferencial para corticosterona ou receptor mineralocorticóide, é responsável pela ação permissiva da corticosterona no comportamento e no controle neuro-endócrino da secreção basal. Através de receptores sítio preferencial para dexametasona ou receptor dos glicocorticóides, os receptores de corticosteróides tipo II exercem a retroalimentação nos processos neural e neuro-endócrino ativados pelo estresse. A resposta celular aos glicocorticóides é, portanto, dependente da disponibilidade do esteróide e da presença e concentração intracelular do receptor funcional.

A adrenalectomia (ADX) induz a alterações no eixo HHA de maior magnitude e duração do que qualquer outro procedimento estudado. Este modelo tem permitido novas informações sobre a regulação do eixo HHA pelos glicocorticóides e seus efeitos sobre a secreção de CRH e ACTH. A diminuição do número de receptores dos glicocorticóides (GR) induzida pelo ligante e seu aumento em resposta a remoção dos mesmos pela ADX têm sido demonstrados por ensaios de ligação. Mais recentemente, através de técnicas capazes de quantificarem a expressão do gene do GR, tais como hibridização *in situ*, os problemas associados aos ensaios de ligação podem ser potencialmente evitados. O mesmo aplica-se para técnicas que quantificam o RNAm de qualquer gene, incluindo os genes do CRH-R.

Em trabalhos prévios analisou-se a evolução temporal da concentração plasmática de corticosterona e ACTH, do conteúdo hipofisário de ACTH e hipotalâmico de CRH, através das dosagens destes hormônios, por radioimunoensaio (RIE), em diferentes períodos após ADX ou ADX simulada, em ratos. Estudaram-se, também, as alterações

ocorridas nos corticotrofos, por imunohistoquímica e a responsividade hipofisária *in vitro*, ao CRH. Esses resultados demonstraram que após a ADX a concentração plasmática de ACTH apresentou resposta trifásica (Castro et al., 1994). O estudo imunohistoquímico demonstrou degranulação inicial dos corticotrófos com progressivo aumento do número de células imunopositivas para o ACTH, havendo correlação entre este método e a dosagem do conteúdo hipofisário de ACTH, pelo RIE (Castro et al., 1994). O conteúdo hipotalâmico de CRH diminuiu após 3 h, sugerindo alta taxa de liberação, após o estresse cirúrgico. Posteriormente, mecanismos de controle da expressão gênica foram ativados, aumentando, provavelmente, a síntese de CRH. Houve, portanto, um período de latência entre a recuperação da concentração hipofisária de ACTH e hipotalâmica de CRH, indicando diferentes pontos de ajuste do eixo hipotálamo-hipófise, em diferentes períodos após ADX. Nos estudos *in vitro* houve uma diminuição transitória da secreção de ACTH, em condições basais e sob estímulo com CRH, provavelmente secundária à depleção dos estoques hipofisários de ACTH. Entretanto, nas fases mais tardias, mesmo havendo estoques de ACTH, houve uma hiporesponsividade dos corticotrofos ao CRH exógeno, indicando uma provável dessensibilização dos receptores do CRH a nível hipofisário (Castro et al., 1994). Um outro mecanismo que contribuiria para manutenção da secreção elevada de ACTH após ADX poderia ser a presença de outros fatores neuronais ou humorais além do CRH e seus receptores, como, por exemplo, a AVP e a ocitocina (OT), interferindo com a capacidade da resposta hipofisária, nos diferentes períodos após ADX (Wynn et al., 1986, Castro et al., 1994, Castro & Moreira, 1996).

AVP e ocitocina, secretagogos fracos para o ACTH, potencializam o efeito do CRH em nível hipofisário. Esta potencialização foi confirmada *in vitro*, por vários laboratórios (Guiguère & Labrie, 1982; Gillies et al., 1982; Vale et al., 1983; Gibbs & Vale, 1982), enquanto outros encontraram apenas efeito aditivo (Dupoy & Chatelain, 1984; Abou-Samra et al., 1986). Finalmente, Orth et al., 1985, confirmaram que AVP e CRH agem sinergicamente estimulando a secreção de ACTH, em humanos.

Outros fatores têm sido implicados na regulação da secreção de ACTH. Há, entretanto, muitos problemas para interpretar o papel fisiológico destes secretagogos. As catecolaminas mostram um efeito aditivo na estimulação da secreção de ACTH, em muitos

sistemas (Guiguère & Labrie, 1983; Vale et al., 1983; Rivier & Vale, 1985). Um segundo grupo de substâncias que altera a secreção de ACTH inclui o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), histidina isoleucinamida, colecistoquinina (CCK-8), interleucina I, angiotensina II, somatostatina e outros (Kraicer et al., 1985; Aguilera et al., 1986; Plotsky et al., 1989; Tsagarakis et al., 1989; Matta et al., 1990; Navarra et al., 1991). Mais recentemente, o polipetídeo natriurético atrial foi encontrado no hipotálamo e na EM e seu papel inibitório na regulação da secreção do ACTH hipofisário tem sido estudado (Dayanithi & Antoni, 1990; Fink et al., 1991). Muitos destes fatores são, entretanto, de pequena significância na regulação do ACTH, sob condições fisiológicas.

As concentrações de AVP e de OT têm atraído um particular interesse em resposta a uma variedade de estressores e, juntamente com a liberação de CRH das terminações dos neurônios parvocelulares do NPV do hipotálamo, agem como secretagogos do ACTH. (Antoni, 1993; Whitnall, 1993). Vários autores têm relatado uma secreção estresse-induzida de AVP e/ou OT dos axônios terminais dos neurônios magnocelulares dentro da circulação sangüínea, onde estes peptídeos contribuiriam para resposta de adaptação ao estresse. (Kasting, et al., 1988; Lang et al., 1983). Entretanto, AVP e OT de origem magnocelular poderiam agir não somente através de suas ações clássicas na periferia, mas também como secretagogos do ACTH, em diferentes situações como em resposta à ADX, ou em resposta a estímulos osmóticos ou mesmo em resposta a outros agentes estressores. Portanto, estes peptídeos poderiam chegar ao sistema porta-hipofisário tanto pela liberação dos neurônios da hipófise posterior como também através de uma via curta, os vasos portais, promovendo dessa forma uma ligação entre o sistema hipotalâmico neuro-hipofisário e o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (Antoni et al., 1990; Gibbs, 1986; Holmes et al., 1986).

Estudos recentes indicam que a liberação destes peptídeos ocorre não somente de axônios para dentro da corrente sangüínea, mas também de dendritos de neurônios para dentro do cérebro. (Landgraf, 1995). O entendimento dessas relações é fundamental com respeito à ativação estresse-induzida do sistema neuro-hipofisário, desde que a AVP liberada em diferentes níveis do cérebro poderia influenciar a regulação do eixo HHA em vias opostas: de um lado, em nível de hipotálamo, teria um potencial inibitório e em nível de eminência mediana e adeno-hipófise facilitaria a secreção de ACTH (Antoni, 1993).

A secreção de AVP e OT da hipófise posterior e da eminência média induzida por estresse não segue um padrão generalizado para todos os agentes estressores. (Kasting et al., 1988; Romero et al., 1996). O exato papel da liberação central e/ou periférica desses peptídeos permanece obscuro, embora o envolvimento na regulação de ACTH tem sido fortemente sugerido. Portanto, no presente estudo avaliamos a concentração destes peptídeos em animais submetidos a diferentes períodos de ADX. Adicionalmente, investigamos a resposta desses animais ao estresse de imobilização, para caracterizar as possíveis alterações da capacidade secretória de AVP e OT, na regulação da secreção de ACTH sob estas condições experimentais.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

OBJETIVOS

Em ratos controle e em ratos submetidos a diferentes períodos de adrenalectomia ou adrenalectomia simulada (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias):

I- Avaliar o efeito temporal de diferentes períodos de ADX, nas concentrações plasmáticas de ACTH, AVP e OT.

II- Avaliar a resposta de ACTH, AVP e OT ao estresse de imobilização, em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou adrenalectomia simulada.

[Faint handwritten notes and bleed-through from the reverse side of the page are visible.]

I - Animais e coleta de sangue

Ratos machos Wistar, pesando cerca de 200g, provenientes de linhagens do Biotério Central da UNICAMP, foram utilizados para os experimentos. Uma semana antes do procedimento, os animais foram colocados em gaiolas individuais, com água e comida à vontade (ração sólida, Purina Nutriente Ltda) em uma sala com temperatura (23°C), luz (7:00 –19:00 h) e umidade controladas. Os animais adrenalectomizados tinham à sua disposição, uma solução de NaCl 0,9%. Na véspera, de cada procedimento os animais foram pesados.

Os animais foram mortos por decapitação, entre 8:30 e 10:30 h, em diversos períodos de tempo após cirurgia, (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). Imediatamente após a decapitação o sangue do tronco foi colhido em tubos plásticos heparinizados, mantidos em gelo, até a centrifugação por 15 minutos, a 4°C e a 2000 rpm.. Após a centrifugação, o plasma foi aliquoteado em 3 tubos Eppendorf, devidamente rotulados para AVP, Corticosterona e ACTH, sendo nesse último previamente colocado 50 ul de N-etilmaleimida. Procedimentos semelhantes foram realizados para coleta e dosagem de Ocitocina. Esses plasmas foram estocados a -70°C, para posteriores dosagens.

II - Procedimento cirúrgico

Os animais, sob anestesia por éter, foram submetidos à tricotomia da região dorsal, para a realização da adrenalectomia bilateral ou adrenalectomia fictícia (sham). Foi realizada uma incisão dorsal, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Uma pinça separou os bordos da incisão e possibilitou a visualização dos músculos paravertebrais que foram seccionados e, a partir desta incisão, os órgãos abdominais foram visualizados. O rim e a glândula adrenal no seu polo superior foram localizados. Com o auxílio de uma pinça, a gordura peri-renal foi exteriorizada e seccionada juntamente com a adrenal. O mesmo procedimento foi feito para a glândula contra-lateral. A lesão foi suturada com fio de algodão. Ao término da cirurgia, o animal foi colocado novamente na gaiola com água e comida à vontade. No grupo ADX, foi colocada solução salina 0,9%.

III - Procedimento experimental “in vivo”

IIIa - Experimento em condições basais: Avaliação do efeito temporal de diferentes períodos de ADX, nas concentrações plasmáticas de Corticosterona, ACTH, AVP e OT, em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou adrenalectomia simulada (ADX-S).

Após os diferentes períodos da cirurgia (3 horas, 1 dia, 3 dias, 7 dias e 14 dias) os animais ADX ou ADX-S foram rapidamente retirados de suas gaiolas e decapitados, no máximo 30 a 60 segundos após. A seguir, o sangue do tronco foi colhido, centrifugado, aliquotado e estocado nas condições descritas acima, até a análise.

IIIb - Experimento em condições de estresse: Avaliação dos efeitos do estresse de imobilização nas concentrações plasmáticas de Corticosterona, ACTH, AVP e OT, em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou ADX-S.

Após os diferentes períodos da cirurgia (1 dia, 3 dias, 7 dias e 14 dias) os animais ADX ou ADX-S foram retirados de suas gaiolas e colocados em uma gaiola de contenção metálica, ficando totalmente imobilizado durante 60 minutos. Após esse período foram imediatamente, um a um decapitados no máximo em 30 a 60 segundos, depois de retirados das gaiolas. A seguir, o sangue do tronco foi colhido, centrifugado, aliquotado e estocado nas condições descritas acima, até a análise.

IV - Dosagens hormonais

Todas as dosagens hormonais, foram realizadas através de Radioimunoensaio (RIE), sendo realizadas nos Laboratórios de Endocrinologia dos Departamentos de Fisiologia e de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. Todas as amostras provenientes de um mesmo experimento foram determinadas em duplicata, em um mesmo ensaio.

IVa - Radioimunoensaio da Corticosterona.

A corticosterona plasmática foi determinada pelo método de Vecsei et al., 1972 e modificado através de extração do esteróide por etanol. Utilizamos um anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-17984) preparado em coelhos, com o hormônio conjugado com albumina bovina, gentilmente cedida pelo Dr. José Antunes Rodrigues. A especificidade do anticorpo foi testada através da reatividade cruzada com o cortisol (1%), 17OH-progesterona (1%) e sulfato de dehidroepiandrosterona (12%). A corticosterona [1,2-3(H)] (New England Nuclear) foi utilizada como marcado. Na separação da fração livre da ligada utilizamos uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05%.

A dose mínima detectável foi de $0,4 \pm 0,1$ ug/dl. O coeficiente de variação intra- e entre-ensaios foram, respectivamente, 4,8% e 6,7%, ao nível de B/Bo igual 0,5 da curva-padrão.

IVb - Radioimunoensaio do ACTH plasmático

O ACTH plasmático foi determinado, em duplicatas após extração com ácido silícico, segundo técnica previamente descrita e utilizada (Moreira et al., 1987). Os ensaios foram realizados em condições de não equilíbrio, com incubação de 72 horas.

A eficiência média de extração foi de 78%. A dose mínima detectada foi de 3,3 pg/tubo, o que equivale a 7,7 pg/ml. Os coeficientes de variação intra- e entre- ensaios foram em média de 6,3% e 14,0%, a nível de B/Bo igual a 0,5% da curva padrão.

IVc - Radioimunoensaio da AVP.

O radioimunoensaio da AVP foi realizado segundo o método previamente modificado por Elias et al., 1997. A vasopressina foi extraída do plasma com acetona e éter de petróleo. Após centrifugação (2500 rpm, 5 min., 4 °C), 1 ml de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 ml de acetona (Laboratório Merck) seguido de agitação por 20

segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min., 4°C). A seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 3,7 ml de éter de petróleo (Laboratório Reagen), sendo submetido após agitação e centrifugação (2500 rpm, 25 min., 4°C) ao congelamento, em nitrogênio líquido. A fase congelada, contendo a AVP foi liofilizada e, no momento do ensaio, ressuspensa com 250 µl de tampão do ensaio (Tampão TRIS -0,05 M com albumina humana 0,25%) e ensaiada em duplicata. Utilizamos o Primeiro Padrão Internacional (77/501) para confecção da curva-padrão, o primeiro anticorpo anti-AVP (RAS 8103 Península Laboratories) e o hormônio marcado Vasopressin 8-Arginine ¹²⁵I (NEN-128-Dupont). Para separação das frações livre e ligada utilizamos um segundo anticorpo anti-gamaglobulina de coelho produzido em cabra, seguido de solução de polietilenoglicol, PM 6000, a 12,5%.

A dose mínima detectável foi 0,9 pg/ml. Os coeficientes de variação intra- e entre- ensaios foram de 7,7% e 11,9%, respectivamente.

IVd - Radioimunoensaio da Ocitocina.

O radioimunoensaio da OT foi realizado após extração prévia do plasma com acetona e éter de petróleo. Após centrifugação (2500 rpm, 5 min., 4 °C), 1 ml de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 ml de acetona (Laboratório Merck) seguido de agitação por 20 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min., 4°C). A seguir o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo éter de petróleo (Laboratório Reagen) sendo submetido após agitação e centrifugação (2500 rpm, 25 min., 4°C) ao congelamento, em nitrogênio líquido. A fase congelada, contendo a ocitocina, foi liofilizada e, no momento do ensaio, ressuspensa com 400 µl de tampão do ensaio (Tampão TRIS 0,05 M com albumina humana 0,25%) e ensaiada em duplicata. Utilizamos o primeiro anticorpo um anti-OT, cedido gentilmente pela Dra Mariana Morris (Wright State University – Dayton , OH , USA) e o padrão para curva e para marcação foram comprados da Península Laboratories (cat. OT-81 52). Para separação das frações ligada e livre utilizamos um segundo anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra, seguido de solução de polietilenoglicol 6000 12,5%.

V - Osmolalidade Plasmática

A osmolalidade plasmática foi determinada no plasma pelo método do ponto de congelamento (Advanced Digimatec Osmometer – 3D II) no laboratório da disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

VI - Análise dos Resultados

Para análise estatística foram utilizados os seguintes procedimentos:

- índices de dispersão em torno da média (X) foram o desvio padrão da média (DP) e o erro padrão da média (EPM). As figuras estão representadas em $X \pm EPM$.

- análise de variância Anova foi utilizada para comparação dos valores dentro do mesmo grupo experimental, porém nos diferentes períodos estudados.

- teste de Wilcoxon Mann Whitney foi utilizado para comparação dos valores entre grupos diferentes (ADX-S vs ADX).

O nível de significância adotado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% entretanto, níveis de p menores que 0,05 foram anotados no texto.

Para efeito de cálculo estatístico todos os valores não detectáveis (abaixo do limite de sensibilidade para o respectivo ensaio) foram arbitrariamente considerados como o valor da sensibilidade do método (dose mínima detectável).

RESULTADOS

Procedimento experimental “in vivo”

I.1 - Experimento em condições basais: Avaliação do efeito temporal de diferentes períodos de ADX, nas concentrações plasmáticas de Corticosterona, ACTH, AVP e OT, em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou ADX-S.

Os valores individuais e em média, desvio-padrão da média e erro padrão da média de corticosterona (ug/dl), ACTH (pg/ml), AVP (pg/ml) e OT (pg/ml) plasmáticos, em ratos submetidos à ADX e ADX-S, estão apresentados nas tabelas de 1 a 4, no anexo.

I.1A - Concentração Plasmática de Corticosterona

Todos os animais ADX-S que apresentaram níveis de corticosterona acima de 3 ug/dl foram descartados por apresentarem níveis de estresse indesejáveis para o estudo em condições basais. Todos os animais ADX que apresentaram níveis de corticosterona acima de 1 ug/dl foram descartados por apresentarem níveis compatíveis com restos de adrenal.

A tabela I apresenta concentração de corticosterona ($X \pm \text{EPM}$) nos animais controles, animais ADX-S e ADX após os diferentes períodos de cirurgia. Esses dados estão apresentados graficamente na figura 1A. Quando comparamos o grupo ADX-S com os animais controles, observa-se que no grupo ADX-S houve um importante aumento de B após 3 horas da cirurgia ($p=0,005$), sendo que estes valores retornaram aos níveis semelhantes ao grupo controle após o primeiro dia de cirurgia, mantendo-se semelhantes ao longo dos períodos estudados (ns). Quando comparamos o grupo ADX-S nos diferentes períodos de cirurgia, observa-se que houve aumento no grupo 3 horas quando comparado com os grupos 1 dia ($p=0,007$), 3 dias ($p=0,002$), 7 dias ($p=0,004$), e 14 dias ($p=0,001$).

Não houve diferença entre os valores de corticosterona dentro do grupo ADX, entretanto, quando comparamos o grupo ADX-S e o ADX notamos valores de B maiores nos animais do grupo ADX-S que no grupo ADX, em todos os períodos estudados ($p<0,003$), confirmando a retirada completa das adrenais.

I.1b - Concentração Plasmática de ACTH.

O efeito da ADX e da ADX-S cirurgia na concentração plasmática de ACTH (pg/ml), em $X \pm EPM$, nos diversos períodos após as cirurgias está apresentado na tabela I e na figura 2A.

O grupo ADX-S apresentou valores de ACTH maiores que o grupo controle nos diferentes períodos após a cirurgia ($p < 0,01$). Entre o grupo ADX-S, os animais após 3 horas de cirurgia apresentaram valores de ACTH maiores que o grupo 1 dia ($p = 0,008$), 3 dias ($p = 0,03$), 7 dias ($p = 0,02$) e 14 dias ($p = 0,08$). Não houve diferença entre os valores de ACTH entre os outros diferentes períodos.

No grupo submetido a ADX, houve aumento nos níveis de ACTH após 3 horas da cirurgia, quando comparados aos controles ou ao grupo ADX-S ($p < 0,003$). Um dia após a ADX houve redução dos níveis de ACTH, embora esses ainda estivessem mais elevados que o do grupo controle e do grupo ADX-S. A partir do terceiro dia os valores de ACTH elevaram-se progressivamente, não havendo diferença entre os valores do grupo 7 e 14 dias.

Quando se compara o grupo ADX-S com o grupo ADX, dentro de um mesmo período após cirurgia, nota-se diferença significativa entre eles em todos os períodos: 3 horas ($p = 0,0016$), 1 ($p = 0,0007$), 3 ($p = 0,007$), 7 ($p = 0,0007$) e 14 ($p = 0,009$) dias, estando os valores de ACTH plasmático do grupo ADX mais elevados que os do grupo ADX-S.

I.1c - Concentração Plasmática de AVP.

O efeito da ADX e da ADX-S na concentração plasmática de AVP (pg/ml), nos diversos períodos após as cirurgias está apresentado na tabela I e na figura 3A.

Não houve diferença significativa dos valores de AVP do grupo controle quando comparado com os diferentes períodos de ADX-S ou ADX, assim como não houve diferença entre os diferentes períodos do grupo ADX-S e do grupo ADX. Quando comparamos o grupo ADX-S e o ADX não notamos diferença significativa em nenhum dos períodos estudados.

Tabela I - Média (X) e erro padrão da média (EPM) dos valores de corticosterona plasmática B (ug/dl), ACTH plasmático (pg/ml), AVP plasmática (pg/ml), OT plasmática (pg/ml) e osmolalidade plasmática (mOsm/kg), em animais do grupo basal, após diferentes períodos de ADX ou ADX-S:

Animais Tempo	Control	ADX-S 3 hs	ADX 3 hs	ADX-S 1 dia	ADX 1 dia	ADX-S 3 dias	ADX 3 dias	ADX-S 7 dias	ADX 7 dias	ADX-S 14 dias	ADX 14 dias
B	1,0±	13,5±	0,4±	1,0±	0,4±	0,6±	0,4±	1,5±	0,5±	1,6±	0,6±
(ug/dl)	0,14	3,1	1,4	0,1	0,04	0,1	0,02	0,2	0,03	0,2	0,1
ACTH	28,7	111,8	379,7	62,0	247,7	77,0	943,5	45,2	1170	43,7	1324
(pg/ml)	±4,5	±20,3	±20,1	±5,9	±9,9	±9,1	±130	±2,2	±146	±6,0	±168
AVP	6,0±	6,4±	7,5±	4,9±	6,3±	5,4±	4,7±	5,6±	6,4±	5,3±	5,5±
(pg/ml)	0,4	0,3	0,5	0,3	0,7	0,9	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4
OT	22,7	53,4	72,3	34,1	52,06	20,7	21,0	52,1	43,5	45,7	34,8
(pg/ml)	±4,1	±7,5	±7,1	±5,1	±11	±1,4	±7,5	±6,5	±8,5	±12	±8,3
pOsm	294	296	288		290		283		286		286
(mOsm/kg)	± 4	±3	±4		±2		±3		±2		±3

1.1d - Concentração Plasmática de OT.

O efeito da ADX e da ADX-S na concentração plasmática de OT (pg/ml), nos diversos períodos após as cirurgias está apresentado na tabela I e na figura 4A.

Os valores de OT no grupo controle foram menores que os do grupo ADX-S após 3 horas de cirurgia ($p=0,03$), entretanto não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo ADX-S nos outros períodos após a cirurgia. Quando comparamos os valores de OT nos diferentes períodos de cirurgia dentro do grupo ADX-S, nota-se que os valores do grupo 3 horas foram maiores que os do grupo após 1 e 3 dias de cirurgia, não havendo diferença entre os outros períodos.

Os valores de OT no grupo controle foram menores que os do grupo ADX após 3 horas e 1 dia de cirurgia ($p=0,002$; $p=0,03$), entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo ADX nos outros períodos após a cirurgia. Os valores de OT no grupo ADX foram semelhantes no grupo 3 horas e 1 dia, porém foram maiores que os grupos 3 dias ($p=0,002$), 7 dias ($p=0,008$) e 14 dias ($p=0,01$).

Quando se compara o grupo ADX-S com o grupo ADX, dentro de um mesmo período após cirurgia, nota-se diferença significativa entre eles no grupo 3 horas ($p=0,04$) e 1 dia ($p=0,04$), estando os valores de OT do grupo ADX sempre mais elevados que os do grupo ADX-S. Não houve diferença entre os grupos ADX-S e ADX após 3, 7 e 14 dias.

I.2 - Osmolalidade plasmática

Os resultados em média $\pm$ EPM das osmolalidades plasmáticas estão apresentados na tabela I e figura 5. Nossos resultados mostram que não houve diferença de osmolalidade plasmática entre o grupo controle quando comparado com o grupo ADX-S ($p=0,5$). O mesmo ocorreu quando comparamos o grupo ADX-S com o grupo ADX 3h ($p=0,07$) e ADX 1d ($p=0,15$). Entretanto houve diferença significativa quando comparamos o grupo ADX-S com o grupo ADX nos períodos 3d ($p=0,008$), ADX 7d ($p=0,03$) e ADX 14d ($p=0,02$). Cabe salientar que devido ao número reduzido de animais ADX-S dos quais foi possível determinar a osmolalidade plasmática, após realizar teste de variância o qual demonstrou não ser significativo, optamos por agrupar todos os períodos dos animais ADX-S em um só grupo.

II- Experimento em condições de estresse: Avaliação dos efeitos do estresse de imobilização nas concentrações plasmáticas de Corticosterona, ACTH e AVP em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou ADX-S.

Os valores individuais de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$), ACTH (pg/ml) e AVP (pg/ml), plasmáticos, em ratos submetidos a ADX e ADX-S e após 60 minutos de imobilização estão apresentados nas tabelas de 6 a 8, no anexo. As tabelas apresentam os respectivos hormônios em média, desvio-padrão da média e erro padrão da média.

IIa - Concentração Plasmática de Corticosterona.

A tabela II apresenta concentração de corticosterona ($X \pm EPM$) nos animais controles, animais ADX-S e ADX após os diferentes períodos de cirurgia, entretanto esses animais foram submetidos a 60 minutos de estresse de imobilização, antes da decapitação. Esses dados estão apresentados graficamente na figura 1B.

Não houve diferença estatística dos valores de B entre os animais do grupo ADX-S submetidos ao estresse, nos diferentes períodos após cirurgia. O mesmo foi observado em relação ao grupo ADX. O grupo ADX-S apresentou valores mais elevados de B, em todos os períodos: 1 ($p=0,0006$), 3 ($p=0,0001$), 7 ($p=0,0002$), e 14 ($p=0,0006$) dias.

II b- Concentração Plasmática de ACTH.

Os valores de ACTH (pg/ml) plasmático, em $X \pm EPM$, em ratos submetidos a ADX e ADX-S e após 60 minutos de estresse de imobilização estão apresentados na tabela II e graficamente na figura 2B.

Não houve diferença estatística dos valores de ACTH entre os animais do grupo ADX-S submetidos ao estresse, nos diferentes períodos após cirurgia. Em relação ao grupo ADX submetidos ao estresse, os valores de ACTH após 1 dia de cirurgia foram menores que após 3 ($p=0,02$), 7 ($p=0,001$) e 14 ($p=0,001$) dias. Os valores observados após 3 dias também foram menores que após 7 ($p=0,03$) e 14 ($p=0,04$) dias. Não houve diferença significativa entre os valores de ACTH dos grupos 7 e 14 dias após ADX.

Tabela II - Média (X) e erro padrão da média (EPM) dos valores de corticosterona plasmática B (ug/dl), ACTH plasmático (pg/ml) e AVP plasmática (pg/ml), de animais controle, ADX-S e ADX, submetidos ao estresse de imobilização, após diferentes tempos de cirurgia:

Animais	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo/	1dia	1dia	3dias	3dias	7dias	7dias	14 dias	14 dias
B	31,5±	0,2±	36,8±	0,9±	39,1±	0,5±	35,6±	0,5±
(ug/dl)	4,0	0,06	2,8	0,06	0,8	0,1	4,3	0,1
ACTH	552	284	458	752	562	1264	735	1382
(pg/ml)	±116	±20,5	±80,8	±143	±65,6	±114,6	±186,8	±238,4
AVP	5,4±	6,0±	5,2±	7,2±	5,4±	4,4±	5,6±	5,2±
(pg/ml)	0,5	0,6	0,5	1,3	0,6	0,7	0,7	1,0

IIc - Concentração Plasmática de AVP.

Os valores de AVP (pg/ml) plasmáticos, em $X \pm EPM$, em ratos submetidos à ADX e ADX-S e após 60 minutos de estresse de imobilização estão apresentados na tabela 2 e na figura 3B.

Não houve diferença estatística dos valores de AVP entre os animais do grupo ADX-S submetidos ao estresse, nos diferentes períodos após cirurgia. O mesmo foi observado em relação ao grupo ADX.

III - Comparação das respostas de B, ACTH e AVP em ratos adrenalectomizados, após diferentes períodos de cirurgia, em condições basais e submetidos ao estresse.

Os animais ADX-S em condições basais apresentaram valores de B menores que os do grupo ADX-S submetidos ao estresse, em todos os períodos estudados: 1 ($p=0,0006$), 3 ($p=0,0001$), 7 ($p=0,002$) e 14 ($p=0,0006$) dias. Os animais do grupo ADX em condições basais não apresentaram valores de B significativamente diferentes dos animais dos grupos submetidos ao estresse.

Os animais ADX-S em condições basais apresentaram valores de ACTH menores que os do grupo ADX-S submetidos ao estresse, em todos os períodos estudados: 1 ($p=0,01$), 3 ($p=0,003$), 7 ($p=0,001$) e 14 ($p=0,002$) dias. No entanto, os animais do grupo ADX em condições basais não apresentaram valores de ACTH significativamente diferentes dos animais dos grupos submetidos ao estresse. Portanto, não houve resposta do ACTH, no grupo ADX submetido ao estresse de imobilização, em nenhum dos períodos estudados.

Os animais ADX-S em condições basais apresentaram valores de AVP semelhantes aos animais do grupo ADX-S submetidos ao estresse, em todos os períodos estudados. O mesmo ocorreu com o grupo ADX. Portanto, não houve liberação de AVP frente ao estresse de imobilização, tanto no grupo ADX-S como no grupo ADX, em nenhum dos períodos estudados.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

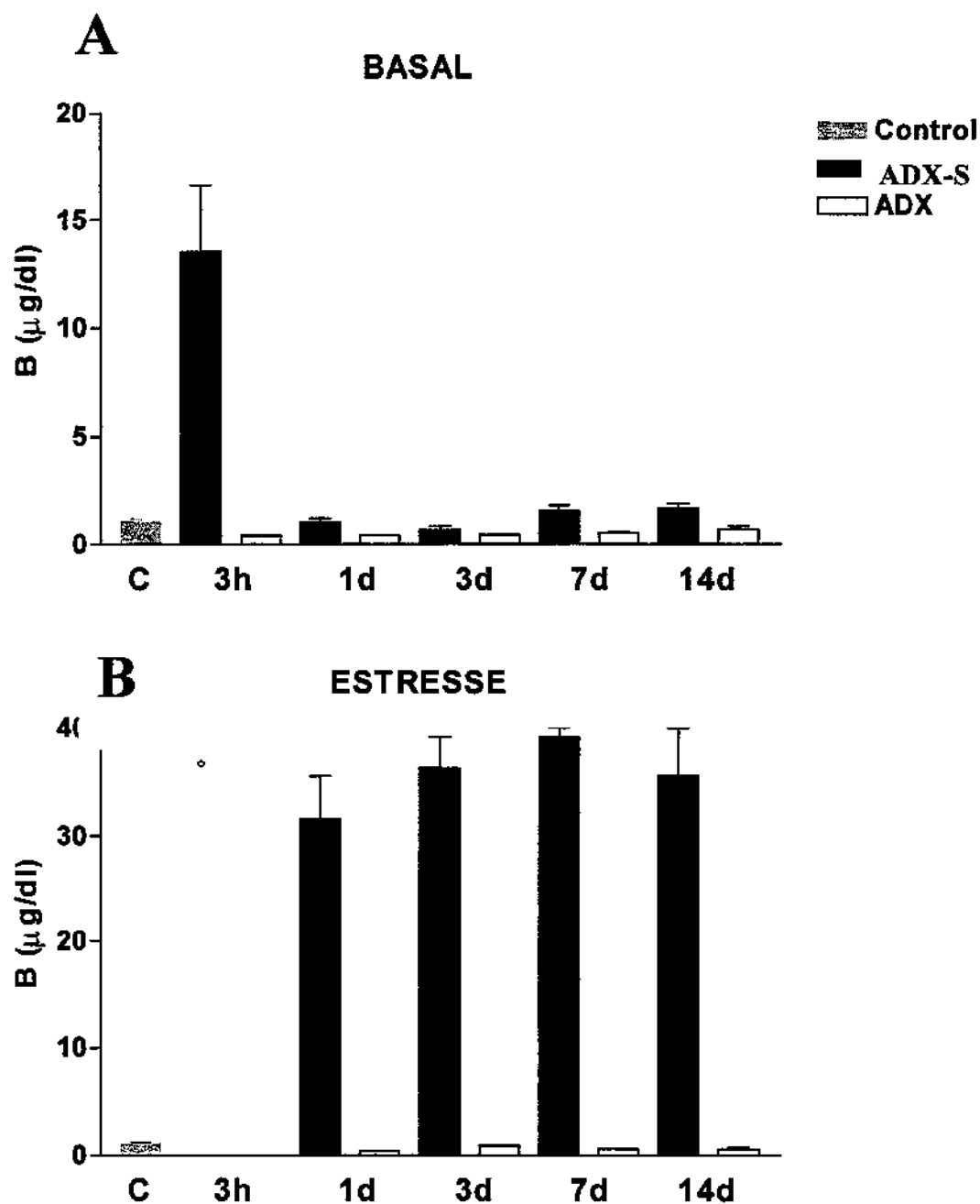


Figura 1: Concentração plasmática de corticosterona (B), em ug/dl, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 1A, condição basal; 1 B, submetido ao estresse.

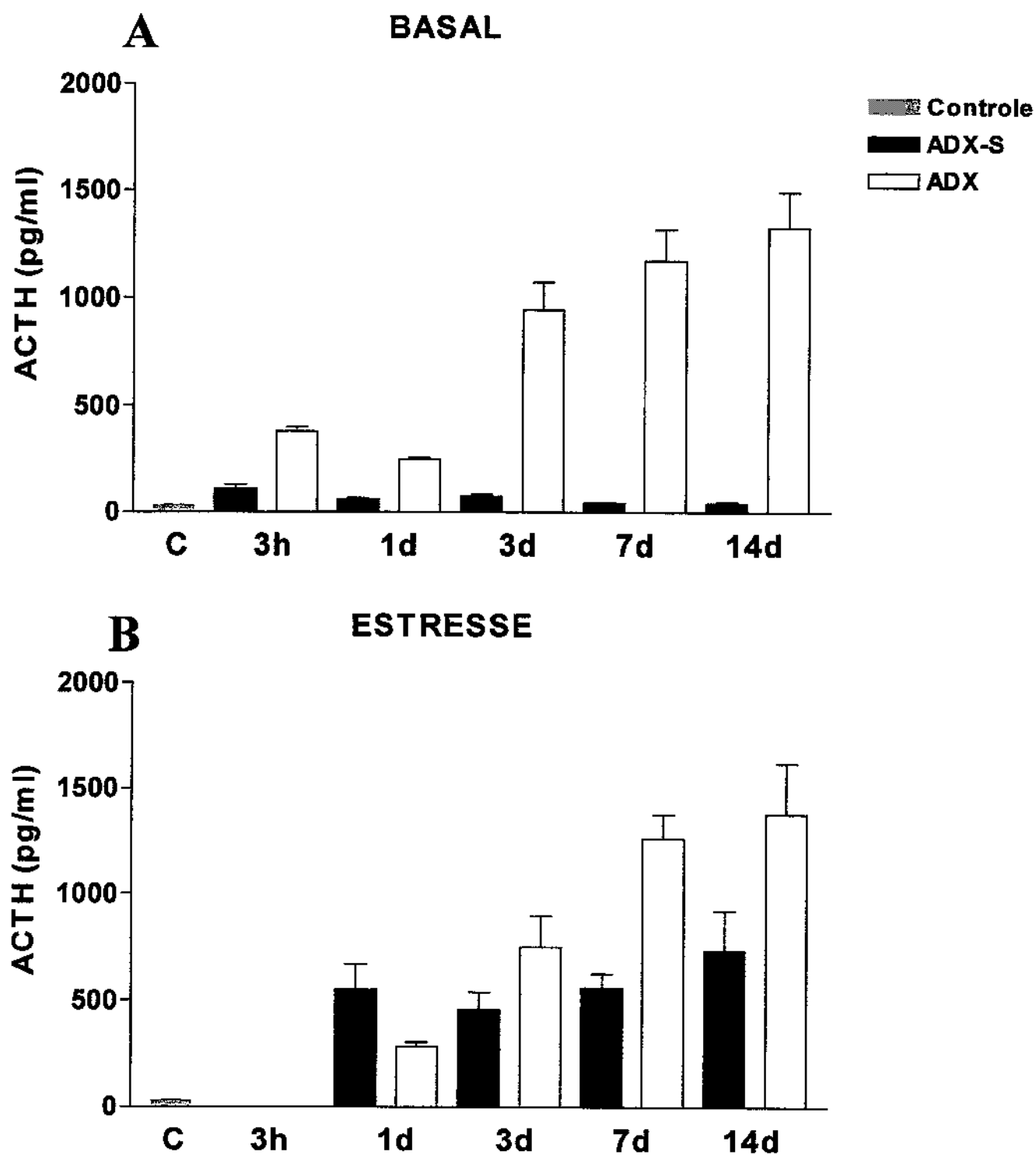


Figura 2: Concentração plasmática de ACTH, em pg/ml, em $X \pm$ EPM, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 2A, condição basal; 2 B, submetido ao estresse.

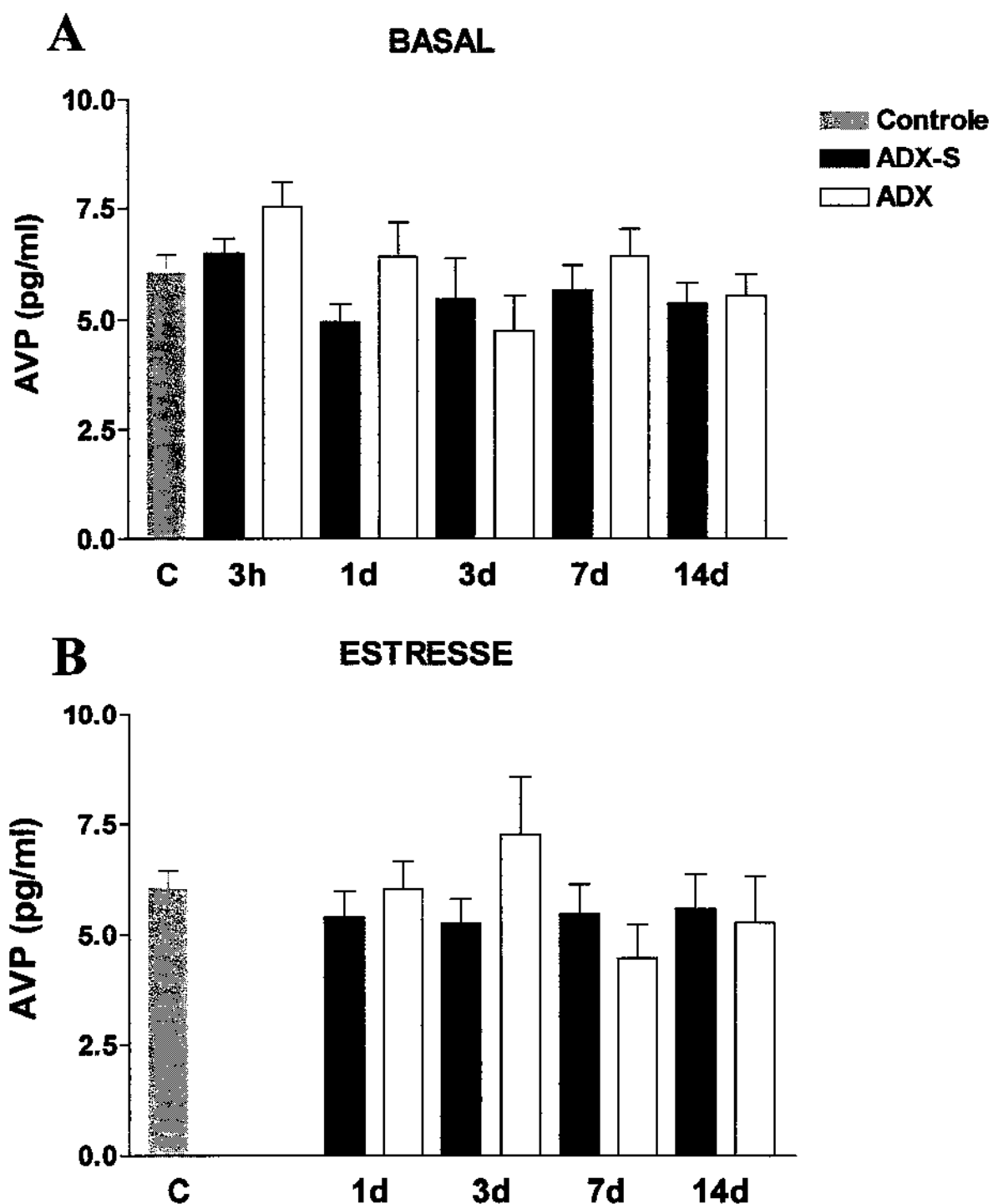


Figura 3: Concentração plasmática de vasopressina (AVP), em pg/ml, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias). 3A, condição basal; 3B, submetido ao estresse.

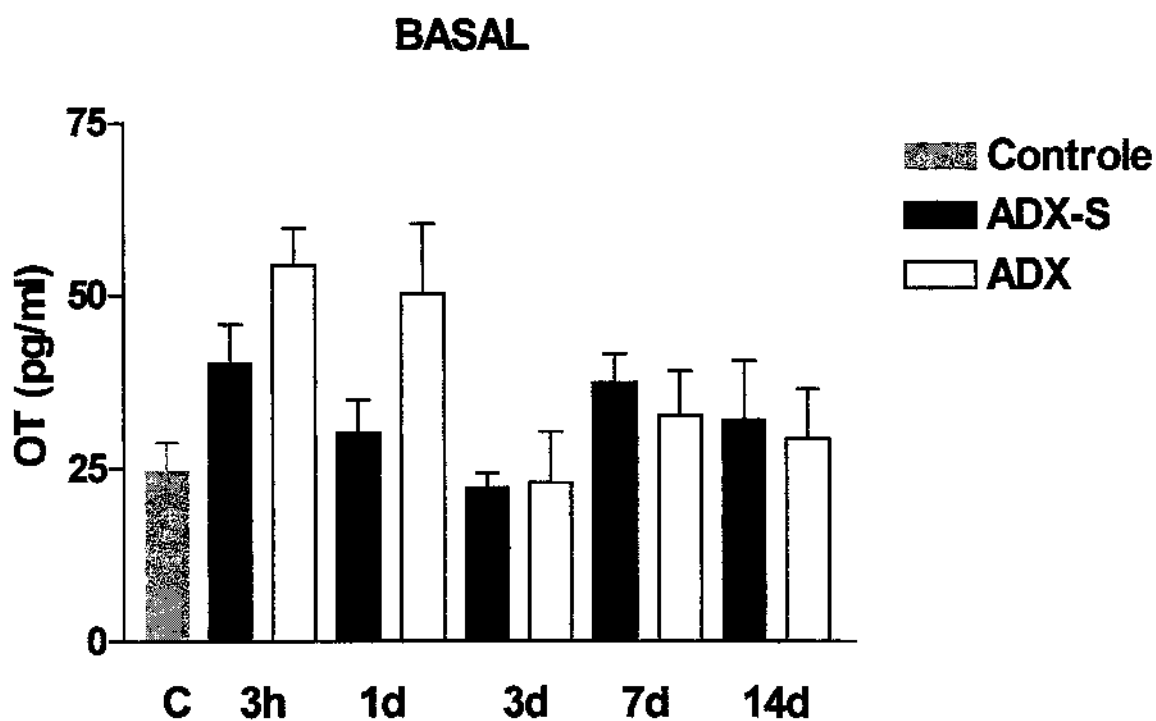


Figura 4: Concentração plasmática de ocitocina (OT) em pg/ml, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias).

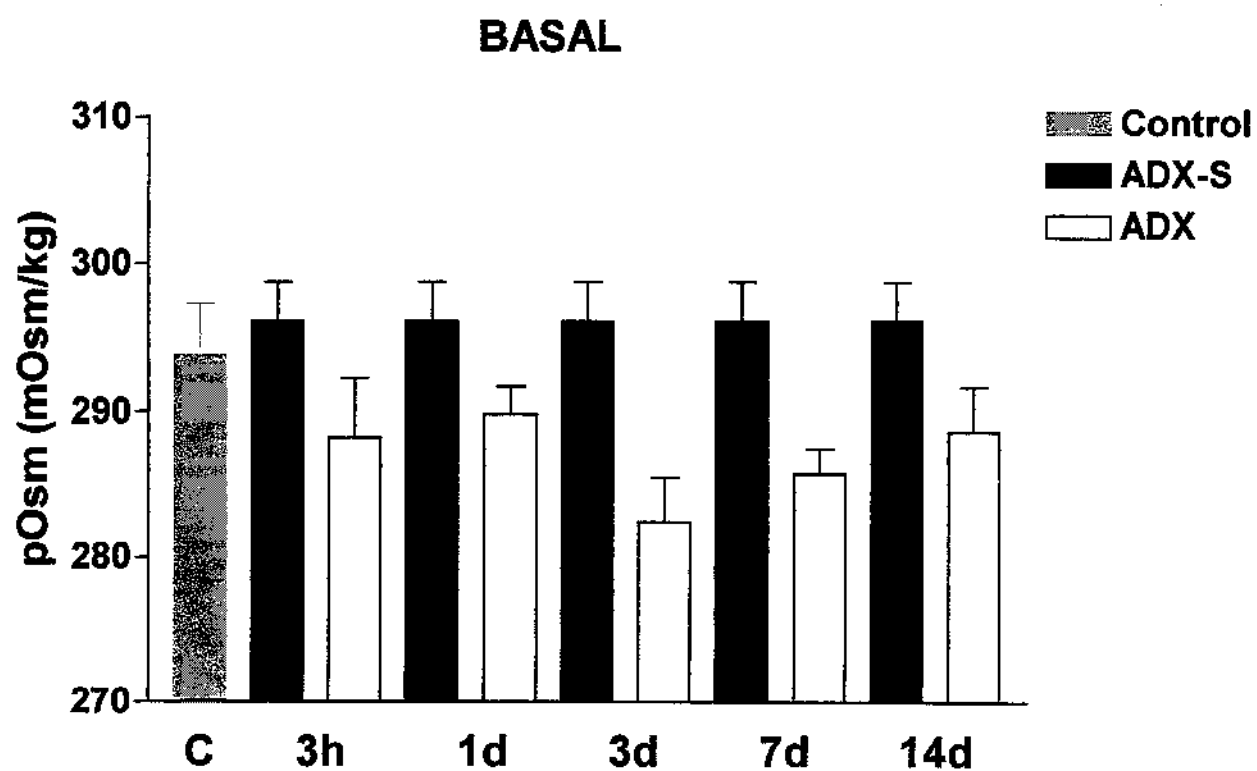


Figura 5: Valores de osmolalidade plasmática (pOsm) em mOsm/kg, em $X \pm EPM$, em animais controle (C), ADX-S e ADX, em diferentes períodos após cirurgia (3 horas, 1, 3, 7 e 14 dias), em condição basal.

DISCUSSÃO

Avaliação do efeito temporal de diferentes períodos de ADX ou ADX-S nas concentrações plasmáticas basais de Corticosterona, ACTH, AVP e OT, em ratos submetidos às cirurgias.

A variação circadiana dos corticosteróides e do ACTH é uma importante característica do eixo adrenal em muitas espécies, incluindo o homem e o rato. Neste último, uma espécie de hábito noturno, os picos da concentração plasmática de B e ACTH ocorrem antes do escurecer (18:00 horas) e as concentrações mais baixas (nadir) ocorrem pela manhã (8:00–11:00 horas), padrão este oposto ao encontrado no homem, que apresenta hábitos diurnos. O ritmo circadiano persiste após a ADX, conforme previamente avaliado por estudos anteriores (Ruhmann-Wennhold & Nelson, 1977). Para afastarmos qualquer alteração secundária à variação circadiana, os animais deste estudo foram decapitados entre 8:30 e 10:30 h, portanto, durante a fase de nadir do ritmo circadiano.

Nossos resultados dos valores de B em ratos controles foram de $1,0 \pm 0,1$ ug/dl, valores similares quando comparados com concentrações de B obtidas no período da manhã, na literatura (Fischman et al., 1988). Nos animais do grupo ADX-S, as concentrações de B variaram de 0,6 a 1,6 ug/dl durante todo o período do experimento, com exceção do estudo realizado após 3 horas da ADX simulada, onde estes valores foram de $13,5 \pm 3,1$ ug/dl. A significativa elevação da concentração de B após 3 horas da cirurgia é a resposta destes animais, com o eixo HHA íntegro, ao estresse anestésico, cirúrgico e à dor. Nos demais períodos não utilizamos animais cuja concentração de B fosse maior 3 ug/dl, na tentativa de não utilizarmos animais estressados, seja pela manipulação no momento do sacrifício, seja por eventuais condições inadequadas do biotério. As concentrações de B nos animais ADX foram menores que 0,6 ug/dl em todos os períodos estudados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Dallman et al. 1972, em que a concentração de B do grupo ADX, tornou-se indetectável após o período de 4 horas da cirurgia.

As concentrações plasmáticas de ACTH pela manhã em ratos controles, foram compatíveis às encontradas na literatura em geral (Ruhmann-Wennhold & Nelson, 1977; Fischman et al., 1988; Weinfeld & Feldman, 1991 e Bagdy et al., 1991). A concentração plasmática de ACTH apresentou elevação após 3h da ADX-S, retornando aos valores

UNICAMP

basais nos períodos subseqüentes, sugerindo que esta elevação de ACTH, secundária ao estresse, foi a responsável pela elevação de B acima descrita. No grupo ADX, a concentração plasmática de ACTH apresentou elevação após 3 h da ADX, seguida por diminuição no 1º dia; a partir do 3º dia apresentou um lento e progressivo aumento até a estabilização em valores cerca de 10 vezes maiores que o controle, no 14º dia. Os eventos que ocorrem após ADX que resultam nesta curva trifásica, refletem a resposta ao estresse e a influência da inibição do feedback. Esta resposta polifásica do corticotrofo à ADX foi descrita anteriormente (Dallman et al., 1974; Ruhmann-Wennhold & Nelson, 1977, Castro et al., 1996). Na primeira fase, haveria um marcado aumento na liberação de ACTH, que levaria a depleção do estoque hipofisário, justificando a diminuição dos seus níveis circulantes na segunda fase. Finalmente, ocorreriam alterações compensatórias, sendo a mais importante o aumento da síntese de ACTH, fato já comprovado pelo aumento da transcrição do RNAm da POMC (Birnberg et al., 1984; Autelitano et al., 1989). Estas alterações não ocorreram nos animais ADX-S, pois a elevação da concentração plasmática de B exerceu um efeito de feedback rápido na secreção de ACTH que limitou a quantidade de ACTH secretada.

O controle da transcrição do gene da POMC é complexo apresentando seqüências reguladoras estimulatórias e inibitórias da sua transcrição. Os corticotrofos, através da ação iniciada por secretagogo(s), desencadeariam alterações na cascata metabólica intracelular, ajustando a biossíntese dos peptídeos da POMC para responder à demanda secretória (Roberts et al., 1987; Auteliano et al. 1989). Por outro lado, a presença de glicocorticóides circulantes atuam através do seu receptor específico, pertencentes a superfamília dos receptores nucleares, no elemento negativo responsivo aos glicocorticóides, presente no gene da POMC.

É importante salientar que o conteúdo de ACTH na hipófise é centenas a milhares de vezes maiores que a sua secreção, em condições fisiológicas. Com a ADX há hipertrofia e aumento dos grânulos secretórios, isto é da síntese e, proporcionalmente há aumento da secreção. Nossos resultados demonstram que, após longo tempo de ADX, síntese e secreção encontrariam um novo e mantido estado de equilíbrio, conforme previamente observado após longos períodos (28 dias) de ADX (Castro et al., 1996). O

aumento do conteúdo de RNAm da POMC, e conseqüente aumento da síntese protéica, ocorreria devido à estimulação crônica pelo CRH endógeno, liberado na ausência de glicocorticóide. Corroborando esta idéia, temos os resultados de Gertz et al., 1987, que encontraram um aumento no número de corticotrofos após 52 dias de administração contínua de CRH exógeno. A perda do mecanismo de retroalimentação possibilitaria também a secreção de outros secretagogos hipotalâmicos do ACTH além do CRH, tais como AVP, OT, AII, que estimulariam a síntese de ACTH na hipófise anterior.

Está bem estabelecido que a ADX afeta a subdivisão parvicelular do NPV (Antoni, 1986). A variação do conteúdo de CRH do HMB e EM está relacionada às alterações deste sistema neurosecretório, sensível à glicocorticóide. Estudos prévios (Spinedi et al.; 1991 e Castro et al.;1996) encontraram a recuperação do conteúdo de CRH, apenas após o 14º dia da ADX e os valores não ultrapassaram os encontrados nos animais ADX-S. Entretanto, outros autores têm apresentado diferente evolução. Suda et al. (1993) demonstraram que o conteúdo de CRH na EM de ratos ADX após 3 horas da cirurgia, era semelhante aos dos animais ADX-S e duas vezes maiores que o destes após 14 dias de ADX. Plotsky & Sawchenko, 1987, utilizando como modelo ADX farmacológica, encontraram significativo aumento do conteúdo de CRH na EM, após 3 dias de tratamento destes animais com metirapona e aminoglutetimide.

Estas diferenças podem ser atribuídas a variações na extração ou na quantidade de peptídeo extraído ou devido às diferenças bioquímicas entre ADX cirúrgica ou farmacológica. Adicionalmente, o fato do conteúdo de CRH ter sido quantificado no HMB, nos trabalhos onde não houve aumento do mesmo e, na EM onde houve este aumento, sugere que a síntese não foi suficiente para acompanhar a demanda da secreção. Em um estágio inicial, haveria aumento da taxa de liberação de CRH, com aumento do transporte axonal e da liberação deste, dentro da circulação porta, em resposta à ausência do glicocorticóide. Em uma segunda fase, a transcrição gênica seria ativada conforme demonstrada, através de técnicas de hibridização *in situ* (Scott-Young et al.; 1986), com produção do pró-hormônio e transporte do produto à EM e aos nervos terminais (Plotsky & Sawchenko.;1987). A possibilidade do aumento na síntese de CRH não compensar o exagerado aumento da sua secreção, não pode ser afastada. Por outro lado, outra

possibilidade seria que os elevados níveis de ACTH poderiam atuar retro-alimentando a síntese de CRH, através de uma alça curta (Castro et al.;1996).

Desde que AVP e CRH estão co-localizados nos neurônios parvicelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e se projetam na zona externa da EM a importância da participação da AVP na resposta hipofisária de liberação de ACTH, após ADX, deve ser avaliada. Através de estudos imunohistoquímicos verificou-se que os neurônios imunoreativos para o CRH são de distribuição heterogênea (Swanson et al.;1983). A grande maioria das fibras CRH positivas da camada externa da EM, e que modulam a liberação de ACTH pela hipófise, tem origem no NPV. Cerca de 80% destes neurônios estão concentrados na divisão parvocelular e cerca de 20% na divisão magnocelular. Um segundo grupo de neurônios CRH positivos estão localizados em outros núcleos hipotalâmicos como supraóptico, supra-quiasmático, pré-óptico, periventricular (Antoni, et al. 1983; Daikoku, et al. 1985) e no tronco cerebral, estando estes últimos envolvidos na regulação de funções autonômicas (Swanson et al.; 1983). Ainda no tronco cerebral, há uma interação dos axônios de neurônios parvicelulares do NPV e neurônios do sistema locus coeruleus e sistema norepinefrina que estão envolvidos na resposta do organismo ao estresse (Chrousos & Gold, 1992). O terceiro grupo de neurônios CRH positivos está localizado no córtex cerebral, onde atuaria como interneurônios e cuja redução poderia estar associada com algumas doenças no homem, como a doença de Alzheimer (Orth, 1992).

O aumento da imunorreatividade de CRH e AVP dentro da célula, após ADX, é acompanhado pelo aumento da transcrição dos RNAm de ambos os genes (Wolfson et al., 1985). Parece, ainda, haver um desvio da relação AVP/CRH após ADX, comprovado por imunohistoquímica (Kiss et al., 1984; Whitnall et al., 1987) por uma predominante liberação de AVP em relação ao CRH, pelas EM de ratos ADX, "in vitro" (Holmes et al.; 1986). Portanto, atualmente, acredita-se que o controle hipofisário da secreção de ACTH após ADX seja multifatorial, envolvendo além do CRH, a vasopressina. Sendo esta secreção multifatorial outros secretagogos de menor importância como ocitocina, catecolaminas, angiotensina II, colecistoquinina e polipeptídeo intestinal vasoativo (Antoni, 1986) devem ser avaliados nesta condição.

Neste trabalho avaliamos a resposta da AVP e da OT no plasma de animais submetidos a diferentes períodos de ADX. Observamos que não houve aumento dos valores de AVP plasmática nos grupos ADX-S e ADX nos diferentes períodos após cirurgia, quando comparados com o grupo controle. Portanto, os diferentes períodos de ADX não modificaram a liberação de AVP plasmática, cuja principal fonte são os neurônios magnocelulares, sugerindo que estes neurônios não são fundamentais na manutenção da secreção de ACTH, após a ADX. Por outro lado, cabe salientar que a osmolalidade plasmática dos animais ADX diminuiu após o terceiro dia de ADX, permanecendo em valores menores até o 14º dia da ADX, o que poderia mascarar uma possível resposta de AVP magnocelular ao efeito da ADX. Desde que a osmolalidade plasmática é a principal reguladora da secreção de AVP, a hipoosmolalidade observada nos animais adrenalectomizados poderia levar a uma diminuição da secreção de AVP, contribuindo para a manutenção dos níveis da mesma. Tem sido observado que a deficiência de glicocorticóide altera depuração de água livre, a qual leva a uma hiponatremia dilucional tanto em humanos como em animais. Embora o efeito direto da deficiência de glicocorticóide na permeabilidade do nefro distal não pode ser excluído, muitas evidências sugerem um papel central para a AVP (Kamoi et al., 1993). Adicionalmente, os níveis de aldosterona estão muito baixos após ADX, contribuindo para uma provável hiponatremia. Portanto, nossos resultados sugerem que a hipoosmolalidade associada a uma provável hiponatremia, secundárias à deficiência de glicocorticóide e aldosterona, causariam uma supressão da secreção de AVP, contribuindo para que a mesma se mantivesse inalterada, apesar do estímulo nas divisões parvo- e magno-celulares no NPV, exercido pela ausência do glicocorticóide. Os níveis de receptores glicocorticóides nos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos são indetectáveis, porém, estímulos osmóticos como a hipoosmolalidade crônica, induzem a expressão de receptores de glicocorticóides nos neurônios magnocelulares vasopressinérgicos (Berghorn et al.; 1995). Estes resultados sugerem que o gene da vasopressina pode ser diretamente inibido por glicocorticóides e que a indução da expressão de receptores de glicocorticóides nos neurônios magnocelulares possa ser parte de mecanismos que suprimem a expressão de AVP durante o período de hipoosmolalidade prolongada.

A quantificação de AVP, por métodos que possibilitassem a avaliação da mesma proveniente dos neurônios parvocelulares do NPV, neste trabalho, traria grande contribuição na comprovação da hipótese da AVP ser o mais importante potencializador do estímulo liberador de ACTH, após ADX. Este estímulo, provavelmente, seria mediado pelos neurônios hipofisiotróficos que são capazes de modular as concentrações de CRH e AVP, responsáveis pela regulação da secreção do ACTH (Bertini & Kiss, 1991). Entretanto, como previamente discutido, a vasopressina está presente, também, no trato hipotalâmico-neurohipofisário com corpos celulares localizados no NPV, no núcleo supraóptico (NSO) e no núcleo acessório no hipotálamo anterior. São neurônios magnocelulares, cujos axônios passam pela camada interna da eminência média, atingindo a neurohipófise (NH), sintetizando além da AVP a OT. Uma questão que tem sido discutida é o papel da AVP magnocelular no controle da regulação do ACTH, e neste estudo, cabe salientar que esta foi a fonte estudada, desde que dosamos apenas a AVP circulante no plasma.

Estudos prévios tem demonstrado que a AVP endógena induzida por estímulo osmótico potencializa a resposta do ACTH e cortisol após CRH (Milson et al., 1985; Rittmaster et al., 1987; Watabe et al., 1988). Mesmo na secreção não estimulada de ACTH, há relato de que o aumento da AVP endógena está correlacionado com o aumento da secreção de ACTH (Rittmaster et al., 1987; Irvine et al., 1989). A origem desta AVP no sangue portal-hipofisário, potencializando o efeito do CRH tem sido estudada. A observação de que o CRH e a AVP estão presentes no mesmo grânulo neurosecretório dos neurônios parvocelulares na zona externa da eminência mediana (Whitnall et al., 1985) implicaria em alteração concomitantes de CRH e AVP no sangue porta-hipofisário. Contudo, alterações têm sido demonstradas na concentração de vasopressina no sangue porta-hipofisário sem alteração concomitante de CRH (Gibbs, 1985; Plotsky et al., 1985 ; Antoni et al.; 1993). Esta dissociação sugere a liberação de AVP de outros terminais nervosos, na eminência média. Através de análise neuroquímica observou-se que os axônios magnocelulares em sua passagem pela camada interna liberam AVP, que atingiria o sangue porta-hipofisário, através da rede de capilares portais fenestrados que penetram esta camada da eminência média (Holmes et al.; 1986).

Outra indicação de que a AVP no sistema portal-hipofisário pode ter contribuição do sistema magnocelular decorre dos estudos em ratos com lesão do NPV. No rato com lesão do NPV há uma redução na resposta do ACTH frente ao estresse (Meyerhoff et al., 1987). A lesão do NPV reduz o conteúdo e a liberação de CRH pela eminência média sem alterar a liberação de AVP (Holmes et al., 1986; Antoni et al., 1990). Esta resposta da AVP não é bloqueada pela dexametasona, potente inibidor do sistema CRH-AVP parvicelular, sugerindo a origem magnocelular da AVP do sistema porta-hipofisário do rato com lesão do NPV. (Holmes et al., 1986).

Finalmente, uma outra via de estimulação do corticotrofo pela AVP magnocelular poderia ocorrer através de vasos interlobais curtos da neurohipófise para a hipófise anterior (Page, 1982). A neurohipofisectomia atenua a resposta do ACTH induzida pela hipotensão arterial, evidenciando a participação da AVP magnocelular ou mesmo da ocitocina na secreção do ACTH (Raff et al., 1985).

Estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito da ocitocina na secreção de ACTH (Gibbs, 1984.;Vale et al., 1983). A ocitocina isoladamente é um secretagogo fraco do ACTH, mas assim como a AVP, potencializa o efeito do CRH (Vale et al., 1983; Gibbs et al., 1984). A imunoneutralização da ocitocina através de injeção intracerebroventricular (terceiro ventrículo), de anticorpo anti-ocitocina reduz a concentração plasmática basal de ACTH, indicando a participação da ocitocina na modulação do eixo hipofisário-adrenal (Franci et al., 1993).

O rato Brattleboro, que apresenta diabetes insípido central de herança autossômica recessiva apresenta defeito na síntese de AVP não só nos neurônios magnocelulares do NPV e NSO, mas também nos neurônios parvocelulares do NPV. Nestes ratos foram observadas hipertrofia e hiperatividade de neurônios ocitocinérgicos e que foram reversíveis com o tratamento exógeno com vasopressina (Elias et al., 1997).

Apesar do significado fisiológico da OT na regulação do ACTH não estar estabelecido, sabe-se que a concentração da ocitocina no sangue porta-hipofisário é muito maior do que no sangue periférico, sugerindo sua secreção na eminência mediana (Gibbs, 1984; Plotsky et al., 1985; Horn et al., 1985). Estudo imunohistoquímico tem demonstrado

a presença de axônios ocitocinérgicos na zona externa da eminência média de origem parvo e magnocelular (Vandesande et al., 1977; Wiegand & Price, 1980). A co-localização de CRH e ocitocina em grânulos secretórios na eminência média também tem sido relatada, mas provavelmente são fibras que se projetam na neurohipófise e não na zona externa da eminência média (Swanson et al., 1983; Dreyfuss et al., 1984). Os neurônios que secretam AVP são distintos daqueles que secretam a ocitocina e são distribuídos em diferentes partes do NPV e NSO (Bisset & Chowdrey, 1988). Impulsos neurais aferentes a estes neurônios permitem a liberação de AVP independentemente da ocitocina.

Em relação ao estudo da secreção de OT nos diferentes períodos de ADX, observamos que as concentrações de OT no grupo ADX-S, após 3 horas de cirurgia e no grupo ADX, após 3 horas e 1 dia de cirurgia, foram mais elevadas que às obtidas no grupo controle e nos demais períodos das cirurgias. Estes resultados confirmam que a OT é um hormônio responsivo ao estresse induzido por alguns estímulos, incluindo a inalação de éter. No entanto, quando comparamos o grupo ADX-S com o grupo ADX após 3h e 1d da cirurgia, as concentrações do grupo ADX foram mais elevadas, sugerindo que além do estresse, alterações no eixo HH após ADX, podem contribuir para o aumento da secreção de OT nesta condição experimental.

Em um estudo anterior verificou-se que, após 21 dias ADX, houve um seletivo aumento de AVP no hipotálamo de ratos ADX, comparado com os animais ADX-S (Franco-Bourland, 1998). Neste mesmo estudo, houve um acúmulo de AVP e OT na neurohipófise desses mesmos animais, entretanto, sem alterações plasmáticas desses peptídeos, sugerindo uma ativação moderada do sistema magnocelular. O autor infere que esses resultados seriam consequências da deficiência do glicocorticóide, secundária a ADX. O nosso trabalho confirma esses resultados no que se refere aos valores plasmáticos circulantes de OT após longos períodos de ADX, onde não ocorreu elevação dos níveis plasmáticos de OT após 3, 7 e 14 dias de ADX. Nosso trabalho, no entanto, acrescenta o papel da OT na insuficiência adrenal, secundária a ADX nos períodos precoces, onde a OT se elevou mais acentuadamente nos animais após ADX (3h e 1d), comparado aos animais ADX-S dos mesmos períodos. Essa elevação da OT pode ser justificada pelo fato de que, nos períodos precoces, ocorreria a sobreposição de várias condições de estímulo para a

liberação de OT como o estímulo pelo éter, o estresse cirúrgico imediato, além da ADX propriamente dita.

Sabe-se que a estimulação hiperosmótica induz à liberação de OT. A resposta da ocitocina ao estímulo osmótico apresenta diferença entre as espécies. No homem normal, não há alteração da ocitocina com o aumento da osmolalidade (Gaitan et al., 1964; Nussey et al., 1986), enquanto que em ratos, a concentração plasmática de ocitocina elevada guarda direta relação com a osmolalidade plasmática. A normalização dos níveis de OT, nos períodos tardios da ADX, poderia ser, portanto, justificada pela presença de hipoosmolalidade que ocorreu após o terceiro dia de ADX, nos grupos estudados.

Avaliação dos efeitos do estresse de imobilização nas concentrações plasmáticas de Corticosterona, ACTH e AVP, em ratos submetidos aos diferentes períodos de adrenalectomia ou adrenalectomia simulada.

Os peptídeos de origem neuronal, AVP e OT têm um papel na resposta dos mamíferos ao estresse. Neste contexto a maioria dos trabalhos tem enfocado a sua importância no sistema HHA, o principal eixo neuro-endócrino que permite que os animais respondam às situações de desafio (Johnson et al., 1992).

Dentre esses peptídeos envolvidos na regulação do eixo HHA, além do CRH, a AVP tem particular importância como secretagogo do ACTH em uma variedade de estresse. Uma das razões é o fato da vasopressina ser apontada como o segundo mais importante mediador da secreção de ACTH, potencializando o efeito do CRH. A AVP é um secretagogo secundário do ACTH quando incubado isoladamente com células hipofisárias (Vale et al., 1983), mas quando administrado simultaneamente com CRH, há um aumento exuberante da resposta do ACTH e cortisol em estudos realizados *in vitro* (Gillies et al., 1982) e *in vivo* (Yates et al., 1971; Rivier & Vale, 1983; Rivier et al., 1984). Esta ação sinérgica da AVP com o CRH tem substrato anatômico bem estabelecido, devido à co-localização do CRH e AVP nos neurônios parvocelulares do NPV (Roth et al., 1982; Trami et al., 1983), como anteriormente discutido, demonstrando que tanto no homem

como no rato os neurônios parvocelulares no NPV imunorreativo para o CRH são também para AVP (Mouri et al., 1993; Antoni, 1993). A ativação independente destas subpopulações de neurônios justificaria a concentração diferente de CRH e AVP no sangue porta-hipofisário em diferentes modelos de estresse.

Neste estudo não observamos elevação de AVP plasmática após o estresse de imobilização por 60 minutos, em nenhum dos grupos, ADX-S ou ADX, em nenhum dos períodos. Embora evidências sugiram a participação da AVP na resposta ao estresse (Linton et al., 1985) ela parece ser estimulada por apenas algumas modalidades (Robertson, 1977; Stark et al., 1982; Baylis e Robertson, 1980; Gibbs, 1984). Os principais estímulos para a liberação de AVP são alterações na osmolalidade plasmática, pressão arterial e volume sanguíneo (Robertson, 1992.). Portanto, agentes estressores envolvendo essas alterações, tais como hemorragia ou privação de água, resultam em aumento da concentração da AVP (Aguillera et al.; 1993)

Os dados referentes à resposta da AVP aos estímulos estressores que não evocam alterações hemodinâmicas e/ou osmóticas são menos consistentes. Em humanos, estímulos como náusea ou hipoglicemia insulínica, parecem induzir aumento de AVP (Fisher et al.;1987). Em ratos, entretanto, a secreção de AVP parece não ser responsiva a uma variedade de estímulos que induzem secreção de ACTH e catecolaminas. Estudos prévios, em ratos, não demonstraram elevação de AVP após exercício forçado (Lang et al., 1983; Husain et al., 1979; Kasting, 1988), inalação de éter (Husain et al.,1979; Keil & Severs; 1977), aceleração (Keil & Severs, 1977), hipoglicemia (Kasting, 1988), ruído (Husain et al., 1979) ou exposição ao frio (Gibbs, 1984; Lang et al., 1983; Kasting, 1988). Quanto à liberação de AVP provocada pelo estresse de imobilização esses resultados ainda são controvertidos. O desenvolvimento de métodos mais sensíveis e precisos associado a estudos bem controlados tem possibilitado a avaliação da AVP na resposta ao estresse. Alguns autores observaram a elevação de AVP após a imobilização (Husain et al., 1979; Kasting, 1988), enquanto essa não foi confirmada por outros (Gibbs, 1984; Lang et al., 1983). Estudos que quantificaram a AVP no líquido e no plasma após estresse de imobilização não observaram nenhuma alteração em relação ao basal. (Iványi et al.;1991). A controvérsia na literatura quanto a resposta da AVP ao estresse de imobilização pode

estar associada a diferentes aplicações e intensidade de um mesmo estímulo ou a diferentes linhagens de animais utilizadas. O nosso trabalho, utilizando ratos Wistar e condições padronizadas de estresse de imobilização corroboram os resultados da literatura em que a AVP magnocelular parece não contribuir para a secreção de ACTH em resposta a este estímulo. Adicionalmente, a AVP magnocelular, diferentemente da proveniente das fibras dos neurônios parvocelulares (Whitnall, 1993) não parece contribuir como um importante secretagogo de ACTH na ADX, de curto ou longo prazo, frente ao estresse de imobilização.

A ocitocina, um outro secretagogo fraco do ACTH, também parece estar envolvida na resposta secretória do ACTH hipofisário, em alguns modelos de estresse, como imobilização física e exposição ao éter (Lang et al., 1983; Gibbs, 1984; Dohanics et al., 1991). O principal papel da OT é no trabalho de parto e na lactação. Além destes, outros estímulos, osmóticos e não osmóticos, induzem também a liberação de OT. A OT tem sido demonstrada estar elevada em resposta ao estímulo de imobilização, de restrição, hipoglicemia e estímulo de natação forçada. Entretanto, parece estar diminuída em estresse de comportamento em primatas não humanos (Lang et al.; 1983 ; Gibbs, 1984; Hashimoto et al.; 1989; Iványi et al.; 1991; Aguilera & Kiss.; 1993; Baylis & Robertson.; 1980; Crine & Buijs.; 1987; Keil & Severs.; 1977). O aumento da OT plasmática em resposta à imobilização parece ser potencializado pela privação de água por 48 horas. Os mecanismos envolvidos na liberação de OT durante o estresse não estão bem definidos: esta liberação poderia ocorrer, desde que há co-localização de OT e CRH em neurônios hipotalâmicos parvo e magno-celulares responsivos ao estresse (Gibbs, 1985.; Plotsky & Sawchenko, 1987). Ainda é discutível se a OT liberada em resposta a maioria dos estímulos estressores é derivada dos neurônios magnocelulares do NPV ou do NSO. Contudo, estudos anteriores têm demonstrado uma relativa importância desses núcleos na liberação de OT durante o estresse. Em ratos submetidos a retirada incompleta da região antero-lateral do hipotálamo médio basal, na qual as fibras nervosas do NSO foram mantidas e as do NPV foram destruídas, a elevação de OT após estresse de imobilização foi abolida. Esses dados sugerem que o NPV é essencial para a liberação de OT induzida pela imobilização (Jezova et al.; 1993). Independente do mecanismo envolvido parece claro que os neurônios magnocelulares do NPV, mas não os do NSO, são essenciais para a liberação de OT durante o estresse de imobilização. O NSO isoladamente parece não ser capaz de manter a

resposta completa da liberação de OT frente aos estímulos estressores. Estudo anterior, realizado em ratos após 21 dias de adrenalectomia e submetidos a 6 horas de estresse de imobilização demonstrou que os níveis de OT foram seletivamente aumentados no hipotálamo e na neurohipófise (Franco-Bouland, 1998). Nesse mesmo estudo a biossíntese de AVP e o conteúdo neurohipofisário da mesma permaneceram inalterados. Essas observações sugerem uma seletiva ativação dos neurônios magnocelulares do NPV, secretores de OT em resposta ao estresse de imobilização. Estudos posteriores serão realizados para avaliarmos o papel da OT em resposta ao estresse, no modelo de ADX de curta e longa duração.

Concluindo, há diferentes pontos de ajuste do eixo HHA, dependendo do período da retirada do mecanismo de retro-alimentação negativa. O papel dos principais neuro-hormônios na secreção de ACTH secundária à ADX ou ao estresse parecem diferir. Enquanto a AVP periférica parece não participar na liberação de ACTH frente à ADX e ao estresse de imobilização, a OT, um hormônio responsivo ao estresse, parece contribuir para a secreção de ACTH, durante a fase inicial da resposta à ADX.

SUMMARY

Corticotropin releasing hormone (CRH) is the main regulator of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion and co-ordinates the endocrine, autonomic, behavior and immune response to stress. CRH is present in the hypothalamic-pituitary axis and also in other central nervous system regions and peripheral structures. The subdivision of parvicellular paraventricular (PVN) nuclei contains and releases not only CRH, but also vasopressin (AVP) and oxytocin (OT). They are co-localized in neurosecretory granules in the parvicellular neurons of the PVN. AVP and OT are also present in magnocellular neurons with cell bodies found in the NPV, supraoptic nuclei (SOP), and accessory nuclei.

Adrenalectomy (ADX) induces dramatic hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis changes. The role of AVP and OT on HPA axis regulation after ADX and their responses to different stress paradigm have been studied. These peptides released from magnocellular axons may gain access to the pituitary portal circulation, leading to an interaction between the hypothalamo- neurohypophysis system and HPA system.

In the present study we evaluated the AVP and OT plasma concentrations at different time in rats submitted to Sham surgery or ADX (3h, 1, 3, 7 and 14 days after surgery). In order to characterize the participation of AVP and OT on HPA regulation after ADX, we also investigated the ACTH, AVP and OT secretion in rats submitted to immobilization stress.

ADX rats showed undetectable corticosterone (B) levels after surgery, while Sham animals showed a remarkable increase of B and ACTH 3h after surgery, lowering thereafter to basal control levels, demonstrating the expected HPA axis response to anesthetic, surgical and pain stress in animals presenting intact HPA axis. ADX rats presented an increased ACTH levels 3h post ADX, followed by a reduction at 1day and thereafter they showed a progressive increase, reaching a plateau with 10 fold increase from the control levels. These responses after ADX resulted in a triphasic response pattern, indicating the response to stress and withdrawal of negative feedback. Sham and ADX groups showed similar AVP plasma levels throughout the study. Therefore, plasma AVP, which is released from magnocellular neurons, is not changed by ADX, suggesting that magnocellular AVP system is unlikely to contribute to the ACTH secretion after ADX.

Plasma OT levels were higher 3h after surgery in the Sham group compared to controls. ADX group showed higher OT levels 3h and 1 day after surgery than control and Sham groups. These results confirm that OT is elicited by stress such as ether inhalation. Moreover, in addition to stress, ADX might also increase OT levels.

Sham animals showed increased B and ACTH levels after immobilization throughout the study. In contrast, high ACTH levels under resting conditions observed in ADX did not change after immobilization. Plasma AVP levels was unchanged after immobilization in both Sham and ADX groups.

In conclusion, there are different HPA axis set points at different time after removing the glucocorticoid negative feedback. The participation of the main ACTH regulators on the ACTH secretion in response to ADX or stress seems to differ. Magnocellular AVP is unlikely to contribute to ACTH secretion in response to ADX or immobilization stress, whereas OT is elicited by stress and might contribute to the ACTH secretion during the initial phase after ADX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SAMRA, A. B.; CAT, K.J.; AGUILERA, G. Involvement of protein kinase C in the regulation of ACTH release from rat anterior pituitary cells. Endocrinology, v.118, p. 212-7, 1986.
- AGUILERA, G.; HOLMES, M. C.; HARWOOD, J.P.; HAUGER, R.L.; MILLAN, M.A.; GREWE, M. A.; CAT, K. J. Receptor mediated action of corticotropin releasing factor in pituitary gland and nervous system. Neuroendocrinology, v. 43, p. 79-88, 1986.
- AGUILERA, G.; KISS, A. Activation of magnocellular vasopressin responses to non-osmotic stress after chronic adrenal demedullation in rats. J. Neuroendocrinol. 5: 501-507. 1993.
- AGUILERA, G.; LIGHTMAN, S. L.; KISS, A. Regulation of the hypothalamic-adrenal axis during water privation. Endocrinology 132: 241-248. 1993.
- ANTONI, F. A.; PALKOVITS, M.; MAKARA, G.B.; LINTON, E. A.; LOWRY, P. J.; KISS, J. Z. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamo infundibular tract. Neuroendocrinology, v. 36, p. 415-23, 1983.
- ANTONI, F. A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. Front. Neuroendocr. 14, 76-122, 1993.
- ANTONI, F. A.; FINK, G. AND SHEWARD W. J. Corticotropin releasing peptides in rat hypophysial portal blood after paraventricular lesions: a marked reduction in the concentration of corticotropin-releasing factor 41, but no change in vasopressin. J. Endocr. 125, 175-183. 1990.
- ANTONI, F.A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-Residue corticotropin-releasing factor. Endocr.Ver. v.7, p. 351-78, 1986.
- AUTELIANO, D. J.; BLUM, M.; ROBERTS, J. L. Changes in rat pituitary nuclear and cytoplasmic pro-opiomelanocortin RNAs associated with adrenalectomy and glucocorticoid replacement. Mol. Cell. Endocrinol. V. 66, p. 171-80, 1989.

- BAGDY, G.; CHROUSOS, G.P.; CALOGERO, A. E. Circadian patterns of plasma immunoreactive corticotropin, beta-endorphin, corticosterone and prolactin after immunoneutralization of corticotropin-releasing hormone. Neuroendocrinology, v. 53, p. 573-8, 1991.
- BAYLIS, P.H.; ROBERTSON, G.L. Rat vasopressin response to insulin-induced hypoglycemia Endocrinology, v. 107, n 6, p. 1975-9, 1980.
- BERGHORN, K.A.; KNAPP, L.T.; HOFFMAN, G.E.; SHERMAN, T.G. Induction of glucocorticoid receptor expression in hypothalamic magnocellular vasopressin neurons during chronic hypoosmolality. Endocrinology, Feb; 136(2); 804-7 1995.
- BERTINI, L. T.; KISS, J. Z. Hypophysiotrophic neurons are capable of altering the ratio of co packaged neurohormones. Neuroscience, v. 42, p. 237-44, 1991.
- BIRNBERG, N.C.; LISSITZKI, J. C.; HINMAN, M.; HEBERT, E. Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene in vivo at the levels of transcription and secretion. Proc. Nat. Acad. Sci., v. 80, p. 6982-6, 1984.
- BISSET, G. W.; CHOWDREY, H. S. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. Quarterly Journal of Experimental Physiology. V. 73, p. 811-72, 1988.
- CASTRO, M., FIGUEIREDO, F., MOREIRA, A.C. Time-Course of Hypothalamic CRH and Pituitary ACTH Contents, and Pituitary Responsiveness to CRH Stimulation After Bilateral Adrenalectomy. Horm. Met. Res. 27: 10-15. 1994.
- CASTRO, M., MOREIRA, A.C. Regulation of corticotropin-releasing hormone secretion by ACTH at different times after adrenalectomy. Braz. J. Med. Biol. Res. 29: 1573-1578. 1996.
- CHEN, R.; LEWIS, K. A.; PERRIN, M. H.; VALE, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 90:8967-8971. 1993.

- CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress system disorders: Overview of behavioral and physical homeostasis. JAMA, v. 267, p. 1244-52, 1992.
- CRINE, A.F.; BUIJS, R.M. Electric foot shocks differentially affect plasma and spinal cord vasopressin and oxytocin levels. Peptides 8: 243-246. 1987.
- CROFFORD, L.J., SANO, H., KARALIS, K., FRIEDMAN, T.C., EPPS, H.R., REMMERS, E.F.; MATHERN, P., CHROUSOS, G.P., WILDER, R.L. Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Immunol. 151:1587-1596. 1993.
- CROFFORD, L.J., SANO, H., KARALIS, K., WEBSTER, E.L., GOLDMUNTZ, E.A., CHROUSOS, G.P., WILDER, R.L. Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. J. Clin. Invest. 90:2555-2564. 1992.
- DAIKOKU, S.; OKAMURA, Y., KAWANO, H.; TSURUO, Y.; MAEGAWA, M.; SHIBASAKI, T. CRF- containing neurons of the rat hypothalamus. Cell Tissue Res., v. 240, p. 575-84, 1985.
- DALLMAN, M. F.; JONES, M. T.; VERNIKOS-DANELIS, J.; GANONG, W. F. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: rapid effects of bilateral adrenalectomy on plasma ACTH in the rat Endocrinology, v. 91, p. 961-8, 1972.
- DALLMAN, M. F.; MAKARA, G. B.; ROBERTS, J.L.; LEVIN, N.; BLUM, M. Corticotrope response to removal of releasing factors and corticosteroids in vivo. Endocrinology, v. 117, p. 2190-7, 1985.
- DAYANITHI, G.; ANTONI, F. A. Atriopeptins are potent inhibitors of ACTH secretion by rat anterior pituitary cells in vitro: involvement of the atrial natriuretic factor receptor domain of membrane-bound guanylyl cyclase. J.Endocrinology., v. 125, p. 39-44, 1990.

- DOHANICS, J.; HOFFMANN, G.E.; VERBALLIS, J.G. Hiponatremia-induced inhibition of magnocellular neurons causes stressor-selective impairment of stimulated adrenocorticotropin secretion in rats. Endocrinology, v. 128, p. 331-40, 1991.
- DREYFUSS, F.; BURLET, A.; TONON, M. C.; VAUORY, H. Comparative immunoelectron microscopic localization of corticotropin-releasing factor (CRF-41) and oxytocin in the rat median eminence. Neuroendocrinology, v. 39, p. 284-7, 1984.
- DUPOY, J.P.; CHATELAIN, A. In vivo effects of corticosterone, synthetic ovine CRF and arginine vasopressin on the release of adrenocorticotropin by fetal rat pituitary glands. J. Endocrinol., v. 101, p.339-44, 1984.
- ELIAS, L. K. L., ANTUNES-RODRIGUES, J., ELIAS, P.C.L., MOREIRA, A.C. Effect of plasma osmolality on pituitary- adrenal responses to corticotropin - releasing hormone and atrial natriuretic peptides changes in central diabetes insipidus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 1243-1247. 1997
- FINK, G.; DOW, R. C., CASLEY, D., JOHNSTON, C.I.; LIM, A. T.; COPOLOV, D. L.; BENNIE, J.; CARROL, S.; DICK, H. Atrial natriuretic peptide is physiological inhibitor of ACTH release: evidence from immunoneutralization in vitro. J. Endocrinol., v. 135, p. R9-R12, 1991.
- FISCHMAN, A. J.; KASTIN, A. J.; GRAF, M. V.; MOLDOW, R. L. Constant light and dark affect the circadian rhythm of the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis. Neuroendocrinology., v. 47, p. 309-16, 1988.
- FISHER, B. M.; BAYLIS, P. H.; FRIER, B. M. Plasma oxytocin, arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide responses to insulin-induced hypoglycemia in man. Clin. Endocrinol. 26: 179-185. 1987.
- FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KOZLOWSKI, G.P.; Mc CANN, S. M. Actions of endogenous vasopressin and oxytocin on anterior pituitary hormone secretion. Neuroendocrinology, v. 57, p. 693-9, 1993.

- FRANCO-BOURLAND.,R.E. Vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. Neurochem. Res. May; 23 (5): 695-701. 1998.
- GERTZ, D.; CONTRERAS, L. N.; MCCOMB, D.; KOVACZ, K.; TYRREL, B.J.; DALLMAN, M. F. Chronic administration of CRH increases pituitary corticotropic number. Endocrinology, v. 120, p. 381-8, 1987.
- GIBBS, D. M. Measurement of hypothalamic corticotropin-releasing factors in hypophyseal portal blood. Fedn. Proc. V. 44, p.203-6, 1985.
- GIBBS, D. M. Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. Psychoneuroendocrinology 11, 131-140. 1986.
- GIBBS, D. M.; VALE, W.; RIVIER, J.; YEN, S.S.C. Oxytocin potentiates the ACTH-releasing activity of (CRF-41) but not vasopressin. Life Sci., v. 34, p. 2245-9, 1984.
- GIBBS, D.M. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. Life Sci. 35: 487-491. 1984.
- GIBBS, D.M.; VALE, W. Presence of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in hypophyseal portal blood. Endocrinology, v.111, p. 1418-20, 1982.
- GIGUÈRE, V., LABRIE, F., COTE, J., COY, D.H., SUERIRAS-DIAZ, J., SCHALLY, A.V. Stimulation of cyclic AMP accumulation and corticotropin release by synthetic ovine corticotropin-releasing factor in rat anterior pituitary: site of glucocorticoid action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3466-3469. 1982.
- GIGUÈRE, V.; LABRIE, F. Additive effects of epinephrine and corticotropin release in rat anterior pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.; v.110, p.456-62, 1983.
- GILLIES, G.E.; LINTON, E. A.; LOWRY, P.J. Corticotropin release activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. Nature, v. 299, p.355-7, 1982.

- GUILLEMIN, R.; ROSEMBERG, B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue culture. Endocrinology 57: 599-607. 1955
- HASHIMOTO, K.; MURAKAMI, K.; TAKAO, T.; MAKINO, S.; SUGAWARA, M.; OTA, Z. Effect of acute ether or restraint stress on plasma corticotropin releasing hormone, vasopressin and oxytocin level in the rat. Acta. Med. Okayama 43: 161-67. 1989.
- HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends. Neurosci. 20, 78-84 (1997)
- HOLMES, M.C.; ANTONI, F. A.; AGUILLERA, G. AND CATT, K. J. Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. Nature 319, 326-329. 1986.
- HORN, A. M.; ROBINSON, J.C.A.F.; FINK, G. Oxytocin and vasopressin in rat hypophysial portal blood: experimental studies in normal and Brattleboro rats. J. Endocrinol. v. 104, p. 211-24, 1985.
- HUSAIN, M.K.; MANGER, W.M.; ROCK, T.H.; WEISS, R.J.; FRANTZ, A. G. Vasopressin release due to manual restraint in the rat: role of body compression and comparison with other stressful stimuli. Endocrinology, v. 104, n.3, p. 641-4, 1979.
- IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S. L.; DONALD, R.A. Effect of an osmotic stimulus on the secretion of arginine-vasopressin and adrenocorticotropin in the horse. Endocrinology, v. 124, p. 3102-6, 1989.
- IVÁNYI, T.; WIEGANT, V.M.; WIED, D. Differential effects of emotional and physical stress on the central and peripheral secretion of neurohypophysial hormones in male rats. Life Sci., v. 48, n.13, p. 1309-16, 1991.
- JACOBSON, L.; AKANA, S. F.; CASCIO, C. S.; SCRIBNER, K.; SHINSAKO, J.; DALLMAN, M. F. The adrenocortical system responds slowly to removal of corticosterone in the absence of concurrent stress. Endocrinology, v. 124, p. 2144-52, 1989.

- JEZOVA, D.; SKULTETYOVA, I.; TOKAREV, D.I.; BAKOS, P.; VIGAS, M. Vasopressin and oxytocin in stress. Annals New York Academy of Sciences. Vol 771 pg.192-203. 1995.
- JOHNSON, E. O.; KAMILARIS, T. C.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P. W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci. Biobehav. 16. 115-130. 1992.
- KAMOI, K.; TAMURA, T.; TANAKA, K.; ISHIBASHI, M.; YAMAJI, T. Hyponatremia and osmoregulation of thirst and vasopressin secretion in patients with adrenal insufficiency. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol.77. n°6 pg.1584-88. 1993.
- KARALIS, K., SANO, H., REDWINE, J., LISTWAK, S., WILDER, R.L., CHROUSOS, G.P. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin- releasing hormone in vivo. Science 254:421-423. 1991.
- KASTING, N. W. Simultaneous and independent release of vasopressin and oxytocin in the rat. Can. J. Physiol. Pharmac. 66, 22-26.1988.
- KEIL, L. C.; SEVERS, W.B. Reduction in plasma vasopressin levels of dehydrated rats following acute stress. Endocrinology, v. 100, n.1, p.30-8, 1977.
- KELLER-WOOD M., DALLMAN M. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. Endocr. Rev 5:1-24. 1984.
- KISS, J. Z.; MEZEY, E.; SKIRBOLL, L. Corticotropin releasing factor-immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin positive after adrenalectomy. Neurobiology, v. 81, p. 1854-8, 1984.
- KLOET E.R., RATKA A., REUL J.M.H.M., SUTANTO W., VAN ECKELAN J.A.M. Corticosteroid receptor types in brain: regulation and putative function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 512: 351-361. 1987.

- KRAICER, J.; GAJEWSKI, T.C.; MOOR, B.C. Release of Pro-opiomelanocortin- derived peptides from the pars intermedia and pars distalis of rat pituitary: effect of corticotropin-release factor and somatostatin. Neuroendocrinology, v. 41, p. 363-73, 1985.
- LANDGRAF, R. Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioral consequences. J. Neuroendocr. 7, 243-253. 1995.
- LANG, R. E.; HEIL, J. W. E.; GANTEN, D.; HERMANN, K.; UNGER, T.; RASCHER, W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. Neuroendocrinology 37: 314-16 1983.
- LIAW, C.W., LOVENBERG, T.W., BARRY, G., OLTERSDORF, T., GRIGORIADES, D.E., DE SOUZA, E.B.. Cloning and characterization of the human CRF2 receptor cDNA Endocrinology v. 137, p. 72-7, 1996.
- LINTON, E. A.; TILDERS, F. J. H.; HODGKINSON, S.; BERKENBOSCH, F.; VERMES, J.; LOWRY, P. J. Stress-induced secretion of adrenocorticotropin in rats is inhibited by administration of antiserum to ovine corticotropin-releasing factor and vasopressin. Endocrinology, v. 116, p. 966-70. 1985.
- LOVENBERG, T.W., LIAW, C.W., GRIGORIADES, D.E., CLEVINGER, W., CHALMERS, D.T., DE SOUZA, E.B., OLTERSDORF, T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 92:836-840. 1995.
- LUO, X., KISS, A., MAKARA, G., LOLAET, S.J., AGUILERA, G. Stress-Specific Regulation of Releasing Hormone Receptor Expression in the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Hypothalamus in the Rat. Journal of Neuroendocrinology 6: 689-196. 1994.
- MATTA, G. S.; SINGH, J.; NEWTON, R.; SHARP, B.M. The adrenocorticotropin response to interleucin-1 β instilled into rat median eminence depends on the local release of catecholamines. Endocrinology, v. 127, p. 2175-82, 1990.

- MAURI, T.; ITOI, K.; TAKAHASHI, K.; SUDA, T.; MURAKAMI, O.; YOSHINAGA, K.; ANDOH, N.; OHTANI, H.; MASUDA, T.; SASANO, N. Co localization of corticotropin releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. Neuroendocrinology, v. 57, p. 34-9, 1993.
- MEYERHOFF, J.L.; KANT, G.J.; MOUGEY, E.H. Paraventricular lesions completely eliminate the stress-induced rise in pituitary cyclic AMC and attenuate the increases in plasma levels of POMC-derived peptides in rat. Ann. NY. Acad. Sci., v.512, p.499-501- 1987.
- MILSON, S.R.; CONAGLEN, J. V.; DONALD, R. A.; ESPINER, E.A.; NICHOLLS, M.G. Augmentation of the response to CRF in man: relative contributions of endogenous angiotensin and vasopressin. Clin. Endocrinol. v. 22, p. 623-8, 1985.
- MOREIRA, A.C., BARIZON, E.A., SILVA, J.R.. Montagem e padronização do radioimunoensaio do ACTH plasmático. Arq. Bras. Endocr. Metab. 2:19-22. 1987.
- NAVARRA, P.; TSAGARAKIS, S. ; FARIA, M. S.; REES, L. H. ; BESSER, G. M.; GROSSMAN, A . B. Interleukins-1 and 6 stimulates the release of CRH-41 from rat hypothalamus in vitro via eicosanoid cyclooxygenase pathway. Endocrinology, v. 128, p. 37-44, 1991.
- ONO, N.; SAMSON, W.K.; MCDONALD, J. K.; LUMPKIN, M.D.; BEDRAN DE CASTRO, J. C.; MCCANN, S. M. Effects of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 7787-90, 1985.
- ORTH, D. N. Corticotropin- releasing hormone in humans. Endocr. Rev. 13:164-191. 1992.
- ORTH, D. N.; DE BOLD, C.R.; DE CHERNEY, G.S.; JACKSON, R. U.; SHELDON, W.R.; NICHOLSON, W. E.; UDERMAN, H.; ALEXANDER, A. N.; ISLAND, D.P.; RIVIER, J.; VALE, W. Clinical studies with synthetic ovine corticotropin releasing factor. Fed. Proc., v. 44, p. 197-202, 1985.

- ORTH, D. N.; JACKSON, R.; DECHERNEY, G. S.; DEBOLD, C. R.; ALEXANDER, A. N.; ISLAND, D.P.; RIVIER, J.; RIVIER, C.; SPIESS, J.; VALE, W. Effect of synthetic ovine-corticotropin-releasing factor. Dose response of plasma adrenocorticotropin and cortisol. J. Clin. Invest. V. 71, p. 587-95, 1983.
- PAGE, R. B. Pituitary blood flow. Am. J. Physiol. V.243, p. 427-42, 1982.
- PERRIN, M.H., DONALDSON, C.J., CHEN, R., LEWIS, K.A., VALE, W.W. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin-factor (CRF) receptor. Endocrinology 133: 3058-3061. 1993.
- PLOTSKY, P. M. Hypophysiotropic regulation of adenohipophyseal adrenocorticotropin secretion. Fedn. Proc., v. 44, p. 207-13, 1985.
- PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM JUNIOR, E.T.; WIDMAIER, E.P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. Endocr. Ver., v. 10, p. 437-58, 1989.
- PLOTSKY, P.M.; SAWCHENCO, P.E. Hypophysial portal plasma levels, median eminence content and immunohistochemical staining of corticotropin releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. Endocrinology, v. 120, p. 1361-9, 1987.
- PLOTSKY, P.M.; VALE, W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor- like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. Endocrinology, v. 114, p. 164-9, 1984.
- RAFF, H.; MERRIL, D.; SKELTON, M.; COWLEY JR, A. W. Control of ACTH and vasopressin in neurohypophysectomized conscious dog. Am. J. Physiol., v. 249, p. R281-4, 1985.
- RITTMASER, R. S.; CUTLER, J.R.; G.B.; GOLD, P.W.; BRANDON, D.D.; TOMAI, T.; LORIAUX, D.L.; CHROUSOS, G.P. The relationship of saline-induced changes in vasopressin secretion to basal and corticotropin-releasing hormone-stimulated adrenocorticotropin and cortisol secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. V. 64, p. 371-6, 1987.

- RIVIER, C.; RIVIER, J.; VALE, W. Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. Science, v. 218, p. 377-9, 1982.
- RIVIER, C.; VALE, W. Effects of CRF, neurohypophysial peptides and catecholamines on pituitary function. Fed. Proc., v. 44, p. 189-95, 1985.
- RIVIER, C.; VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. Nature, v. 325-7, 1983.
- ROBERTS, J.L.; LUNDBLAD, J. R.; EBERWINE, J.H.; FREMEAU, R.T.; SALTON, S.R.J.; BLUM, M. Hormonal regulation of POMC gene expression in pituitary. Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 512, p. 275-85, 1987.
- ROBERTSON, G. L. Regulation of vasopressin secretion. In the kidney: Physiology and Pathophysiology. D. W. Seldin & G. Giebisch, Eds. 1595-1613. Raven Press. New York, N.Y. 1992.
- ROBERTSON, G. L. The regulation of vasopressin function in health and disease. Recent Prog. Horm. Res., v. 33, p.333-74, 1977.
- ROMERO, L.M. AND SAPOLSKY, R. M. Patterns of ACTH secretion in response to psychological stimuli. J.Neuroendocr. 8, 243-258. 1996.
- ROTH, K. A.; WEBER, E.; BARCHAS, J. D. Immunoreactive corticotropin releasing factor (CRF) and vasopressin are co localized in a subpopulation of the immunoreactive vasopressin cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Life Sci., v. 31, p. 1857-60, 1982.
- RUHMANN- WENNHOLD, A.; NELSON, D. H. Plasma ACTH in stressed and no stressed adrenalectomized rats. Ann N.Y. Acad. Sci., v. 297, p. 498-508, 1977.
- SAFFRAN, M., SCHALLY, A.V. Release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. Can. J. Biochem. Physiol. 33: 408-415. 1955.

- SAWCHENKO, P.E.; SWANSON, L. W. Localization, co localization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. Fed. Proc., v. 44, p. 221-7, 1985.
- SAWCHENKO, P.E.; SWANSON, L.W.; VALE, W.W. Corticotropin releasing factor : co-expression within distinct subjects of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus in the male rat. J. Neurosci., v.4, p.1118-22, 1984.
- SAYERS, G., SAYERS, M.A. The pituitary-adrenal system. Recent Prog. Horm. Res. 2: 81-115. 1948.
- SCOTT-YOUNG, W.; MEZEY, E.; SIEGEL, R.E. Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. Neurosci. Lett. V. 70, p. 198-203, 1986.
- SMITH, P.E. Disabilities caused by hypophysectomy and their repair: tuberal (hypothalamic) syndrome in rats. J. Am. Med. Assoc. v. 88: 158-161. 1927.
- SPINEDI, E.; GIACOMINI, M.; JACQUIER, M. C.; GAILLARD, R. C. Changes in hypothalamo-corticotrope axis after bilateral adrenalectomy: evidence for a median eminence site of glucocorticoid action. Neuroendocrinology, v. 53, p.160-70, 1991.
- STARK, R.I.; WARDLAW, S.L.; DANIEL, S.S.; HUSAIN, M. K.; SANOCKA, U.M.; JAMES, L.S.; WIELE, R.V.L. Vasopressin secretion induced by hypoxia in sheep: developmental changes and relationship to endorphin release. Am. J. Obstet. Gynecol., v. 143, n2, p. 204-15, 1982.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVIER, J.; VALE, W.W. Organization of ovine-corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology, v. 36, p. 165-86, 1983.
- TRAMI, G.; CROIX, C.; PILLEZ, A. Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. Neuroendocrinology, v. 37, p. 467-9, 1983.

- TSAGARAKIS, S.; GILLIES, G.; REES, L.H.; BESSER, M.G.; GROSSMAN, A. Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotropin releasing factor from rat hypothalamus. Neuroendocrinology v. 49, p. 98-101, 1989.
- VALE, W., SPIESS, J., RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science 213:1394-1397. 1981.
- VALE, W.; VAUGHAM, S.; YAMAMOTO, G.; RIVIER, J.; RIVIER, C. Effects of synthetic ovine corticotropin releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides and other substances on cultured corticotropic cells. Endocrinology, v. 113, p. 657-62, 1983.
- VANDESANDE, F.; DIERICKX, K.; DEMEY, J. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibers of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. Cell. Tissue Res. V. 180, p. 443-52, 1977.
- VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. In: Jaffe B.M., Berhman H.R. Methods of hormone radioimmunoassay. New York, Academic Press, 39:767-792. 1979.
- WATABE, T.; TANAKA, K.; KUMAGAE, M.; ITOH, S.; KOGURE, M.; HASEGAWA, M.; HORIUCHI, T.; MORIO, K.; TAKEDA, F.; UBUKATA, E.; MYIABE, S.; SHIMIZU, N. Role of endogenous arginine-vasopressin in potentiating corticotropin-releasing hormone stimulate corticotropin secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Med., v. 06, p. 1132-7, 1988.
- WEIDENFELD, J.; FELDMAN, S. Effect of hypothalamic norepinephrine depletion on median eminence CRF-41 content and serum ACTH in control and adrenalectomized rats. Brain Res., v. 542, p. 201-4, 1991.
- WHITNALL, M. H. Distributions of pro-vasopressin expressing and provasopressin deficient neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of colchicines-treated normal and adrenalectomized rats. J. Comp. Neurol. V. 275, p. 13-28, 1988.

- WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. Prog. Neurobiol. 40, 573-629, 1993.
- WHITNALL, M.H.; KEY, S.; GARNER, H. Vasopressin containing and vasopressin deficiency subpopulations of corticotropin-releasing factor axons are differentially affected by adrenalectomy. Endocrinology, v. 120, p. 2108-2, 1987.
- WIDMAIER, E.P.; DALLMAN, M.F. The effects of corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin secretion from perfused pituitaries in vitro: rapid inhibition by glucocorticoids. Endocrinology, v. 115, p. 2368-74, 1984.
- WIEGAND, S.J.; PRICE, J.L. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in rat. J. Comp. Neurol. V. 192, p. 1-9, 1980.
- WOLFSON, B.; MANNING, R. W.; DAVIS, L.G.; ARENTZEN, P. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA in neurons after adrenalectomy. Nature, v. 315, p.59-61, 1985.
- WYNN, P. C., HAUGER, R. L., HOLMES, M. C., MILAN, M. A., CATT, K. J., AGUILERA, G. Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. Peptides 5: 1077-1084, 1986.

ANEXO

Tabela 1- Valores individuais de Corticosterona plasmática (ug/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, em condições basais, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	Controle	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo		3hs	3 hs	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	0,7	16,0	0,4	1,6	0,4	1,8	0,4	0,9	0,4	0,9	0,4
	1,4	39,0	0,4	1,9	0,4	1,4	0,4	2,7	0,5	2,9	1,2
	1,8	22,0	0,4	1,9	0,4	0,4	0,4	2,1	0,6	1,9	0,5
	1,0	35,0	0,4	2,2	0,4	0,4	0,7	2,0	0,4	2,7	0,4
	1,2	9,6	0,4	0,6	0,4	0,5	0,4	1,8	0,7	2,3	0,7
	1,4	24,0	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	1,7	0,7	1,4	0,8
	1,9	7,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	2,9	0,4	0,6	0,4
	1,8	4,3	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	1,1
	0,4	1,9	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	2,0	0,4
	1,2	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	1,2	0,4
	0,4	15,8	0,4	0,4	0,4		0,4	1,4	0,4	0,7	1,3
	0,3	2,0	0,4	0,4	0,4		0,4	0,4	0,4	1,1	2,6
	0,9	4,1	0,4	0,4	0,4		0,4		0,6	2,7	0,4
	0,4	16,9	0,4	2,0	0,4				0,4	2,3	0,6
	0,8	3,7	0,4	2,28	0,4				0,8	1,4	0,5
			0,4	0,4	0,4						0,4
			0,4	0,7	0,4						0,4
			0,4		0,4						0,4
					0,4						0,4
					0,4						0,4
X	1,0	13,5	0,4	1,0	0,4	0,6	0,4	1,5	0,5	1,6	0,6
DP	0,5	12,1		0,7		0,5	0,008	0,9	0,1	0,7	0,5
EPM	0,1	3,1		0,1		0,1	0,02	0,2	0,03	0,2	0,1

Tabela 2 - Valores individuais de ACTH plasmático (pg/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, em condições basais, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	Controle	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX
Tempo		3 hs	3 hs	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	24,2	103,2	400	98,8	268	71,2	14375	40,2	1100	53,7	2414
	28,9	227,5	340	87,0	280	109,3	700	45,5	13000	62,2	1250
	25,6	175,0	490	98,0	268	78,7	950	59,5	1500	53,4	1328
	26,1	52,5	270	70,0	302	73,5	850	40,2	17500	38,5	1328
	18,4	162,7	337	63,9	238	52,5	780	40,7	13350	91,0	1079
	22,6	91,0	370	34,9	217			61,0	17430	55,4	781
	24,5	45,0	298	42,0	196			33,2	16000	38,5	1278
	59,6	41,0	274	84,7	350			47,2	23750	28,0	1136
		52,3	487	52,0	213			55,9	750	15,1	
		244,7	300	59,5	194			43,7	400	28,0	
		69,3	462	38,5	252			39,9	906	21,0	
		36,7	310	38,0	244			36,3	906	40,2	
		210,0	325	45,5	242			47,2	954		
		54,2	531	55,8	285			42,7	650		
			356		227				275		
			525		214						
			400		220						
			356								
X	28,7	111,8	379	62,5	248	77,0	943,5	45,2	1170	43,7	1324
DP	12,8	76,0	85,4	22,4	41	20,5	291,1	8,3	566	20,9	476
EPM	4,5	20,3	20,1	5,9	9,9	9,1	130,2	2,2	146	6,0	168

Tabela 3 - Valores individuais de AVP plasmática (pg/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, em condições basais, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	Controle	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo		3 hs	3 hs	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	6,5	6,5	9,2	5,1	7,5	3,4	10,2	5,5	7,0	6,9	4,1
	5,6	5,9	7,2	6,7	13,1	7,7	6,7	5,6	8,2	5,4	8,1
	6,2	7,1	8,0	6,7	8,7	10,7	8,7	7,6	4,2	7,7	8,4
	10,5	5,5	6,2	3,0	7,3	6,8	3,8	7,0	7,0	5,1	5,4
	5,5	6,2	9,4	3,9	6,8	5,8	2,7	3,0	7,9	2,6	4,7
	7,0	7,7	7,3	3,8	6,6	13,4	4,3	5,6	3,8	5,5	8,3
	5,0		5,4	5,8	3,9	6,8	3,4	5,2	5,7	4,2	5,0
	5,3			6,4	6,3	2,9	3,0		7,5	5,2	5,8
	6,2			3,5	4,5	1,9	3,6			6,5	4,0
	7,2			4,9	4,2	4,0	2,3			4,5	4,3
	6,4			4,5	4,2	5,1	3,4				2,7
	4,9				3,6	3,1					5,7
	4,6					2,6					5,2
	2,6					2,1					
	7,2										
	7,6										
	3,7										
	6,8										
X	6,0	6,4	7,5	4,9	6,3	5,4	4,7	5,6	6,4	5,3	5,5
DP	1,7	0,8	1,4	1,3	2,6	3,3	2,6	1,4	1,6	1,4	1,7
EPM	0,4	0,3	0,5	0,3	0,7	0,9	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4

Tabela 4 - Valores individuais de OT plasmática (pg/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX- S e ADX, em condições basais, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	Controle	ADXs	ADX	ADXs	ADX	ADXs	ADX	ADXs	ADX	ADXs	ADX
Tempo		3 hs	3 hs	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	22,0	32,4	57,3	25,2	29,4	27,0	45,0	29,1	75,9	40,8	28,6
	35,0	42,0	50,2	19,2	69,0	16,5	13,5	55,3	24,9	44,0	17,4
	25,0	26,1	52,5	21,0	41,4	25,0	10,3	21,6	31,2	23,1	25,8
	13,0	27,0	33,3	32,4	112,2	24,0	10,2	52,5	23,7	21,9	50,4
	16,0	80,7	74,4	23,4	37,8	19,0	36,0	42,0	32,1	45,0	12,0
	17,0	37,8	52,8	26,4	78,6			31,5	17,1	85,8	12,0
	44,0	43,5	30,3	60,9	35,1			30,3	25,8	10,4	59,0
		44,3	83,4	33,0	27,0			35,7	30,3	11,5	
		27,0	42,9		21,0						
			65,4								
X	22,7	53,4	72,3	34,1	52,0	20,7	21,0	52,1	43,5	45,7	34,8
DP	11,0	22,5	22,4	17,6	40,2	3,2	16,9	18,6	24,2	34,4	22,0
EPM	4,1	7,5	7,1	5,1	11,1	1,4	7,5	6,5	8,5	12,2	8,3

Tabela 5 - Valores individuais de **Osmolalidade plasmática (mOsm/Kg)**, em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, média dos ADX-S e ADX, em condições basais, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	Controle	ADX-S	ADX	ADX	ADX	ADX	ADX
Tempo		3 hs	3 hs	1 d	3 d	7 d	14 d
	296	309	304	294	289	290	294
	312	301	285	286	285	287	295
	287	295	282	287	281	283	287
	286	301	286	292	275	283	278
	287	292	284				289
	295	286					278
	294	289					278
		295					285
X	293,9	296,1	288,2	289,8	282,5	285,8	285,5
DP	9,9	7,4	8,9	3,8	5,9	3,4	7,0
EPM	3,4	2,6	4,0	1,9	2,9	1,7	2,5

Tabela 6 - Valores individuais de Corticosterona plasmática (ug/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, submetidos ao estresse de imobilização, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	40,0	0,4	40,0	1,0	40,0	0,2	40,0	0,9
	40,0	0,3	40,0	0,7	40,0	1,1	40,0	0,4
	21,5	0,1	34,2	1,0	40,0	0,5	40,0	0,1
	16,9	0,1	19,9	1,0	40,0	0,2	40,0	0,9
	40,0	0,1	40,0	0,8	40,0	1,0	40,0	
	40,0	0,5	40,0		34,0	0,5	9,7	
	22,5	0,3	40,0		40,0	0,3	40,0	
X	31,5	0,2	36,3	0,9	39,1	0,5	35,6	0,5
DP	10,6	0,1	7,5	0,1	2,2	0,3	11,4	0,3
EPM	4,0	0,06	2,8	0,06	0,8	0,1	4,3	0,1

Tabela 7 - Valores individuais de ACTH plasmático (pg/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, submetidos ao estresse de imobilização, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo/	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	490,0	310,0	334,0	340,0	585,0	990,0	1610,0	975,0
	560,0	270,0	377,6	396,9	665,0	1748,0	976,5	1050,0
	577,5	245,0	118,3	718,7	602,0	1300,0	288,7	2500,0
	171,5	298,2	462,2	1037,0	770,0	980,0	735,0	1080,0
	239,4	355,0	490,0	780,0	472,5	1313,0	735,0	1136,0
	735,0	320,0	654,5	1242,0	616,0	1250,0	70,0	1550,0
	1090,6	190,0	770,0		224,0		735,0	
X	552,0	284,0	458,1	752,4	562,1	1264	735,7	1382
DP	308,4	54,4	213,8	351,9	173,8	280,7	494,2	584,1
EPM	116,6	20,5	80,8	143,6	65,6	114,6	186,8	238,4

Tabela 8 - Valores individuais de AVP plasmática (pg/dl), em $X \pm DP \pm EPM$, em animais Controle, ADX-S e ADX, submetidos ao estresse de imobilização, em diferentes períodos após cirurgias.

Animais	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX	ADX-S	ADX
Tempo	1 d	1 d	3 d	3 d	7 d	7 d	14 d	14 d
	3,0	4,3	5,1	4,8	6,9	3,8	5,6	5,6
	6,6	7,0	5,1	13,6	3,2	6,8	5,6	8,9
	7,0	7,1	6,5	5,6	5,9	2,0	3,0	4,8
	7,0	3,2	2,8	7,0	2,8	4,8	9,3	7,3
	5,4	6,0	7,4	6,0	7,4	7,0	6,4	3,1
	4,4	7,0	4,8	6,6	6,4	2,0	5,8	2,0
	4,4	7,6	5,1		5,7	4,8	3,5	
X	5,4	6,0	5,2	7,2	5,4	4,4	5,6	5,2
DP	1,5	1,6	1,4	3,1	1,7	2,0	2,0	2,5
EPM	0,5	0,6	0,5	1,3	0,6	0,7	0,7	1,0