

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EXPRESSÃO DA IMUNORREATIVIDADE À TIROSINA
HIDROXILASE NO HIPOTÁLAMO DE RATOS MACHOS ADULTOS
SUBMETIDOS À MANIPULAÇÃO NEONATAL**

Erica do Espírito Santo Hermel

PORTO ALEGRE

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EXPRESSÃO DA IMUNORREATIVIDADE À TIROSINA
HIDROXILASE NO HIPOTÁLAMO DE RATOS MACHOS ADULTOS
SUBMETIDOS À MANIPULAÇÃO NEONATAL

Erica do Espírito Santo Hermel

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Aprovada em 5 de março de 2001 pela banca examinadora:

Prof. Dra. Matilde Achaval Elena (UFRGS)

Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia-Filho (FFFCMPA)

Prof. Dra. Janete Anselmo-Franci (USP-Ribeirão Preto)

PORTO ALEGRE

2001

"Cada caminho é apenas um entre um milhão de caminhos. Você deve ter sempre em mente que um caminho é apenas um caminho. Se achar que deve segui-lo, agora, deve fazê-lo. Qualquer caminho é apenas um caminho. Não há nenhuma afronta a você mesmo ou a qualquer um se abandonar um caminho porque sua mente lhe diz para fazê-lo (...) A única questão é se o caminho tem um significado. Se o tiver, é um bom caminho. Se não, não tem utilidade".

Carlos Castañeda
Antropólogo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aldo Bolten Lucion pela oportunidade e pela orientação.

Aos Professores Matilde Achaval Elena, Alberto Rasia-Filho e Janete Anselmo-Franci pela participação na avaliação desse trabalho.

A Márcia Giovenardi pelos ensinamentos e incentivo no período da Iniciação Científica.

A Gabriela Severino, Ana Lúcia e Francine pela ajuda na parte prática desta pesquisa.

A Gabriela Pereira pelo apoio e amizade nos bons e maus momentos.

A Maria, Miriam e Uira pela disposição e ajuda.

Aos professores que ajudaram a formular o conhecimento ao longo do curso.

A todos os colegas de laboratório pelo incentivo, amizade e cooperação.

Aos parentes e amigos pelo carinho e apoio indispensáveis.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Estresse	1
Estimulação Neonatal	2
1.2- Sistema Dopaminérgico	4
1.2.1- Ontogenia dos Neurônios Dopaminérgicos.....	5
1.2.2- Distribuição	6
1.2.3- Dopamina e Estresse	8
1.2.4- Dopamina e Estimulação Neonatal	9
1.3- Tirosina Hidroxilase	9
1.4- Áreas Hipotalâmicas	10
1.4.1- Núcleo Arqueado do Hipotálamo	11
1.4.2- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo	12
1.4.3- Núcleo Periventricular do Hipotálamo	14
1.5- Detecção Imunohistoquímica	15
2- OBJETIVO	17
Objetivos Específicos	17
3- MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1- Animais	19
3.2- Estimulação Neonatal	19
3.3- Preparação do Tecido	21
3.4- Procedimento Imunohistoquímico.....	21
3.5- Coleta de Dados	22
3.6- Análise Estatística	23
4- RESULTADOS	28
4.1- Imunorreatividade à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos	

adultos.....

28

4.2- Imunorreatividade em outras áreas hipotalâmicas e extrahipotalâmicas...	34
4.3- Contagem de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase	34
5- DISCUSSÃO	39
6- CONCLUSÃO	45
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média \pm EPM do número total estimado de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral) em cortes coronais dos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos não manipulados (controle) e manipulados nos 10 primeiros dias de idade. Entre parênteses está o número de animais (N). 35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Modelo de manipulação neonatal..... 20
- Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo arqueado do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -2,12 a -4,30 mm. AH: hipotálamo anterior, ArcD: núcleo arqueado região dorsal, ArcM: região medial, ArcL: região lateral, DMD: hipotálamo dorsomedial, DTM: área tuberomamilar dorsal, ME: eminência média, Pe: núcleo periventricular, PMV: núcleo pré-mamilar ventral, VMH: hipotálamo ventromedial, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).25
- Figura 3. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -0,80 a -2,12 mm. Arc: núcleo arqueado, ME: eminência média, MPA: área pré-óptica medial, MPO: núcleo pré-óptico medial, PaAM: núcleo paraventricular, região magnocelular anterior, PaAP: região parvocelular anterior, PaLM: região magnocelular lateral, PaMP: região parvocelular medial, PaPo: núcleo paraventricular posterior, Pe: núcleo periventricular, Sch: núcleo supraquiasmático, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).26
- Figura 4. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo periventricular do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -0,26 a -3,60 mm. ArcD: núcleo arqueado dorsal, ArcM: núcleo arqueado medial, ArcL: núcleo arqueado lateral, HP: hipotálamo posterior, ME: eminência média, MPA: área pré-óptica medial, MPO: núcleo pré-óptico medial, PaAM: núcleo paraventricular, região magnocelular anterior, PaAP: região parvocelular anterior, PaMP: região parvocelular medial, PaPo: núcleo paraventricular posterior, Pe: núcleo periventricular, Sch: núcleo supraquiasmático, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).27
- Figura 5. Cortes coronais de cérebro mostrando neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (cabeças de setas) nos núcleos (A) paraventricular: PVN, (B)

arqueado: ARC e (C) periventricular: PE do hipotálamo de ratos machos adultos manipulados (A,C) e não-manipulado (A). 3V: terceiro ventrículo, ME: eminência média. Aumento: 100x. 30

Figura 6. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo arqueado (ARC) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. 3V: terceiro ventrículo. Aumento: 400x..... 31

Figura 7. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo paraventricular (PVN) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. Aumento 400x..... 32

Figura 8. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo periventricular (PE) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. 3V: terceiro ventrículo. Aumento: 400x..... 33

Figura 9. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral)..... 36

Figura 10. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral). 37

Figura 11. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo periventricular do hipotálamo em ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral) 38

ABREVIATURAS

A11	Células dopaminérgicas A11
A12	Sistema Dopaminérgico Tuberoinfundibular
A13	Sistema Dopaminérgico Incertohipotalâmico
A14	Sistema Dopaminérgico Periventricular
ABC	Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
ACTH	Corticotrofina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAB	Diaminobenzidina
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
5-HT	5-Hidroxitriptamina
NA	Noradrenalina
PBS-T 0.4%	Tampão Fosfato Salino mais Triton X-100 0,4%
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferase
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Neurovegetativo Simpático
TH-IR	Imunorreatividade à Tirosina Hidroxilase

RESUMO

A estimulação neonatal tem sido utilizada como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e endócrinas estáveis. A estimulação neonatal consiste na manipulação dos animais por alguns minutos diariamente durante os primeiros dias de vida. Esse procedimento provoca, na vida adulta, uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam pela diminuição do medo a ambientes novos e uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal quando os animais são expostos a estímulos estressantes. A dopamina é um neurotransmissor que atua no sistema nervoso central, onde está envolvida na integração de vários aspectos da função neuroendócrina, como, por exemplo, um regulador na secreção de prolactina e do hormônio liberador de corticotrofina. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da manipulação neonatal sobre o sistema dopaminérgico através da quantificação de neurônios contendo tirosina hidroxilase, a enzima inicial e limitante da síntese de catecolaminas, em núcleos hipotalâmicos. Ratos machos Wistar foram divididos em dois grupos. Um grupo foi submetido à manipulação por um minuto, uma vez por dia, durante os dez primeiros dias de vida (grupo manipulado) e outro grupo não sofreu manipulação (grupo não-manipulado, controle). Aos 75-80 dias, os animais foram anestesiados, perfundidos e os cérebros processados para a detecção imunohistoquímica da tirosina hidroxilase. Foi utilizado um anticorpo monoclonal contra tirosina hidroxilase e o método indireto avidina-biotina-peroxidase. A quantificação da expressão da tirosina hidroxilase consistiu na contagem dos neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo em cada indivíduo. A média \pm EPM do número de neurônios positivos para tirosina hidroxilase de todos os indivíduos foi comparada entre os grupos manipulado e não-manipulado através do teste t de Student. Não houve diferença significativa no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos entre os animais do grupo manipulado e controle não-

manipulado. O estudo mostrou que a manipulação neonatal não se constituiu num estímulo suficiente para promover alterações no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos.

ABSTRACT

Neonatal stimulation has been used as an experimental model to investigate the mechanisms by which changes in the animal early environment affect the development of the neural systems, originating neuroendocrinal and behavioral alterations. Neonatal stimulation usually consists of the handling of the pups for a few minutes daily during the first ten days of life. As adults, handled rats exhibited attenuated fearfulness in novel environments and a less pronounced increase in the secretion of the adrenal glucocorticoids in response to a variety of stressors. Dopamine is a neurotransmitter that acts in the central nervous system, where it is involved in integration of many aspects of the neuroendocrinal function, as, for example, a regulator of the prolactin and corticotropin-releasing-hormone secretion. The objective of the present study was to investigate the role of neonatal handling in the dopaminergic system through the semi-quantification of tyrosine hydroxylase-containing neurons, the initial and rate-limiting enzyme involved in catecholamines synthesis, in the hypothalamic nuclei. Male Wistar rats were divided into two groups. In one group animals were handled for one minute once a day, during the first ten days of life (handled group), and in the other group, animals were not handled (control, non-handled group). At 75-80 days, the animals were anesthetized, perfused, and the brains were processed for immunohistochemistry. A monoclonal antibody anti-tyrosine hydroxylase and the avidin-biotin-peroxidase indirect method were used. The semi-quantification of the tyrosine hydroxylase-positive (TH-IR) neurons consisted of counting the positive neurons in the arcuate, paraventricular, and periventricular nuclei of the hypothalamus in each individual. The mean \pm SEM number of tyrosine TH-IR neurons of the individuals was compared between handled and non-handled groups by the Student's t test. No significant change in the number of TH-IR neurons in the arcuate, paraventricular, and periventricular nuclei of the hypothalamus were observed in adult male rats. The present study demonstrated that neonatal handling was not able to cause changes of the number of tyrosine hydroxylase-positive neurons in the arcuate, paraventricular, and periventricular nuclei of the hypothalamus in adult male rats.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Estresse

Os organismos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio dinâmico e complexo, denominado homeostase, que é constantemente ameaçado por estímulos adversos intrínsecos e/ou extrínsecos (CHROUSOS & GOLD, 1992). Nas situações de ameaça ou perigo os organismos desencadeiam uma série de respostas adaptativas, denominadas sistemas de estresse, que consistem em um repertório de respostas fisiológicas e comportamentais que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes na tentativa de restabelecer a homeostase (CHROUSOS & GOLD, 1992; CULLINAM *et al.*, 1995; STRATAKIS & CHROUSOS, 1995; CHROUSOS, 1998).

O conceito de estresse é multidimensional e constituído de três elementos principais: 1) o estímulo estressante, 2) o sistema de processamento do estímulo, que inclui as experiências de estresse subjetivas, e 3) a resposta ao estímulo estressante. Esses três elementos interagem entre si, por isso não podem ser vistos como estáticos (URSIN & OLFF, 1993).

Algumas das respostas aos estímulos estressantes incluem o aumento do tônus cardiovascular (frequência cardíaca, pressão arterial), da frequência respiratória, do metabolismo intermediário (gliconeogênese, lipólise), do estado de vigília, da atenção, da analgesia, da liberação de cortisol e de catecolaminas no sangue e inibição das funções vegetativas como a reprodução, a digestão, a imunidade e o crescimento (CHROUSOS & GOLD, 1992; URSIN & OLFF, 1993; CHROUSOS, 1998).

A ativação dessas respostas adaptativas é coordenada pelo sistema de estresse. Esse sistema é composto pelo sistema nervoso central (SNC), que inclui o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) liberado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a noradrenalina (NA) liberada, principalmente, pelo *locus coeruleus*, pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e pelo sistema neurovegetativo simpático (SNS). A ativação do eixo HPA provoca a liberação do CRH pelo PVN, de corticotrofina (ACTH) pela adenohipófise e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal; a ativação do SNS libera adrenalina e NA nos terminais

simpáticos e pela medula da adrenal na corrente sanguínea (MELIA, 1991; CHROUSOS & GOLD, 1992; STRATAKIS & CHROUSOS, 1995).

Estimulação Neonatal

Estímulos ambientais durante o período neonatal têm efeitos duradouros sobre o comportamento emocional e reatividade ao estresse em animais adultos (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964). A estimulação neonatal tem sido utilizada como um modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais mudanças ambientais precoces podem afetar os sistemas neurais levando a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964). Em ratos, a estimulação neonatal consiste da manipulação dos filhotes, geralmente por alguns minutos, durante as primeiras duas semanas de vida. Na vida adulta, esse procedimento aparentemente inofensivo na infância reduz o medo a ambientes novos e a secreção de corticosterona em resposta a estressores (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). Além disso, após o estresse, as concentrações deste hormônio em ratos manipulados retornam ao nível basal mais rapidamente do que em animais não-manipulados (HESS *et al.*, 1969).

As duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem no cérebro neste período (MISTRETTA & BRADLEY, 1978).

Manipular os filhotes durante esse “período crítico” pode afetar a liberação hormonal (corticosterona e ACTH) diante de estressores e o comportamento dos animais por toda sua vida (GOULD, 1994; LEVINE, 1994). Assim como a corticosterona, observa-se que ratos adultos manipulados na infância apresentam uma liberação de ACTH menor do que animais não-manipulados diante de uma situação de estresse (MEANEY *et al.*, 1993). Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não-manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (LEVINE, 1994). Foi também demonstrado que ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo (MEANEY *et al.*, 1993;

SAPOLSKY, 1994). Assim, o sinal de retroalimentação negativa associado aos níveis de corticosterona basais inibe a atividade do eixo HPA de uma forma mais intensa nos animais manipulados do que em animais não-manipulados, sugerindo que o aumento do número de receptores glicocorticóides no hipocampo é um fator crítico para o efeito da manipulação neonatal na função do eixo HPA (PLOTSKY & MEANEY, 1993). Essa seria uma causa das diferenças entre animais estimulados e não-estimulados na infância quando submetidos ao estímulo estressor na vida adulta (MEANEY *et al.*, 1994; BHATNAGAR & MEANEY, 1995).

No rato adulto, a resposta ao estresse é caracterizada por um aumento dos níveis de ACTH e corticosterona (SAPOLSKY & MEANEY, 1986). Diferentemente do que acontece com os animais adultos, durante as primeiras duas semanas de vida os níveis basais de ACTH e de corticosterona são muito baixos, ocorrendo apenas uma discreta elevação após um estímulo ambiental. Outros tipos de estimulação no período de amamentação incluem, por exemplo, expor os filhotes ao frio (0°C), este estímulo seria considerado estressor para um rato adulto, no entanto, no animal neonatal provoca apenas discreta ou nenhuma alteração dos hormônios clássicos do estresse como o ACTH e a corticosterona (WALKER *et al.*, 1986). Por esse motivo esse período é conhecido como período hiporresponsivo ao estresse (WALKER *et al.*, 1986; SAPOLSKY & MEANEY, 1986; GOULD, 1994; LEVINE, 1994). Assim, grupos de pesquisadores que trabalham nessa área consideram os estímulos aos quais os animais são submetidos no período neonatal apenas como estimulação sensorial, não os caracterizando como estressores, mesmo que assim o sejam considerados em um animal adulto (LEVINE, 1994).

Durante o período hiporresponsivo ao estresse (do 2° ao 14° dia pós-parto no rato), tanto as estimulações aparentemente inofensivas como a manipulação, quanto estímulos estressores como frio e choque elétrico induzem praticamente às mesmas alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (LEVINE, 1994). Uma possível causa para o padrão comportamental e endócrino observado na vida adulta do rato manipulado no período neonatal pode ser o comportamento da mãe em relação ao filhote, que afeta o desenvolvimento do sistema nervoso deste. A manipulação, ou qualquer outra estimulação no período neonatal, provoca um distúrbio da relação mãe-filho. Mães de animais manipulados na

infância costumam lambe mais seus filhotes do que as de animais não-manipulados e alguns trabalhos demonstraram que filhotes privados da mãe no período neonatal apresentaram aumento das secreções de corticosterona e ACTH (STANTON, GUTIERREZ & LEVINE, 1988; KHUN, PAUK & SCHANBERG, 1990; ROSENFELD *et al.*, 1991; LEVINE *et al.*, 1991; SUCHECKI *et al.*, 1993).

Há estudos demonstrando que a manipulação neonatal em ratos pode influenciar o número de neurônios encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central. Na amígdala medial, promove uma diminuição no número de neurônios aos 11 e 90 dias de idade em ratos machos e fêmeas, e no córtex frontal, uma diminuição no número de neurônios nas camadas 2 e 3 em ratos de 11 dias de idade de ambos os sexos (LUCION *et al.*, 1999). WINKELMANN *et al.* (2000) demonstraram que a manipulação neonatal foi responsável por uma diminuição no número de neurônios no *locus coeruleus* de ratas no período peripuberal. PEREIRA (2000) ao estudar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios imunorreativos à somatostatina no núcleo periventricular do hipotálamo de ratos machos de 11 dias de idade observou uma diminuição no número de neurônios somatostatinérgicos nesse núcleo. MEANEY & AITKEN (1985) sugeriram que uma maior concentração de receptores glicocorticóides, verificada no hipocampo de ratos adultos que sofreram manipulação neonatal, pode ser resultado de um aumento no número de neurônios hipocampais, o que confirmaria a influência deste modelo na neurogênese do hipocampo.

Independente da origem precisa, o que há de fato são alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis induzidas por estimulação sensorial neonatal que se manifestam na vida adulta. A maioria dos trabalhos descritos na literatura procuram correlacionar a manipulação neonatal com alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, mas outros sistemas neurais podem estar sendo afetados por essa estimulação.

1.2- Sistema Dopaminérgico

A dopamina (3,4 dihidroxifeniletilamina), que pertence ao grupo das catecolaminas, é um importante transmissor do sistema nervoso central dos mamíferos onde atua no controle das funções motoras, no feto e na integração neuroendócrina (MOOS & RICHARD, 1982; BUIJS *et al.*, 1984; COOPER,

BLOOM & ROTH, 1991; REICHLIN, 1998). Através do uso com técnicas histoquímicas de fluorescência foi possível determinar a distribuição anatômica da dopamina e observar sua localização específica em sistemas complexos de neurônios no cérebro (CARLSSON, FALCK & HILLARP, 1962; DAHLSTRÖM & FUXE, 1964; FUXE, 1965). Mais da metade dos neurônios catecolaminérgicos presentes no sistema nervoso central são dopaminérgicos e sua distribuição é nitidamente diferente daquela dos neurônios noradrenérgicos (LOIZOU, 1972; COYLE & HENRY, 1973; COOPER *et al.*, 1991; BLOOM, 1996). Desse modo surgiu a proposta de que a dopamina teria um papel biológico independente de sua função como precursora da síntese de noradrenalina (BLASCHKO, 1957; BERTLER & ROSENGREN, 1959a, 1959b; HORNYKIEWICZ, 1966; COOPER *et al.*, 1991).

1.2.1- Ontogenia dos Neurônios Dopaminérgicos

As catecolaminas são formadas no cérebro, células cromafinas e gânglio simpático a partir de seu precursor tirosina por uma seqüência de passos enzimáticos (COOPER *et al.*, 1991). Aos 15 dias de gestação, encontram-se neurônios catecolaminérgicos no cérebro do rato, que parecem ser funcionais aos 18 dias de gestação (COYLE & HENRY, 1973) e as quantidades plasmáticas de dopamina aumentam progressivamente com a idade até a vida adulta (AGRAWAL, GLISSON & HIMWICH, 1966; LOIZOU & SALT, 1970).

Alguns estudos têm demonstrado a ontogênese dos neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase no hipotálamo (DAIKOKU *et al.*, 1986; UGRUMOV *et al.*, 1989). No núcleo arqueado, os neurônios primeiro diferenciam-se na região ventro-lateral em torno dos 18 dias de gestação. Eles aumentam em número com o desenvolvimento e estendem-se dorsalmente à área periventricular do núcleo aos 20 dias de gestação. Após o nascimento, a população de neurônios espalha-se pela região periventricular do núcleo juntando-se anterodorsalmente com os neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase na região periventricular do hipotálamo anterior desenvolvidos inicialmente aos 15-16 dias de gestação e pelos 10-20 dias após o nascimento, coincidindo com o animal adulto (DAIKOKU *et al.*, 1986). No núcleo paraventricular, aos 18 dias de gestação podem-se observar neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase que confundem-se com

os neurônios da zona incerta, hipotálamo posterior e dorsomedial. Somente no 9º dia de idade, essas populações neuronais tornam-se distintas (UGRUMOV *et al.*, 1989). No núcleo periventricular, os neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase surgem em torno dos 15 dias de gestação, aumentando em número até o 2º dia de idade, diminuindo em número posteriormente até atingir a quantidade da vida adulta (DAIKOKU *et al.*, 1986).

Assim que surgem os primeiros neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase, eles tornam-se mais vastamente distribuídos por todo o hipotálamo, ocupando suas posições definitivas em torno do 9º dia de idade. Concomitantemente à migração e agregação, os neurônios catecolaminérgicos sofrem diferenciação morfológica, muitas vezes aumentando em tamanho e dando origem a muitos processos longos e altamente ramificados (UGRUMOV *et al.*, 1989).

1.2.2- Distribuição

Os neurônios dopaminérgicos estão distribuídos em vários sistemas locais com projeções topograficamente organizadas e altamente específicas. Eles parecem variar anatomicamente de um sistema de neurônios sem axônios (retina, bulbo olfatório) e com projeções muito restritas a sistemas com extensivas arborizações axonais (MOORE & BLOOM, 1978).

No sistema nigro-striatal, os neurônios dopaminérgicos da substância nigra projetam-se ao neostriado (caudado-putamen) (DAHLSTRÖM & FUXE, 1964; FUXE, 1965; UNGERSTEDT, 1971; MOORE & BLOOM, 1978; COOPER *et al.*, 1991). Esses neurônios têm um importante papel no controle das funções motoras somáticas (BERTLER & ROSENGREN, 1959a, 1959b; REICHLIN, 1998). As degenerações dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra causam uma diminuição de dopamina nas fibras nigro-estriatais, cessando a atividade moduladora que essas fibras exercem sobre o circuito motor básico ao nível do neostriado, provocando as perturbações motoras que caracterizam a Síndrome de Parkinson (COOPER *et al.*, 1991).

No sistema tuberoinfundibular (tuberohipofisário), os neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado e do núcleo periventricular projetam-se para

a eminência média e para a hipófise (UNGERSTEDT, 1971; BJÖRKLUND *et al.*, 1973; MOORE & BLOOM, 1978; LUPPI *et al.*, 1986; COOPER *et al.*, 1991; REICHLIN, 1998). A dopamina é a principal catecolamina na hipófise e de origem central (BJÖRKLUND *et al.*, 1973; BJÖRKLUND & NOBIN, 1973; SAAVEDRA *et al.*, 1975). Sua presença na adenohipófise sugere que mecanismos monoaminérgicos podem estar envolvidos na regulação de certos hormônios no local (DAHLSTRÖM & FUXE, 1964). A dopamina é o mais importante fator inibidor da prolactina, estando presente nos vasos sanguíneos porta-hipofisários em concentração suficiente para inibir a liberação de prolactina (REICHLIN, 1998). PASSO *et al.* (1981) demonstraram que os neurônios dopaminérgicos hipofisários originados no núcleo arqueado podem inibir a liberação dos hormônios neurohipofisários por inibir a condução do impulso ao longo dos axônios neurosecretórios.

Nos sistemas mesocortical e mesolímbico, que conjuntamente podem ser chamados de sistema mesocorticolímbico, os neurônios dopaminérgicos que originam-se na área tegmental ventral projetam-se para o córtex límbico (áreas pré-frontal medial, cíngulada e entorinal) e para outras estruturas límbicas (as regiões do septo, tubérculo olfatório, núcleo accumbens septi, complexo amigdalóide e córtex piriforme), respectivamente (UNGERSTEDT, 1971; MOORE & BLOOM, 1978; COOPER *et al.*, 1991; REICHLIN, 1998). Esses sistemas influenciam o comportamento e o afeto (COOPER *et al.*, 1991; REICHLIN, 1998). Sua descoberta veio reforçar a chamada teoria dopaminérgica da esquizofrenia, segundo a qual sintomas psíquicos observados nessa doença resultariam de uma hiperatividade na transmissão dopaminérgica no sistema límbico e no córtex pré-frontal (COOPER *et al.*, 1991).

Outros sistemas dopaminérgicos são o sistema retiniano (os neurônios dopaminérgicos projetam-se das células interplexiformes da retina às camadas plexiformes externa e interna da retina), o sistema incertohipotálamico (onde os neurônios projetam-se da zona incerta e hipotálamo posterior à área hipotalâmica dorsal e ao septo), o sistema periventricular (cujos neurônios projetam-se da substância periaquedutal, do núcleo periventricular e do núcleo do trato solitário ao tegmentum, tectum, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal e periventricular) e o sistema do bulbo olfatório (cuja projeção é das células periglomerulares às glomerulares -células mitrais) (MOORE & BLOOM, 1978).

1.2.3- Dopamina e Estresse

Vários trabalhos têm demonstrado que estressores provocam alterações na quantidade de dopamina no cérebro. A síntese de dopamina no cérebro é aumentada por diferentes tipos de estresse em ratos e camundongos (THIERRY *et al.*, 1968; BLISS & AILION, 1971). O estresse por imobilização ativa a síntese de dopamina nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (WATANABE, 1984). THIERRY *et al.* (1976) demonstraram que o sistema dopaminérgico mesocortical é seletivamente ativado pelo estresse por choque nas patas e sugerem que esse sistema tem um papel crítico na regulação dos estados emocionais. NAKAMURA *et al.* (1992) sugeriram que os neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso central, particularmente o sistema dopaminérgico mesocortical, estão envolvidos não somente em mudanças emocionais, mas também na regulação de respostas induzidas por exposição aguda ao som e à vibração corporal. O estresse por imobilização seletivamente induz a um aumento na liberação de dopamina nas áreas límbicas (IMPERATO *et al.*, 1989). SUDHA & PRADHAN (1995) demonstraram que ratos imobilizados a 4°C por 2 horas apresentaram um aumento do metabolismo de dopamina no córtex pré-frontal, no núcleo accumbens e no estriado. Nesse mesmo estudo, ratos que sofreram apenas imobilização tiveram um incremento do metabolismo da dopamina somente no córtex pré-frontal, mostrando que o sistema dopaminérgico é sensível a estímulos estressores de diferentes intensidades.

PALKOVITS *et al.* (1975) demonstraram que, no núcleo arqueado, os estresses por imobilização, exposição ao frio e injeção de formalina reduziram a concentração de dopamina e o estresse por imobilização aplicado por 5 dias consecutivos aumentou a atividade da tirosina hidroxilase. Ao estudar a ativação de dois componentes do sistema simpatoadrenal (medula adrenal e nervos simpáticos) por diferentes estressores, KVETNANSKÝ *et al.* (1998) demonstraram que os estresses por imobilização e exposição ao frio aumentam as quantidades plasmáticas de dopamina.

1.2.4- Dopamina e Estimulação Neonatal

Alguns trabalhos na literatura têm relacionado o sistema dopaminérgico com a estimulação no período neonatal. ADAMS & MOGHADDAM (2000) observaram que a manipulação neonatal aumentou significativamente os níveis de dopamina na região septal. INGLIS & MOGHADDAM (1999) demonstraram que a manipulação por 20 minutos aumentou os níveis extracelulares de dopamina na amígdala basolateral, no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens e eles sugerem que a inervação dopaminérgica da amígdala pode ser mais responsiva ao estresse do que outras regiões inervadas por dopamina no sistema límbico, incluindo o córtex pré-frontal, e correlacionam a dopamina da amígdala aos processos normais e patofisiológicos de subservir a uma resposta do organismo ao estresse.

O isolamento no período neonatal também tem efeito sobre o sistema dopaminérgico. Ratos adultos, que foram isolados diariamente dos dias 2 a 9 pós-natal, quando colocados em um ambiente novo apresentaram uma taxa de renovação (*turnover*) da dopamina aumentada nas regiões hipotalâmicas e septal, que são parte do sistema límbico e recebem inervação da via dopaminérgica mesolímbica. Já o núcleo estriado, que recebe inervação da via dopaminérgica nigro-estriatal não apresentou diferença entre os ratos controle e isolados demonstrando que o sistema dopaminérgico nas várias estruturas cerebrais pode não responder da mesma forma a um mesmo estímulo (KEHOE *et al.*, 1998).

Assim como a estimulação no período neonatal, observa-se que o estresse aplicado no período pré-natal também tem efeitos sobre o sistema dopaminérgico na vida adulta. WANG *et al.* (1995) observaram que o estresse pré-natal pode resultar em um déficit na neurotransmissão dopaminérgica no núcleo accumbens e esse déficit pode possivelmente causar diminuição no comportamento sexual em ratos.

1.3- Tirosina Hidroxilase

A tirosina hidroxilase, que catalisa a conversão da tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) (NAGATSU *et al.*, 1964), é a primeira etapa e é o passo limitante da biossíntese das catecolaminas, dopamina e noradrenalina.

Essa etapa está sujeita à inibição pelo produto final (UDENFRIEND, 1966).

A tirosina hidroxilase já está presente no cérebro do rato aos 14-15 dias de gestação (COYLE & AXELROD, 1972; DAIKOKU *et al.*, 1986), mas cerca de 95% da sua atividade total surge após o nascimento (COYLE & AXELROD, 1972). Esse aumento pós-natal na atividade da enzima reflete o desenvolvimento e o crescimento dos terminais nervosos catecolaminérgicos (McGEER *et al.*, 1967). Assim, eventos como o parto, o desmame e a maturação sexual têm um considerável efeito sobre a disposição final dos neurônios catecolaminérgicos (COYLE & AXELROD, 1972).

A atividade da tirosina hidroxilase reflete uma combinação do ritmo de renovação e da densidade de terminais nervosos catecolaminérgicos em algumas regiões cerebrais, conseqüentemente, sua medição poderia ser em várias condições um índice mais sensível da atividade nervosa catecolaminérgica do que a medida das próprias aminas (McGEER *et al.*, 1967).

Uma variedade de estressores causa mudanças da atividade de enzimas que sintetizam catecolaminas e nas concentrações de noradrenalina e adrenalina no cérebro. O estresse prolongado promove mudanças na atividade de enzimas como tirosina hidroxilase, dopamina β -hidroxilase e feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT). Essas mudanças na atividade das enzimas são reguladas por vários glicocorticóides, ACTH e atividade neural. Quando ratos são submetidos a estressores psicossociais como competição por comida e espaço, eles apresentam aumento da pressão sangüínea, do peso da adrenal e da concentração de catecolaminas na medula da adrenal. Neste caso, as enzimas tirosina hidroxilase e PNMT estão aumentadas no rato (AXEROLD & RESINE, 1984).

1.4- Áreas Hipotalâmicas

Dentre as áreas hipotalâmicas estudadas descreveremos os núcleos arqueado, paraventricular e periventricular.

1.4.1- Núcleo Arqueado do Hipotálamo

O núcleo arqueado possui uma densa projeção neuronal para a camada externa da eminência média dirigindo-se ao plexo capilar porta-hipofisário (BJÖRKLUND *et al.*, 1973; KAWANO & DAIKOKU, 1987), participando na modulação dos hormônios da adenohipófise, entre eles, da prolactina (REICHLIN, 1998).

Nesse núcleo, as células dopaminérgicas são usualmente pequenas, redondas ou fusiformes (o diâmetro maior do corpo celular não excede a 20 μ m), com dendritos não ramificados longos e polares. As células raramente têm mais que três principais dendritos (CHAN-PALAY *et al.*, 1984).

Os neurônios do núcleo arqueado formam uma série de substâncias, entre elas, a neurotensina, o fator liberador do hormônio do crescimento, a somatostatina, o ácido gama-aminobutírico, a galanina, os peptídeos derivados da proopiomelanocortina, a tirosina hidroxilase, uma enzima que participa da síntese de catecolaminas, e os peptídeos opióides encefalina e dinorfina (IBATA *et al.*, 1984; EVERITT *et al.*, 1986). Também tem sido demonstrado imunohistoquimicamente que vários desses neuropeptídeos coexistem com a dopamina nos neurônios do núcleo arqueado (EVERITT *et al.*, 1984; OKAMURA *et al.*, 1985; EVERITT *et al.*, 1986).

Os neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado fazem parte do sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (UNGERSTEDT, 1971; BJÖRKLUND *et al.*, 1973; MOORE & BLOOM, 1978; LUPPI *et al.*, 1986; COOPER *et al.*, 1991; REICHLIN, 1998). O papel desses neurônios na secreção de prolactina tem sido bem documentado. A dopamina é o mais importante fator inibidor da prolactina e é o produto da via dopaminérgica tuberoinfundibular estando presente nos vasos sanguíneos porta-hipofisários em concentração suficiente para inibir a síntese de prolactina pela adenohipófise (REICHLIN, 1998). A dopamina suprime virtualmente todos os processos da síntese e liberação de prolactina. Ela age sobre o lactotrofo via o receptor de dopamina D₂ (SENOGLES, 1994) para inibir a liberação e biossíntese de prolactina, inibir a síntese de DNA e divisão celular e causar a perda dos estoques de prolactina em grânulos por estimular a crinofagia. Além disso, a dopamina também inibe a formação do AMP_c (um estimulador da

secreção de prolactina) (REICHLIN, 1998).

Neurônios dopaminérgicos não são diretamente regulados por mecanismos mediados por receptores de dopamina, mas são estimulados pela prolactina (MOORE, DEMAREST & LOOKINGLAND, 1987). A prolactina pode exercer um controle sobre sua própria liberação por atuar sobre neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares que normalmente inibem a liberação desse hormônio (MOORE, DEMAREST & JOHNSON, 1980).

A liberação de prolactina pode ser afetada pela estimulação neonatal. NUÑEZ *et al.* (1996) observaram que as quantidades plasmáticas de prolactina, imediatamente após a aplicação de um estresse (exposição ao campo aberto), foram menos aumentados em animais adultos manipulados na infância do que em ratos controle, sugerindo que a manipulação neonatal poderia ter induzido alterações na atividade dopaminérgica hipotalâmica afetando a liberação de prolactina em resposta a um estresse agudo. SEVERINO (2000, comunicação pessoal) também demonstrou uma menor liberação de prolactina em ratos machos adultos manipulados na infância após aplicação de um estresse por éter do que animais não-manipulados.

1.4.2- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) consiste de 8 subdivisões: 3 magnocelulares (subdivisões magnocelulares anterior, medial e posterior) e 5 parvocelulares (subdivisões periventricular e parvocelulares anterior, medial, dorsal e lateral). Essencialmente, a divisão magnocelular é composta de zonas relativamente discretas contendo neurônios ocitocinérgicos ou vasopressinérgicos, que se projetam à neurohipófise, rodeada por uma região parvocelular relacionada com grupos celulares do sistema neurovegetativo no tronco cerebral e medula espinhal, através de vias bidirecionais, e com a lâmina externa da eminência média, sendo composta por neurônios produtores de ocitocina, vasopressina, somatostatina, hormônio liberador de corticotrofina ou dopamina (SWANSON & KUYPERS, 1980; SWANSON & SAWCHENKO, 1983).

Vários estudos demonstraram a presença de corpos celulares e de terminais nervosos dopaminérgicos no PVN (SWANSON *et al.*, 1981; BUIJS *et al.*, 1984; DECAVEL, GEFFARD & CALLAS, 1987). SWANSON *et al.* (1981)

demonstraram que o PVN inteiro possui mais de 500 neurônios dopaminérgicos. A existência dessa inervação dopaminérgica intrínseca nos neurônios parvocelulares e magnocelulares do PVN, juntamente às bem caracterizadas entradas noradrenérgicas e adrenérgicas paraventriculares, foi demonstrada através de estudos onde a destruição das fibras catecolaminérgicas ascendentes não afetou a imunorreatividade da tirosina hidroxilase no PVN de ratos (LINDVAL, BJÖRKLUND & SKAGERBERGER, 1984; LIPOSITS & PAULL, 1989).

As células dopaminérgicas são na maioria redondas ou fusiformes com dois processos principais emergindo de seus dois polos. O tamanho de seus corpos celulares não excede 20 μm . Poucas células triangulares e multipolares também são observadas (CHAN-PALAY *et al.*, 1984).

Muito pouco é conhecido da distribuição das aferências dopaminérgicas para o PVN, e seu sítio de origem ainda não está claro. PLOTSKY *et al.* (1989) sugerem como prováveis candidatos o núcleo arqueado (A12), a zona incerta (A13), e a zona periventricular hipotalâmica, incluindo o próprio PVN (A14). As fibras dopaminérgicas suprindo os núcleos neurosecretórios do hipotálamo parecem ser derivadas de um recurso local, os grupos A11-A14 do diencefalo (BJÖRKLUND & LINDVALL, 1984). Outros autores demonstraram que as fibras dopaminérgicas no PVN originam-se dos neurônios periventriculares (A14) do núcleo periventricular dorsal hipotalâmico (VAN DEN POL *et al.*, 1984; LIPOSITS & PAULL, 1989). Também foi demonstrada a presença de neurônios dopaminérgicos intrínsecos no PVN (SWANSON *et al.*, 1981). A imunorreatividade à tirosina hidroxilase de pericários e dendritos detectada no PVN representa neurônios dopaminérgicos, visto que essas células não contêm dopamina β -hidroxilase, nem feniletanolamina N-metiltransferase, as enzimas conversoras da síntese de noradrenalina e adrenalina, respectivamente (SWANSON *et al.*, 1981; LIPOSITS *et al.*, 1986).

Ambos corpos celulares dos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos no PVN recebem inervação dopaminérgica (BUIJS *et al.*, 1984; DECAVEL *et al.*, 1987). Há evidências de que o sistema dopaminérgico é capaz de exercer uma influência facilitatória direta sobre a liberação desses hormônios hipofisários (MOOS *et al.*, 1982; BUIJS *et al.*, 1984). Visto que o lobo neural da hipófise também possui inervação dopaminérgica, sugere-se que essas

fibras dopaminérgicas são capazes de controlar a liberação desses hormônios hipofisários (ocitocina e vasopressina), tanto no corpo celular, quanto no terminal (BUIJS *et al.*, 1984).

Sabe-se que ambos hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e dopamina respondem a eventos estressantes. O PVN é o principal produtor do CRH, que está envolvido na regulação do eixo hipófise-adrenal (ANTONI *et al.*, 1983; BHRUN *et al.*, 1984). Fibras dopaminérgicas estabelecem conexões sinápticas com células imunorreativas ao CRH indicando que o sistema dopaminérgico hipotalâmico pode influenciar o eixo endócrino hipófise-adrenal via uma interação direta com neurônios produtores de CRH no subnúcleo parvocelular do PVN (LIPOSITS & PAULL, 1989). LIPOSITS *et al.* (1986) observaram que neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase paraventriculares enviam processos neuronais para neurônios produtores de CRH que se localizavam em sua proximidade. Também foi observado que corpos celulares e dendritos de neurônios imunorreativos ao CRH e dendritos imunorreativos à tirosina hidroxilase foram alvos de terminais axônicos imunorreativos à tirosina hidroxilase indicando influência catecolaminérgica sobre neurônios dopaminérgicos do PVN.

Vários estudos têm demonstrado a presença de RNAm para receptores dopaminérgicos no PVN (BOUTHENET *et al.*, 1991; FREMEAU *et al.*, 1991). Observou-se que a estimulação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ ativa neurônios produtores de CRH paraventriculares (BOUTHENET *et al.*, 1991; EATON *et al.*, 1996). RADNAI & ENDROCZI (1979) observaram que receptores dopaminérgicos podem ter um papel na ativação da secreção de ACTH induzida por CRH.

1.4.3- Núcleo periventricular hipotalâmico

Os neurônios dopaminérgicos do núcleo periventricular do hipotálamo fazem parte de dois sistemas: 1) o sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (A12) na região adjacente ao núcleo arqueado e 2) a parte rostral do sistema dopaminérgico incertohipotalâmico que se origina no sistema periventricular (A14) na região hipotalâmica e estende-se da comissura anterior até a borda rostral da eminência média (DAHLSTRÖM & FUXE, 1964; BJÖRKLUND & NOBIN, 1973; BJÖRKLUND, LINDVALL & NOBIN, 1975).

As células dopaminérgicas são na maioria pequenas ($21 \times 11 \mu\text{m}$), fusiformes com longos eixos paralelos à parede do terceiro ventrículo. Dois dendritos principais originam-se dos pólos dessas células (CHAN-PALAY *et al.*, 1984).

O núcleo periventricular envia projeções eferentes dopaminérgicas para o núcleo paraventricular hipotalâmico, para os lobos posterior e intermediário da hipófise e para o próprio núcleo periventricular (LINDVALL *et al.*, 1984; LUPPI *et al.*, 1986; VAN DEN POL *et al.*, 1984; LIPOSITS & PAULL, 1989; GOUDREAU *et al.*, 1992).

Nos lobos posterior e intermediário da hipófise, essas eferências dopaminérgicas podem estar atuando na liberação de α -MSH, ACTH, pró-opiomelanocortina e β -endorfina pelas células do lobo intermediário, pois sabe-se que a liberação desses hormônios é inibida por dopamina e axônios dopaminérgicos no lobo posterior da hipófise podem exercer influência sobre a liberação de ocitocina e vasopressina dos axônios originados nos núcleos hipotalâmicos supraóptico e paraventricular e terminais axônicos dopaminérgicos (TILDERS, 1979; FARAH, MALCOLM & MUELLER, 1982; CHEN, DIONE & ROBERTS, 1983; STOLL, MARTIN & VOIGHT, 1984).

Estudos anatômicos indicam que neurônios dopaminérgicos A14 projetam-se para o PVN (BJORKLUND & LINDVALL, 1984; VAN DEN POL *et al.*, 1984; LIPOSITS & PAULL, 1989) e neurônios dopaminérgicos têm ação estimulatória em neurônios produtores de CRH (BOUTHENET *et al.*, 1991; EATON *et al.*, 1996). Isto sugere que neurônios dopaminérgicos periventriculares podem regular a secreção de CRH no sistema sangüíneo porta-hipofisário e assim regular a liberação de corticosterona do córtex adrenal em ratos (EATON *et al.*, 1996).

1.5- Detecção Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica que proporciona a demonstração de diferentes componentes antigênicos dos tecidos, usando para isso anticorpos específicos e um conjunto de técnicas que permitem sua localização *in situ*, com ajuda de microscopia óptica ou eletrônica (BEESLEY, 1993; PEINADO, PEDROSA & RODRIGO, 1996). As técnicas mais usadas são as chamadas

indiretas, as quais empregam um segundo anticorpo (IgG) para localizar um primeiro anticorpo ou anticorpo específico. O segundo anticorpo pode então ser detectado de várias formas, uma delas através da utilização do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), que será hidrolisado por um componente enzimático (3,3-diaminobenzidina – DAB) para formar um precipitado de coloração marrom (MacMILLAN *et al.*, 1984).

O presente trabalho utilizou a técnica indireta do complexo avidina-biotina-peroxidase que entre vários procedimentos de marcação imunohistoquímica envolve a aplicação de um anticorpo secundário biotinado seguido pela adição do complexo avidina-biotina-peroxidase, resultando numa marcação de alta intensidade (MacMILLAN *et al.*, 1984; HSU, RAINE & FANGER, 1981). O componente enzimático utilizado para detectar a reação foi o DAB, que através de sua polimerização oxidativa é amplamente aplicado em histoquímica, imunologia e neuroanatomia entre outros, para a demonstração de enzimas, proteínas e outros materiais biológicos marcados com peroxidase ou que possuem atividade intrínseca de peroxidase (GRAHAM & KARNOVSKY, 1966; STENBERGER *et al.*, 1970; GALLYAS, GÖRCS & MERCHENTHALER, 1982).

Para avaliar uma possível participação do sistema dopaminérgico na estimulação neonatal, o presente estudo empregou a técnica da imunohistoquímica (HSU *et al.*, 1981) para localizar a tirosina hidroxilase, uma enzima envolvida na síntese de catecolaminas. Em muitos estudos, a dopamina sintetizada em diferentes regiões no cérebro e as vias neuronais dopaminérgicas têm sido examinadas, indiretamente, utilizando-se esta enzima pela técnica da imunohistoquímica (PICKEL *et al.*, 1981; BOUYER, JOH & PICKEL, 1984; CHAN-PALAY *et al.*, 1984; JÖHREN *et al.*, 1997). A imunorreação com o anticorpo para tirosina hidroxilase indica os locais de síntese das catecolaminas, mas não mostra diretamente o produto final.

2- OBJETIVO

O ambiente pós-natal, regulando o desenvolvimento do sistema de CRH hipotalâmico, determina, em parte, as diferenças individuais na sensibilidade do adulto ao estresse. É possível que esta plasticidade reflita um processo básico pelo qual o ambiente do início da vida é capaz de ajustar a sensibilidade e a eficiência de certos sistemas neuroendócrinos mediadores da resposta do animal a estímulos que ameaçam a homeostase.

Considerando-se que ratos manipulados na infância apresentam, quando adultos, uma menor liberação de ACTH, corticosterona e prolactina do que animais não-manipulados diante de uma situação estressante e que a dopamina, tendo papel inibitório na síntese de prolactina e estimulatório na síntese de CRH, tem suas quantidades plasmáticas alteradas diante de estressores, pretende-se testar a hipótese de que a manipulação neonatal afetaria o sistema dopaminérgico e portanto as respostas ao estresse. Desse modo, o objetivo desse estudo é avaliar o papel da manipulação neonatal sobre o sistema dopaminérgico hipotalâmico.

Objetivos Específicos

Esse trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da manipulação neonatal sobre o sistema dopaminérgico hipotalâmico de ratos. A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para quantificar o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase em diferentes áreas hipotalâmicas de ratos machos adultos. Para isso teve-se por objetivos específicos:

1. Observar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos machos adultos.

2. Observar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos machos adultos.

3. Observar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios

imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Fêmeas prenhas da variedade Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram reduzidas a oito filhotes com um mínimo de quatro machos, que foram utilizados quando adultos (75-80 dias de idade). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 17 horas e 30 minutos e com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida constante em torno de 22°C.

3.2- Estimulação Neonatal

O trabalho consistiu de dois grupos:

Não-manipulados (controle): cujos filhotes não foram manipulados.

Manipulados: a manipulação consistia em levar a ninhada para uma sala anexa ao biotério, com mesmo fotoperíodo e temperatura, separar os filhotes da mãe, que foi mantida em uma caixa ao lado, e manipulá-los com luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho, gentilmente por 1 minuto (min) do primeiro ao décimo dia de vida. Após essa manipulação todos os filhotes foram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe. O procedimento de manipular os filhotes durava 1 minuto, sendo que o tempo total entre a separação da mãe e a devolução dela aos filhotes levava em torno de 2 minutos. Os procedimentos de manipulação iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes (Dia 1).

O procedimento de manipulação neonatal foi definido do modo como descrito acima com base em trabalhos clássicos sobre estimulação por manipulação (DENENBERG *et al.*, 1964; ADER *et al.*, 1968; HESS *et al.*, 1969).

A figura 1 mostra de forma esquemática o procedimento de estimulação neonatal utilizado nesse experimento.

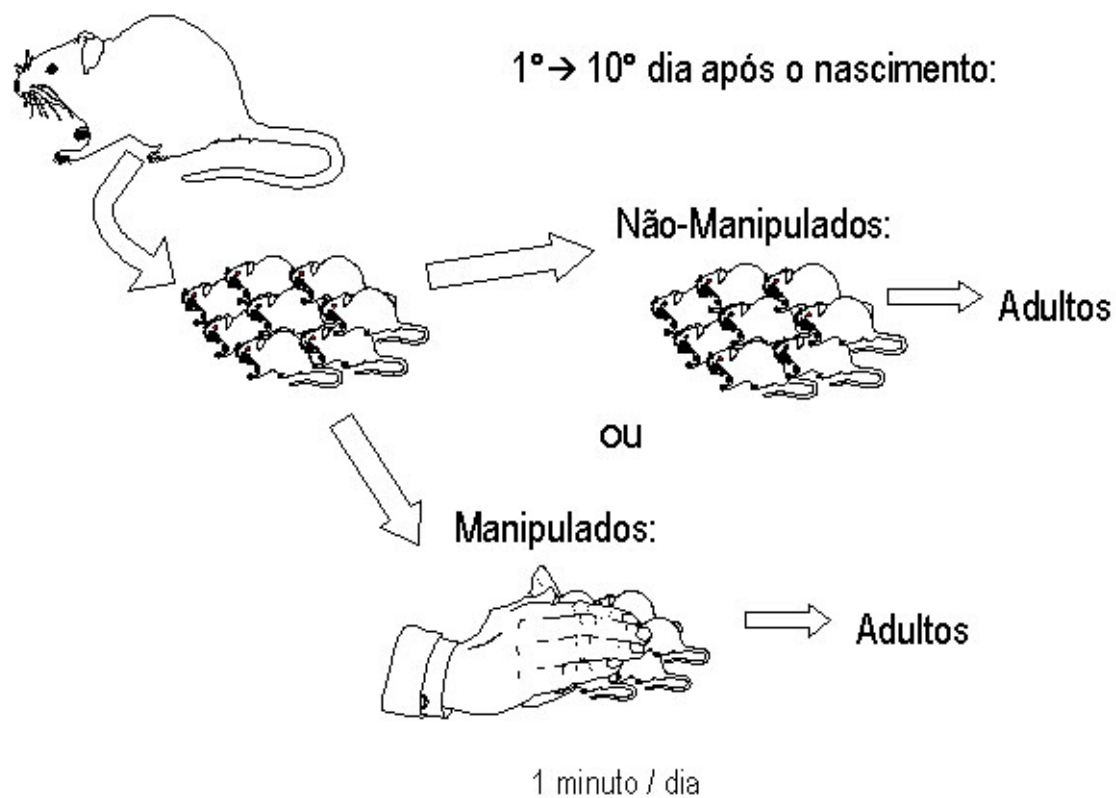


Figura 1. Modelo de manipulação neonatal.

Os ratos analisados em torno dos 75-80 dias de idade e pesando 250-300 gramas permaneceram com a mãe até os 21 dias de vida quando foram separados e mantidos em caixas com três animais do mesmo sexo.

3.3- Preparação do tecido

A perfusão-fixação foi realizada conforme os protocolos adaptados de IMBODEN & FELIX (1995) e PEINADO *et al.* (1996). Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/Kg, i.p.), tiveram o tórax aberto e foram perfundidos através do coração com 100ml de solução lavadora com heparina (tampão fosfato, cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e heparina) por 20 min, seguida por 200 ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH: 7,4 a 4°C por 30 min. Os cérebros foram removidos e pós-fixados por 4 horas na mesma solução de fixação a 4°C e, imediatamente, crioprotegidas em uma solução com sacarose 30% diluída em tampão fosfato 0,1M a 4°C até afundar. Após a crioproteção, os cérebros foram congelados num recipiente com isopentano introduzido em um outro contendo gelo seco. Após o congelamento completo, os cérebros foram conservados em freezer -80°C.

3.4- Procedimento Imunohistoquímico

Secções coronais de 30 μ m de espessura dos cérebros foram obtidas em um criostato (HM 505E, MICROM) a -15°C e coletadas seriadamente em intervalos de 120 μ m (1:5). As secções foram montadas em lâminas cobertas com gelatina e cromo alumen permanecendo à temperatura ambiente por 12-24 horas para secarem e serem então armazenadas em freezer a -80°C (SANYO). As áreas cerebrais estudadas foram identificadas segundo atlas para cérebro de ratos de PAXINOS & WATSON (1997).

Para realização da técnica de imunohistoquímica, as secções armazenadas em freezer a -80°C foram retiradas e descongeladas até adquirirem a temperatura ambiente por 4 horas. Então eram mergulhadas em uma solução de tampão fosfato salino com Triton X-100 0,4% (PBS-T 0,4%) por 30 min. Após,

as secções foram incubadas com um anticorpo primário contra tirosina hidroxilase diluído 1:500 em PBS-T 0,4% por 30 min à temperatura ambiente. Para detecção das células positivas à tirosina hidroxilase foi utilizado o anticorpo Monoclonal de camundongo Anti-Tyrosine Hydrolylase – clone TH-2 (isotipo mouse IgG 1) da Sigma. Marcações positivas foram detectadas pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (HSU *et al.*, 1981). As secções foram lavadas com PBS-T 0,4% por 10 min e incubadas com um anticorpo secundário biotilado por 30 min. Então elas foram novamente lavadas com PBS-T 0,4% por 10 min e incubadas com streptavidina conjugada a peroxidase por 30 min, utilizando o KIT DAKO LSAB 2 PEROXIDASE (DAKO LSAB ® 2 KIT, HRP, RAT) de acordo com o seu protocolo (JÖHREN *et al.*, 1997). As secções foram lavadas com PBS por 10 min e, então, receberam a solução com o cromógeno 3,3'-tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em PBS (6mg/10ml) por 10 min. Um segundo banho por 10 min com a solução cromógena, acrescentada de H₂O₂ 10% (5µl/5ml) foi aplicado. Então as secções foram lavadas duas vezes por 10 min com PBS e receberam uma contracoloração com hematoxilina de Mayer, sendo desidratadas por uma série crescente alcoólica com duração de 2 min em cada álcool. As lâminas foram então clareadas em 3 banhos de xilol por 2 min cada e cobertas com o meio de montagem (Entellan, Merck) e lamínulas. Como um controle negativo, que acessa a não-especificidade metodológica da técnica imunomarcadora aplicada, as secções foram processadas da mesma maneira como descrito anteriormente, no entanto, na ausência do primeiro anticorpo, que foi substituído por PBS-T 0,4% (BEESLEY, 1993).

3.5- Coleta de dados

Contagens nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral) do número de corpos celulares imunorreativos à tirosina hidroxilase (marcação positiva) em cada núcleo foram realizadas em secções de 30 µm coletadas seriadamente em intervalos de 120 µm (1:5) do início ao fim dos núcleos arqueado (Bregma: -2,12 a -4,30mm), paraventricular (Bregma: -0,80 a -2,12mm) e periventricular (Bregma: -0,26 a -3,60mm) do hipotálamo identificadas segundo PAXINOS & WATSON (1997).

Todos os corpos celulares imunorreativos à tirosina hidroxilase eram contados sob microscópio óptico (ZEISS) com uma lente de 40x e uma ocular de 10x contendo um retículo com área de 1mm². Os corpos celulares dos neurônios de toda a extensão do núcleo eram contados. Tomava-se extremo cuidado em localizar pontos claros de referência na área estudada para se evitar que o mesmo corpo celular fosse contado duas vezes devido ao deslocamento do retículo no campo visual.

O número total estimado de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase foi calculado segundo a fórmula $N_t = n_s \times P$, onde N_t é o número total de unidades estimadas na estrutura, n_s é o número de unidades contadas na estrutura e P é o período ao qual as secções foram amostradas (neste trabalho utilizou-se $P=5$)(KONIGSMARK, 1970). Esse procedimento quantitativo foi utilizado por GUILLAMÓN *et al.* (1988) para estimar o número total de células no *locus coeruleus* de ratos.

Outros procedimentos quantitativos poderiam ser utilizados para estimar o número total de neurônios (MØLLER, STRANGE & GUNDERSEN, 1990; COGGESHALL, 1992; MAYHEW, 1992). No presente estudo, não foram feitas medidas da área e do volume dos núcleos estudados por não possuímos equipamento adequado para esse procedimento, utilizando-se a fórmula citada para estimar o número total de neurônios na estrutura, sem o conhecimento daquelas variáveis. Como o mesmo procedimento foi realizado em ambos os grupos e o objetivo do trabalho era comparar o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase em núcleos hipotalâmicos de ratos machos adultos, o procedimento utilizado basta nesse trabalho para se fazer essa estimativa entre os grupos controle e manipulado.

Todos os grupos foram codificados para serem contados separadamente por dois observadores e a média dessas contagens para cada indivíduo foi considerada o número total de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase para cada animal.

3.6- Análise estatística

Os resultados foram expressos por média (\pm EPM) do número total estimado de células positivamente marcadas em cada estrutura identificada acima

e foram comparados entre os grupos experimentais através de um teste t de Student. O nível de significância para assumir uma diferença como significativa foi de $p < 0,05$ (ZAR, 1984).

Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo arqueado do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -2,12 a -4,30 mm. AH: hipotálamo anterior, ArcD: núcleo arqueado região dorsal, ArcM: região medial, ArcL: região lateral, DMD: hipotálamo dorsomedial, DTM: área tuberomamilar dorsal, ME: eminência média, Pe: núcleo periventricular, PMV: núcleo pré-mamilar ventral, VMH: hipotálamo ventromedial, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).

Figura 3. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -0,80 a -2,12 mm. Arc: núcleo arqueado, ME: eminência média, MPA: área pré-óptica medial, MPO: núcleo pré-óptico medial, PaAM: núcleo paraventricular, região magnocelular anterior, PaAP: região parvocelular anterior, PaLM: região magnocelular lateral, PaMP: região parvocelular medial, PaPo: núcleo paraventricular posterior, Pe: núcleo periventricular, Sch: núcleo supraquiasmático, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).

Figura 4. Representação esquemática de cortes coronais do núcleo periventricular do hipotálamo de ratos adultos. Coordenadas estereotáxicas: Bregma: -0,26 a -3,60 mm. ArcD: núcleo arqueado dorsal, ArcM: núcleo arqueado medial, ArcL: núcleo arqueado lateral, HP: hipotálamo posterior, ME: eminência média, MPA: área pré-óptica medial, MPO: núcleo pré-óptico medial, PaAM: núcleo paraventricular, região magnocelular anterior, PaAP: região parvocelular anterior, PaMP: região parvocelular medial, PaPo: núcleo paraventricular posterior, Pe: núcleo periventricular, Sch: núcleo supraquiásmático, 3V: terceiro ventrículo (PAXINOS & WATSON, 1997).

4- RESULTADOS

4.1- Imunorreatividade à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos

Os cortes do controle negativo realizado em todos os experimentos imunohistoquímicos não apresentaram estruturas imunorreativas à tirosina hidroxilase, confirmando a especificidade do primeiro anticorpo. As estruturas analisadas nos cortes coronais seriados de 30 μm coletados em intervalos de 120 μm dos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos apresentaram imunorreatividade à tirosina hidroxilase (TH-IR), indicando a presença desta enzima em corpos celulares e fibras.

A localização dos corpos celulares TH-IR é mostrada em secções coronais de cérebro dos núcleos hipotalâmicos paraventricular (Fig. 5A), arqueado (Fig.5B) e periventricular (Fig. 5C).

A distribuição dos neurônios TH-IR no presente estudo foi consistente com trabalhos prévios sobre a localização dessas células no hipotálamo de ratos (CHAN-PALAY *et al.*, 1984; VAN DEN POL *et al.*, 1984; DAIKOKU *et al.*, 1986; KAWANO & DAIKOKU, 1987).

Corpos celulares TH-IR foram presentes em toda a extensão rostro-caudal do núcleo arqueado, da região retroquiasmática à região pré-mamilar. Essas células foram observadas dorsalmente, próximas à parede do terceiro ventrículo, contínuas aos neurônios TH-IR do núcleo periventricular hipotalâmico. Em todos os níveis da eminência média, os neurônios TH-IR estavam presentes em maior quantidade na região dorsomedial, imediatamente adjacente ao terceiro ventrículo, e na região ventro-lateral do núcleo. Caudalmente, a região ventro-medial e a parte mais posterior do núcleo arqueado, ao redor do recesso do terceiro ventrículo, apresentaram poucos neurônios TH-IR.

As células TH-IR no núcleo arqueado (Fig. 6) eram geralmente pequenas redondas ou fusiformes. Na região dorsomedial, as células TH-IR tinham orientação paralela à parede do terceiro ventrículo, enquanto na região ventro-lateral, a orientação era médio-lateral (horizontal). Constatou-se a presença de

inervação TH-IR em toda a extensão rostrocaudal do núcleo.

Fibras TH-IR parecem estar presentes em igual densidade por toda a extensão rostro-caudal do PVN. Um grande número de corpos celulares TH-IR também foi observado na maioria dos subnúcleos paraventriculares, principalmente dispersos em toda a extensão do subnúcleo periventricular adjacente ao núcleo periventricular hipotalâmico. Corpos celulares TH-IR também foram encontrados dispersos por todos os subnúcleos parvocelulares, principalmente no subnúcleo parvocelular medial, na borda ventro-lateral do núcleo e ocasionalmente nos subnúcleos magnocelulares paraventriculares. Caudalmente, observou-se que neurônios TH-IR paraventriculares formavam uma continuidade com os neurônios TH-IR da zona incerta medial.

As células TH-IR paraventriculares (Fig. 7) eram, principalmente, redondas ou fusiformes com dois processos principais emergindo de seus pólos. Quando estas células TH-IR estavam localizadas medialmente e na região periventricular eram orientadas paralelamente à parede do terceiro ventrículo, já as células localizadas mais lateralmente no núcleo tinham uma orientação médio-lateral.

O núcleo periventricular apresentou um número considerável de corpos celulares TH-IR. Eles estavam presentes em maior quantidade na parte mais rostral do núcleo, do núcleo pré-óptico medial ao hipotálamo anterior. Essas células foram observadas em menor quantidade mais caudalmente no núcleo, junto ao núcleo arqueado hipotalâmico. Os neurônios TH-IR estavam localizados paralelamente ao longo da parede do terceiro ventrículo.

O núcleo periventricular apresentou células TH-IR geralmente fusiformes com o eixo maior paralelo ao terceiro ventrículo (Fig. 8). Um grande número de fibras TH-IR foram observadas por toda a extensão rostro-caudal do núcleo.

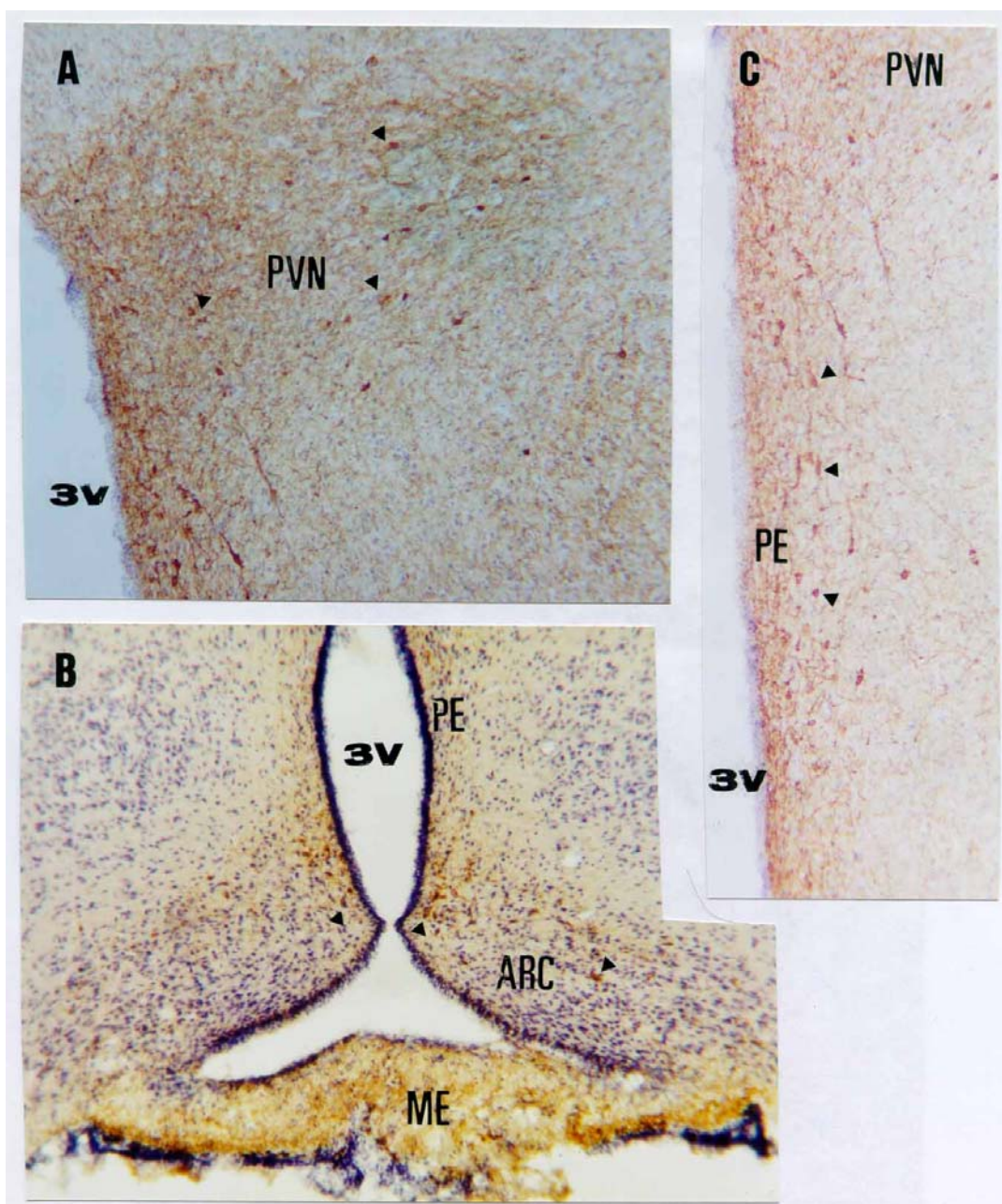


Figura 5. Cortes coronais de cérebro mostrando neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (cabeças de setas) nos núcleos hipotalâmicos (A) paraventricular: PVN, (B) arqueado: ARC e (C) periventricular: PE de ratos machos adultos manipulados (A,C) e não-manipulado (B) no período neonatal. 3V: terceiro ventrículo, ME: eminência média. Aumento: 100x.

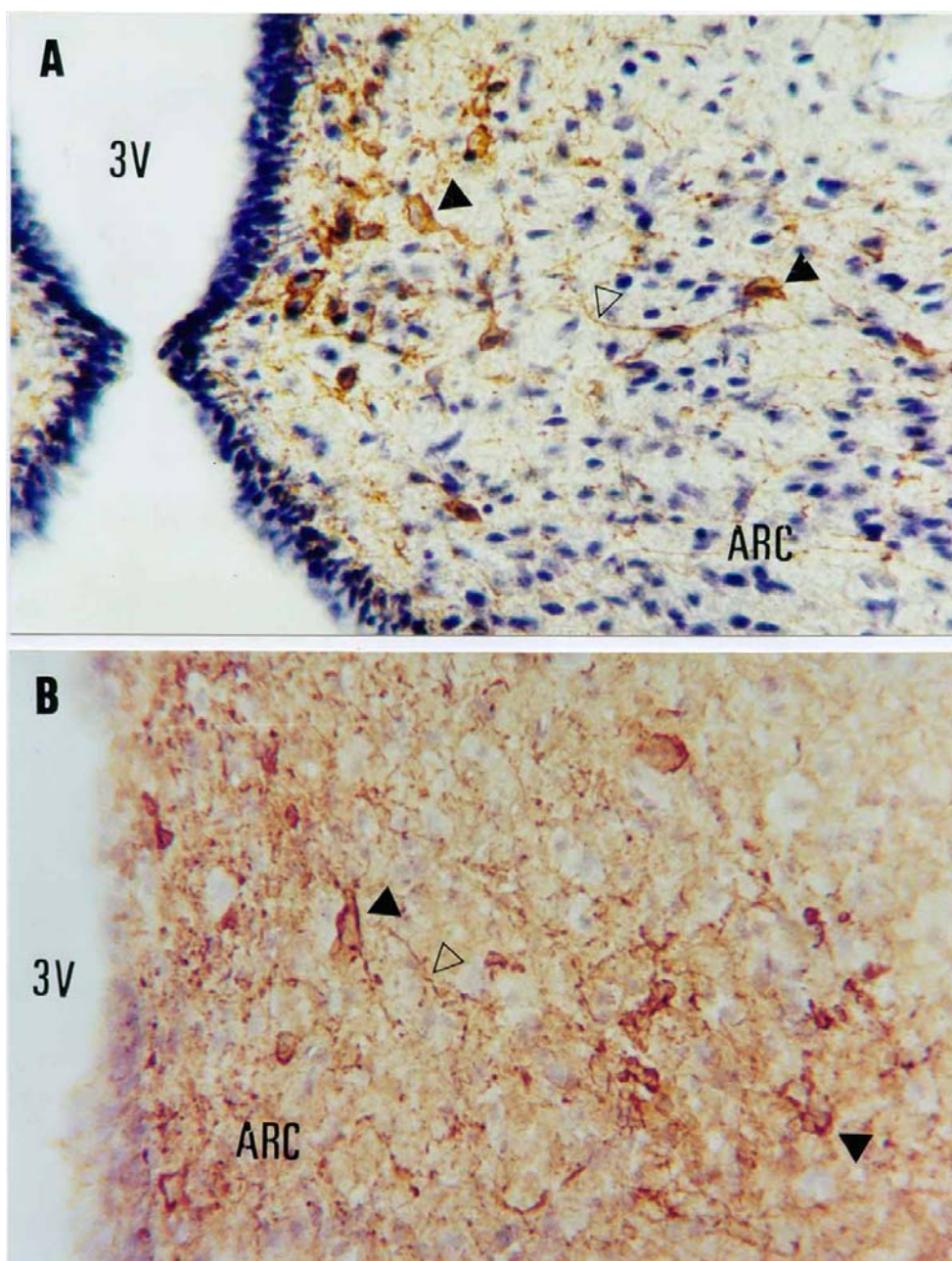


Figura 6. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo arqueado (ARC) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. 3V: terceiro ventrículo. Aumento: 400x.

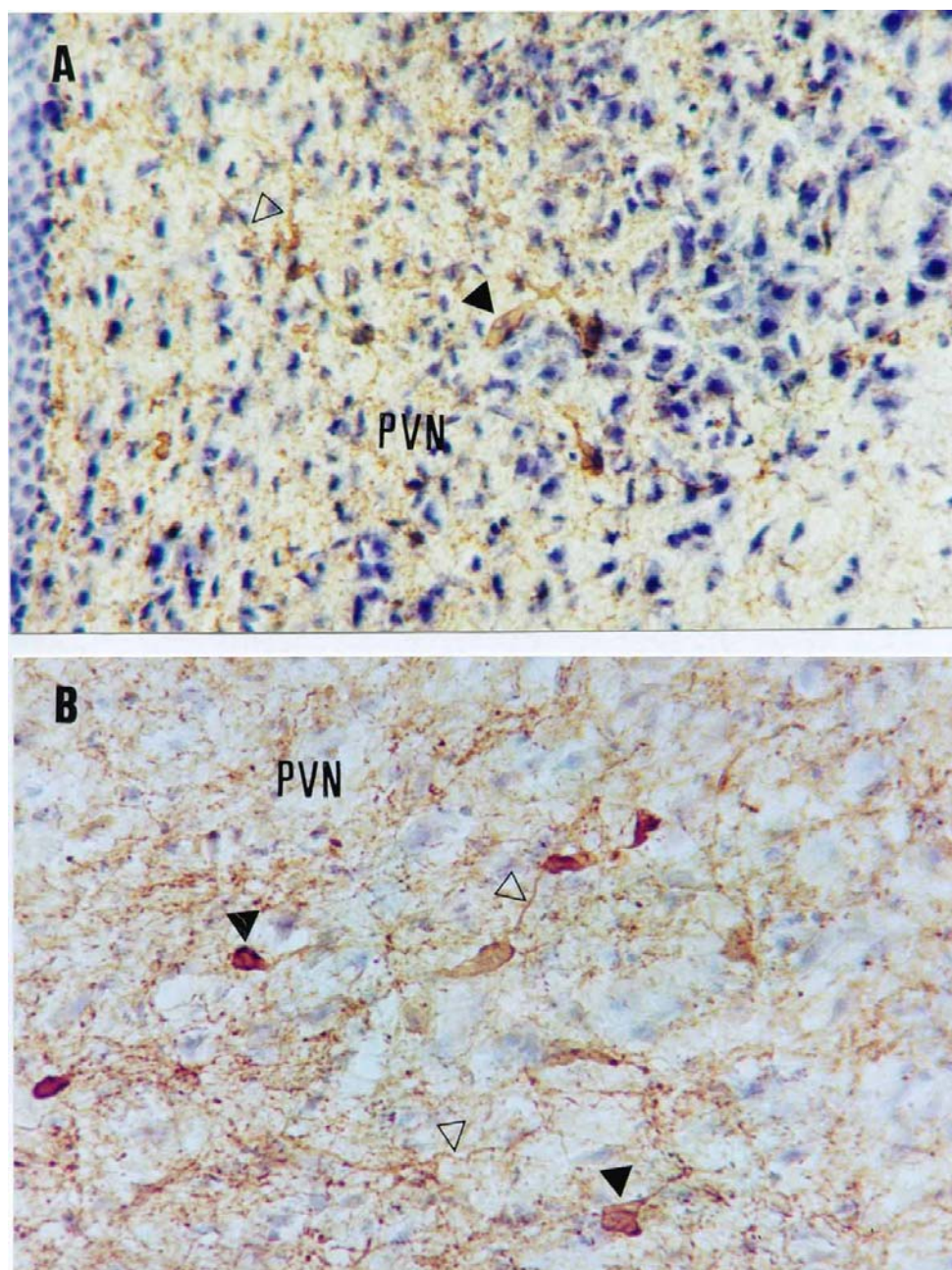


Figura 7. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo paraventricular (PVN) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. Aumento 400x.

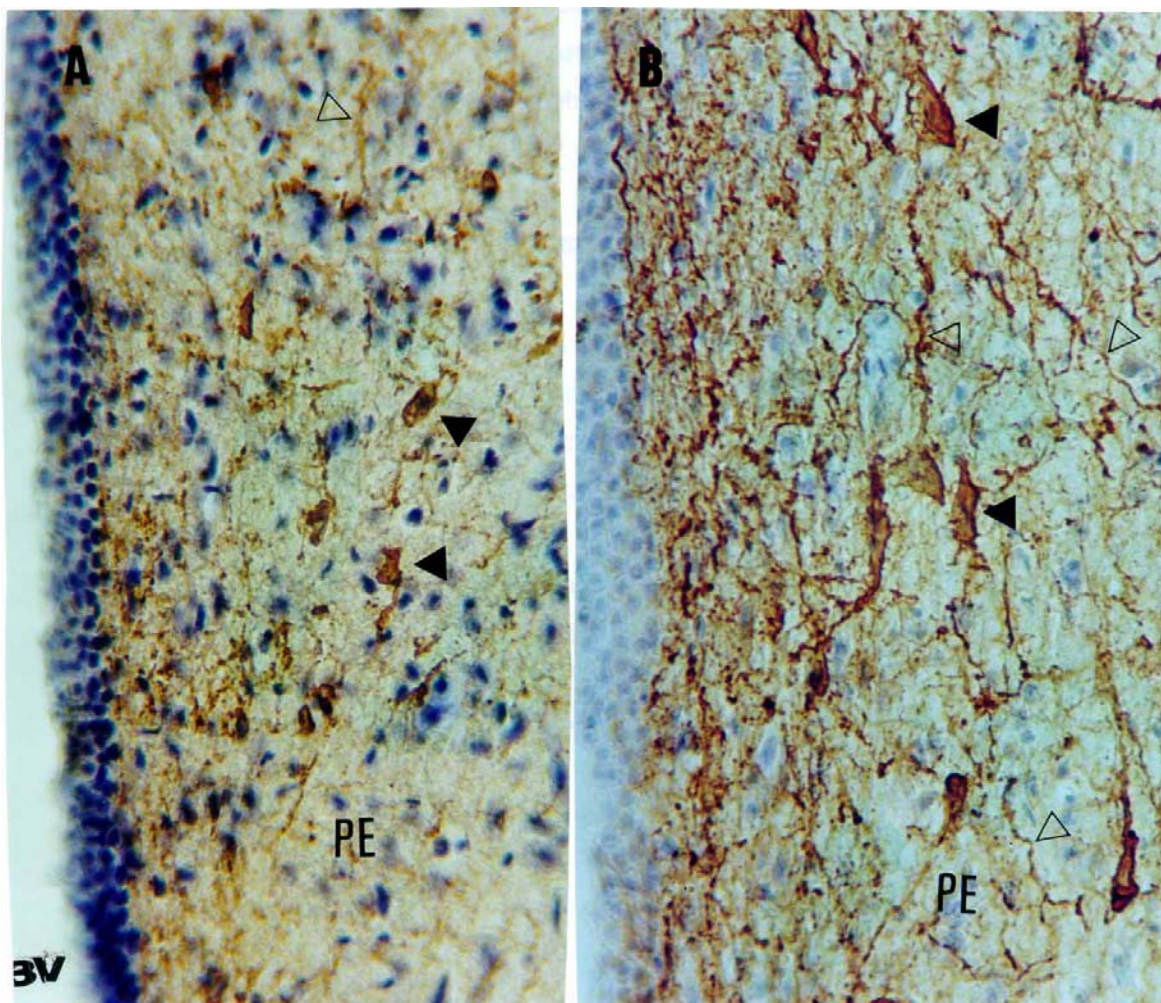


Figura 8. Cortes coronais de cérebro mostrando corpos celulares (cabeças de setas pretas) e processos neuronais (cabeças de setas brancas) imunorreativos à tirosina hidroxilase no núcleo periventricular (PE) de ratos machos adultos (A) não-manipulado e (B) manipulado no período neonatal. 3V: terceiro ventrículo. Aumento 400x.

4.2- Imunorreatividade em outras áreas hipotalâmicas e extrahipotalâmicas

Estruturas imunorreativas à tirosina hidroxilase foram observadas em outras áreas do sistema nervoso central de ratos machos adultos incluindo a zona incerta, a eminência média, o corpo estriado, a amígdala central, o núcleo supraquiasmático, o núcleo supraóptico, a área septal e as células dopaminérgicas A11 e A13.

4.3- Contagem de corpos celulares imunorreativos à tirosina hidroxilase

A tabela 1 mostra a média \pm EPM do número total estimado de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral) nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos não-manipulados e manipulados nos primeiros 10 dias de idade.

Os resultados demonstraram que não houve alteração significativa no número de neurônios TH-IR nos núcleos arqueado (Fig. 9), paraventricular (Fig.10) e periventricular (Fig.11) do hipotálamo de ratos machos adultos manipulados e não-manipulados na infância.

Tabela 1. Média \pm EPM do número total estimado de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos lados direito, esquerdo e em ambos (bilateral) em cortes coronais dos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo de ratos machos adultos não manipulados (controle) e manipulados nos 10 primeiros dias de idade. Entre parênteses está o número de animais (N).

Núcleo	Grupo	
	Não-Manipulado	Manipulado
Arqueado:	(N=6)	(N=6)
Direito	505,83 \pm 102,79	513,33 \pm 64,28
Esquerdo	515,00 \pm 103,79	507,08 \pm 87,74
Bilateral	1020,83 \pm 205,84	1020,42 \pm 150,44
Paraventricular:	(N=8)	(N=9)
Direito	291,56 \pm 43,89	337,78 \pm 34,87
Esquerdo	292,50 \pm 42,08	344,17 \pm 36,61
Bilateral	584,06 \pm 84,92	681,94 \pm 62,50
Periventricular:	(N=7)	(N=7)
Direito	391,07 \pm 61,96	507,50 \pm 83,26
Esquerdo	351,78 \pm 56,54	482,14 \pm 76,07
Bilateral	742,86 \pm 117,86	989,64 \pm 158,25

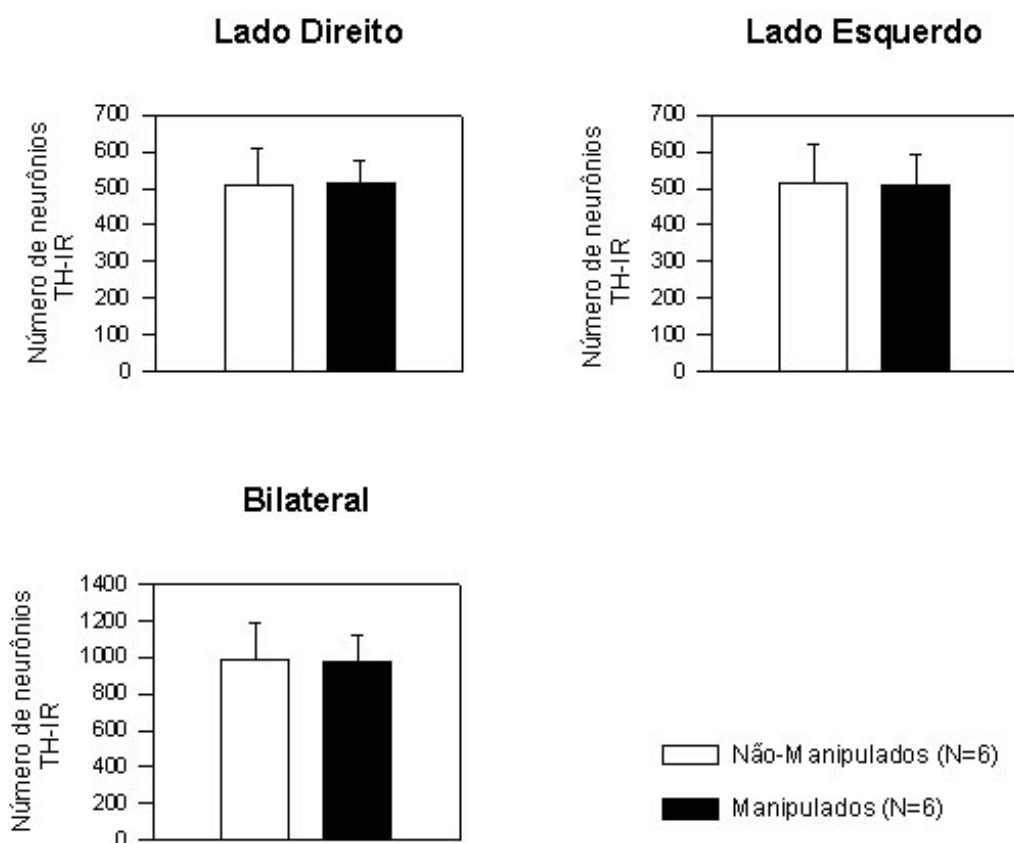


Figura 9. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados (A) direito, (B) esquerdo e (C) em ambos (bilateral).

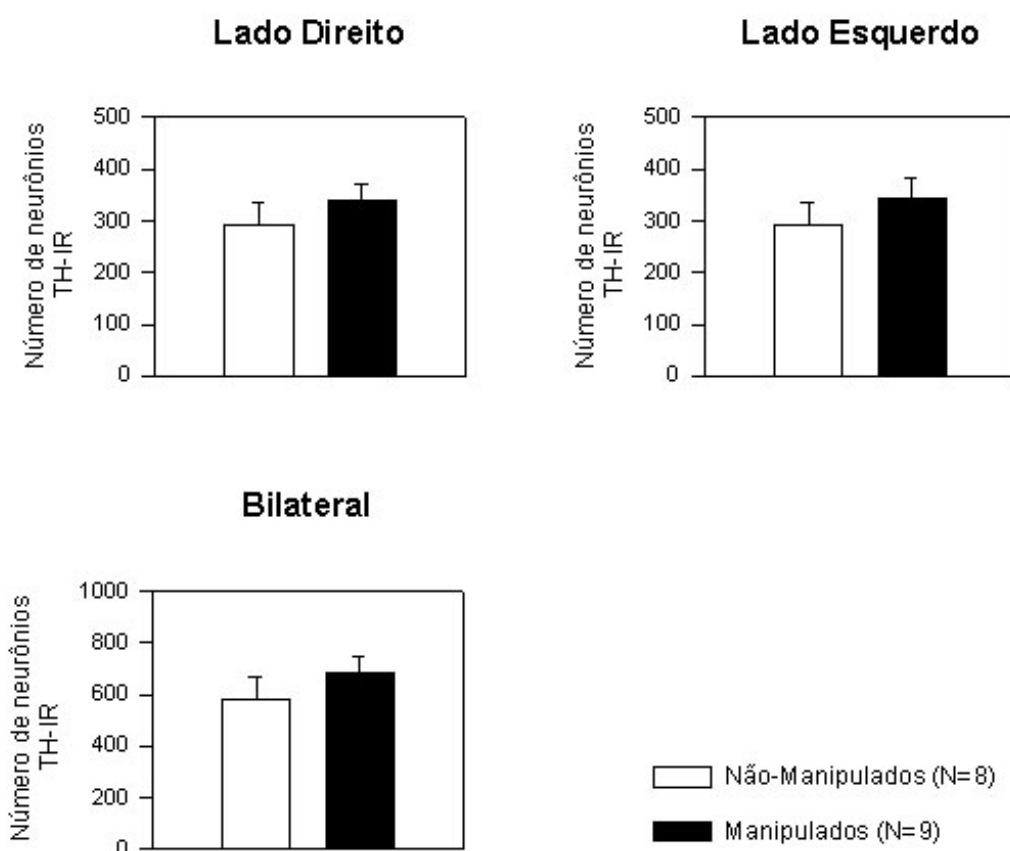


Figura 10. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados (A) direito, (B) esquerdo e (C) em ambos (bilateral).

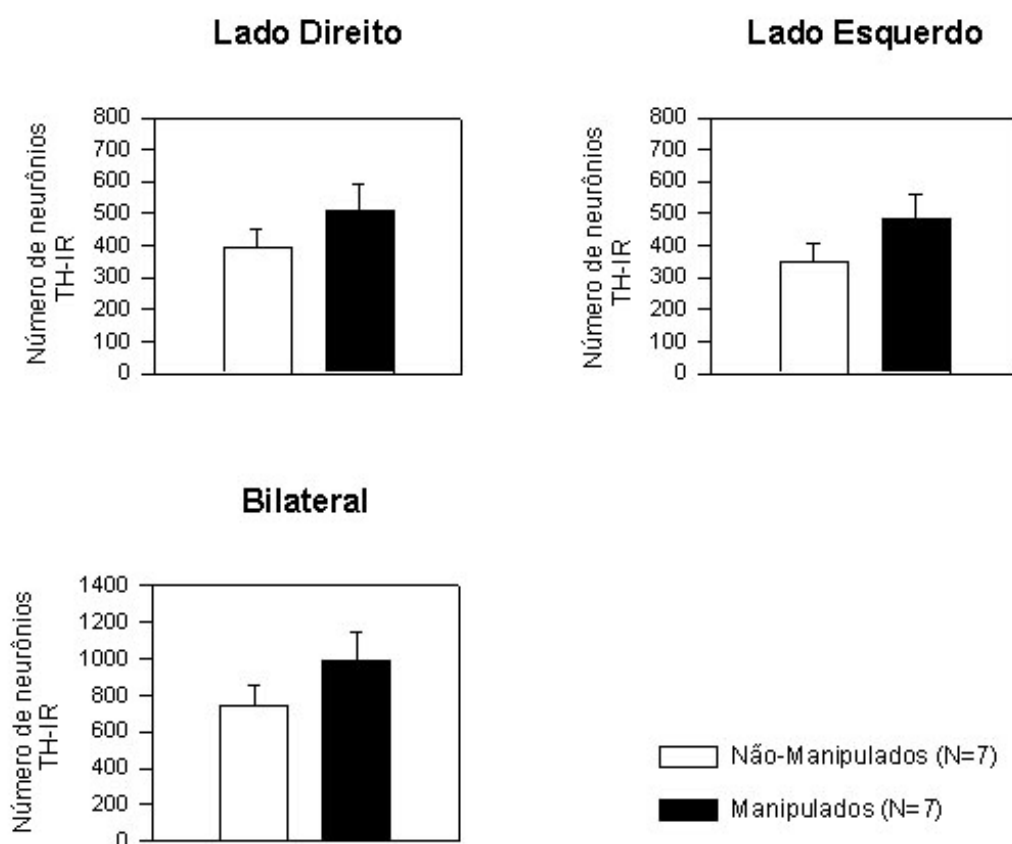


Figura 11. Efeito da manipulação neonatal durante os 10 primeiros dias de idade sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no núcleo periventricular do hipotálamo em ratos machos adultos. Os valores representam a média \pm EPM do número total estimado de neurônios TH-IR nos lados (A) direito, (B) esquerdo e (C) em ambos (bilateral).

5- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o modelo de estimulação neonatal através da manipulação diária por 1 minuto nos 10 primeiros dias de idade em ratos machos não altera o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo destes indivíduos na idade adulta.

Os aspectos morfológicos e topográficos dos neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-IR) no hipotálamo de ratos machos adultos revelados através da técnica de imunohistoquímica no presente estudo estão de acordo com trabalhos anteriores sobre a descrição e localização dos neurônios imunorreativos a esta enzima (CHAN-PALAY *et al.*, 1984; VAN DEN POL *et al.*, 1984). Contrariamente às poucas evidências da síntese de catecolaminas, exceto dopamina, pelos corpos celulares hipotalâmicos (SWANSON *et al.*, 1981; LIPOSITS *et al.*, 1986), vários estudos demonstraram fortes evidências que terminais axônicos no hipotálamo contêm noradrenalina e adrenalina, adicionalmente à dopamina (HÖKFELDT *et al.*, 1973; HÖKFELDT *et al.*, 1974; KOBAYASHI *et al.*, 1974; PALKOVITS *et al.*, 1980a, 1980b; SWANSON *et al.*, 1981; SAWCHENKO & SWANSON, 1982; VAN DEN POL *et al.*, 1984; CHAN-PALAY *et al.*, 1984). Portanto, os terminais de fibras neuronais TH-IR observadas no presente estudo podem conter noradrenalina, adrenalina ou dopamina.

Através do presente estudo se constatou que o núcleo paraventricular do hipotálamo contém em torno de 584 neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase, valor semelhante ao encontrado por SWANSON *et al.* (1981) que observaram 533 neurônios TH-IR nesse núcleo.

O presente trabalho demonstrou que a manipulação neonatal não foi um estímulo suficiente para promover alteração do número de neurônios dopaminérgicos dos núcleos analisados em ratos machos adultos.

Apesar da ausência de trabalhos anteriores relacionados ao estudo da influência da estimulação neonatal sobre o número de neurônios dopaminérgicos tanto no próprio período neonatal, quanto na idade adulta em ratos, outros trabalhos (INGLIS & MOGHADDAM, 1999; ADAMS & MOGHADDAM, 2000) relacionam a estimulação neonatal com outros fatores como a liberação e a taxa

de renovação (*turnover*) da dopamina. ADAMS & MOGHADDAM (2000) observaram que a manipulação neonatal significativamente aumentou os níveis de dopamina na região septal. INGLIS & MOGHADDAM (1999) constataram que a manipulação por 20 minutos aumentou os níveis extracelulares de dopamina na amígdala basolateral, no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens.

O isolamento no período neonatal também tem efeito sobre o sistema dopaminérgico. Ratos isolados diariamente dos dias 2 a 9 pós-natal quando colocados em um ambiente novo apresentaram uma taxa de renovação da dopamina aumentada nas regiões hipotalâmicas e septal, que são parte do sistema límbico e recebem inervação da via dopaminérgica mesolímbica, em relação aos ratos controle. Já o núcleo estriado, que recebe inervação da via dopaminérgica nigro-estriada, não apresentou diferença entre os ratos controle e isolados demonstrando que o sistema dopaminérgico pode não responder da mesma forma a um mesmo estímulo (KEHOE *et al.*, 1998).

Assim como a estimulação no período neonatal, observa-se que estresse aplicado no período pré-natal também exerce efeitos sobre o sistema dopaminérgico na vida adulta. WANG *et al.* (1995) observou que o estresse pré-natal pode resultar em um déficit na neurotransmissão dopaminérgica no núcleo accumbens ocasionando possivelmente diminuição no comportamento sexual em ratos.

O presente trabalho não nos permitiu obter resultados sobre a liberação ou a síntese de dopamina como os exemplificados. A técnica de imunohistoquímica aplicada neste estudo evidenciou o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase e seus processos neuronais, mas através da utilização da técnica de densitometria poderia ter sido quantificada a expressão da tirosina hidroxilase nesses neurônios.

Visto que os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram apenas que a manipulação neonatal não teve efeito sobre o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase, não se pode descartar a possibilidade de que essa estimulação pudesse estar envolvida em uma possível modificação na quantidade de tirosina hidroxilase formada nesses neurônios, já que estudos para avaliar essa expressão não foram realizados.

Por outro lado, há estudos demonstrando que alguns tipos de estimulação neonatal não promovem alterações em ratos, como, por exemplo, os de AGUIAR

et al. (1997) e AGUIAR (1999) que demonstraram que tanto a estimulação neonatal por som, luz ou frio, como a manipulação nos 10 primeiros dias de idade não altera a frequência de células imunorreativas ao ACTH na hipófise de ratos machos de 11 dias pós-natal. Em fêmeas, a estimulação aumenta o número dessas células, mas a manipulação não o altera (AGUIAR, 1999).

MEANEY & AITKEN (1985) sugeriram que o aumento da concentração de receptores glicocorticóides, verificada no hipocampo de ratos adultos que sofreram manipulação neonatal, poderia ser resultado de um aumento no número de neurônios hipocampais, o que confirmaria a influência deste modelo na neurogênese do hipocampo. No entanto LIU *et al.* (2000) demonstraram que não há diferença no número de neurônios hipocampais entre animais manipulados e não-manipulados.

Por que não houve alteração no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase em ratos machos manipulados no período neonatal? É certo que o ambiente influencia o desenvolvimento neural nesse período (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964). A habilidade da manipulação em influenciar eventos da neurogênese e plasticidade neuronal do sistema nervoso central de ratos tem sido bem documentada. WINKELMANN *et al.* (2000) demonstraram que a manipulação neonatal foi responsável por uma diminuição no número de neurônios no *locus coeruleus* de ratas no período peripuberal. PEREIRA (2000) ao estudar o efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios imunorreativos à somatostatina no núcleo periventricular do hipotálamo de ratos machos de 11 dias de idade observou uma diminuição no número de neurônios somatostatinérgicos nesse núcleo.

FRANCIS *et al.* (1996) descrevem que alguns tipos de estimulação ou manipulação em ratos aumentam a expressão do número de receptores glicocorticóides no hipocampo e córtex, duas regiões cerebrais que estão implicadas na retroalimentação de regulação do eixo HPA. MEANEY *et al.* (1994) mostram que a manipulação no período neonatal aumenta o número de receptores glicocorticóides no hipocampo. Quando adultos, animais que foram expostos a breves períodos de manipulação diária nas duas primeiras semanas de vida secretam menos ACTH e corticosterona quando expostos à estímulos estressantes (LEVINE, 1962; ADER & GROTA, 1969; MEANEY *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 1997).

Dessa forma a manipulação no período neonatal pode desencadear diversas alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e na modulação da neurogênese em algumas estruturas cerebrais de ratos mediando as respostas neuroendócrinas e comportamentais do indivíduo (DENENBERG *et al.*, 1967; LIU *et al.*, 1997).

No entanto, a manipulação neonatal não teve efeito em promover alterações no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos hipotalâmicos no presente estudo. O número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase não se altera com a manipulação neonatal, assim como os níveis basais de hormônios do estresse (corticosterona, por exemplo) também não são diferentes entre os grupos manipulados e não-manipulados (LEVINE, 1994). A estimulação neonatal parece afetar apenas a relação do animal a um novo estímulo estressante na vida adulta, mas não as quantidades basais dos hormônios, ou o número de células nervosas envolvidas no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares não são diretamente regulados por mecanismos mediados por receptores de dopamina, mas são estimulados pela prolactina (MOORE *et al.*, 1987). A prolactina pode exercer um controle sobre sua própria liberação por atuar sobre neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares que normalmente inibem a liberação desse hormônio (MOORE *et al.*, 1980).

Assim como a corticosterona, a prolactina também tem a sua liberação diante de um estímulo estressante afetada pela estimulação neonatal. NUÑEZ *et al.* (1996) demonstraram que as quantidades plasmáticas de prolactina, imediatamente após o estresse, foram menos aumentadas em animais manipulados no período neonatal do que em ratos controle, sugerindo que a manipulação neonatal possa ter induzido alterações na atividade dopaminérgica hipotalâmica afetando a liberação de prolactina em resposta a um estresse agudo. SEVERINO (2000, comunicação pessoal) também demonstrou uma menor liberação de prolactina em ratos machos adultos manipulados na infância após aplicação de um estresse por éter do que animais não-manipulados.

Como o número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase não se encontra alterado nos núcleos arqueado e periventricular hipotalâmicos (sistema dopaminérgico tuberoinfundibular) em animais manipulados na infância neste

estudo, poderia-se pensar em um possível papel da estimulação neonatal sobre os receptores de prolactina presentes nesses neurônios dopaminérgicos. Assim como no sistema de retroalimentação negativa dos glicocorticóides regulando o eixo HPA (PLOTSKY & MEANEY, 1993; MEANEY *et al.*, 1994; BHATNAGAR & MEANEY, 1995), a manipulação neonatal poderia estar promovendo um aumento na expressão de receptores para prolactina nos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares, aumentando desse modo a eficiência da prolactina em auto-regular sua liberação através do controle da secreção de dopamina.

Semelhantemente, ratos adultos que foram manipulados na infância apresentam um aumento menos acentuado nos níveis de corticosterona diante de um estresse, quando comparados a animais não-manipulados (PLOTSKY & MEANEY, 1993). Isso pode estar ocorrendo devido a uma diminuição das aferências estimulatórias do sistema dopaminérgico, pois foi constatado que a estimulação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ excita neurônios produtores de CRH paraventriculares (BOUTHENET *et al.*, 1991; EATON *et al.*, 1996). Por outro lado, alguns autores têm sugerido que o sistema dopaminérgico não está relacionado com a regulação da resposta ao estresse. AMAR *et al.* (1982) sugerem que a dopamina não parece ter um papel significativo na regulação da liberação do ACTH e da esteroidogênese adrenal, sendo o controle tônico basal das glândulas adrenais mediado pela 5-hidroxitriptamina (5-HT) e durante o estresse a secreção de ACTH mediada por ambos 5-HT e noradrenalina. KAWA *et al.* (1978) também não observou algum efeito da dopamina sobre a secreção de ACTH.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a manipulação neonatal não alterou o número de neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, assim a alteração da resposta da corticosterona deve estar atuando através de outras vias, como uma alteração da atividade dopaminérgica nesses núcleos ou alteração de outros neurotransmissores.

Outros estudos serão necessários para avaliar o possível papel da manipulação neonatal sobre o sistema dopaminérgico hipotalâmico de ratos machos adultos. Já que a manipulação nos primeiros dez dias de vida não teve efeito sobre o número de neurônios hipotalâmicos imunorreativos à tirosina hidroxilase em ratos machos adultos, estudos referentes à quantidade de tirosina hidroxilase formada pelos neurônios desses núcleos, através do uso da técnica de

densitometria, e o grau de atividade neuronal exercida nessas áreas, através da utilização da técnica de microdiálise, por exemplo, precisariam ser realizados.

6- CONCLUSÃO

O modelo de estimulação neonatal por manipulação durante um minuto por dia nos primeiros dez dias de vida, não foi um estímulo suficiente para promover alteração no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase nos núcleos arqueado, paraventricular e periventricular do hipotálamo em ratos machos adultos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B.W.; MOGHADDAM, B. Tactile stimulation activates dopamine release in the lateral septum. *Brain Reserach*, v.858, n.1, p.177-180, 2000.
- ADER, R.; FRIEDMAN, S.B.; GROTA, L.J.; SCHAEFER, A. Attenuation of the plasma corticosterone response to handling and electric shock stimulation in the infant rat. *Physiology & Behavior*, v.3, p.327-331, 1968.
- ADER, R.; GROTA, L.J. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiology & Behavior*, v.4, p.303-305, 1969.
- AGUIAR, C.E.; CADORE, L.P.; PADOIN, M.J.; BARBOSA-COUTINHO, L.M.; LUCION, A.B. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the Number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.30, p.1463-1466, 1997.
- AGUIAR, C.E. A estimulação diária de ratos durante os primeiros dez dias de vida altera o número relativo de células corticotróficas em fêmeas mas não em machos. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- AGRAWAL, H.C.; GLISSON, S.N.; HIMWICH, W.A. Changes in monoamines of rat brain during postnatal ontogeny. *Biochem. Biophys. Acta*, v.130, p.511-513, 1966.
- AMAR, A.; MANDAL, S.; SANYAL, A.K. Effect of brain monoamines on the secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v.101, n.2, p.180-186, 1982.
- ANTONI, F.A.; PALKOVITS, M.; MAKARA, G.B.; LINTON, E.A.; LOWRY, P.J.; KISS, J.S. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamo-infundibular tract. *Neuroendocrinology*, v.36, p.415-423, 1983.
- AXELROLD, J.V.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation *Science*, v.224, p.452-459, 1984.
- BEESLEY, J.E. *Immunocitochemistry - A practical approach*. Oxford University Press, 1993.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N. Glândulas Adrenais. In: *Fisiologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 1996. p.890-919.
- BERTLER, A.; ROSENGREN, E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*, v.15, n.1, p.10-11, 1959a.
- _____. Occurrence and distribution of catechol amines in brain. *Acta*

Physiologica Scandinavica, v.47, p.350-361, 1959b.

- BHATNAGAR, S.; MEANEY, M.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non-handled rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v.7, p.97-108, 1995.
- BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O.; NOBIN, A. Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Research*, v.89, p.29-42, 1975
- BJÖRKLUND, A.; MOORE, R.Y.; NOBIN, A.; STENEVI, U. The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron system in the rat brain. *Brain research*, v.51, p.171-191, 1973.
- BJÖRKLUND, A.; NOBIN, A. Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cells group in the rat diencephalon. *Brain research*, v.51, p.183-205, 1973.
- BLASCHKO, H. Metabolism and storage of biogenic amines. *Experientia*, v.13, p.9-12, 1957.
- BLISS, E.L.; AILION, J. Relationship of stress and activity to brain dopamine and homovanilic acid. *Life Science*, v.10, p.1161-1169, 1971.
- BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o sistema nervoso central. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds). *Goodman & Gilman: Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw Hill. Seção II, p. 77-102, 1996.
- BOUTHENET, M.-L.; SOUIL, E.; MARTRESS, M.-P.; SOKDOFF, P.; GIROS, B.; SCHWARTZ, J.-C. Localization of dopamine D₃ receptor mRNA in the rat brain using *in situ* hybridization histochemistry: comparison with dopamine receptor D₂ mRNA. *Brain Research*, v.564, p. 203-219, 1991.
- BOUYER, J.J.; JOH, T.H.; PICKEL, V.M. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *The Journal of Comparative Neurology*, v.227, p.92-103, 1981.
- BRUHN, T.O.; PLOTSKY, P.M.; VALE, W.W. Effect of paraventricular lesions on corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the stalk-median eminence: studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF. *Endocrinology*, v.114, p.57-62, 1984.
- BUIJS, R.M.; GEFFARD, M.; POOL, C.W.; HOORNEMAN, E.M.D. The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. *Brain Research*, v.323, p.65-72, 1984.
- CARLSSON, A.; FALCK, B.; HILLARP, NA. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiologica scandinavica*, v.56, p.1-28, 1962. Suplemento 196.
- CHAN-PALAY, V.; ZABORSKY, L.; KÖHLER, C.; GOLDSTEIN, M.; PALAY, S.L.

- Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *The Journal of Comparative Neurology*, v.227, p.467-496, 1984.
- CHEN, C.L.C.; DIONNE, F.T.; ROBERTS, J.L. Regulation of the pro-opiomelanocortin mRNA levels in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.80, p.211-215, 1983.
- CHROUSOS, G.P. Stress as a medical and scientific idea and its implications. *Advances in Pharmacology*, v.42, p.552-556, 1998.
- CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, v.267, n.9, p.1244-1252, 1992.
- COGESSHALL, R.E. A consideration of neural counting methods. *Trends in Neurosciences*, v.15, n.1, p.9-13, 1992.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. *The biochemical basis of neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 1991.
- COYLE, J.T.; AXELROD, J. Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *Journal of Neurochemistry*, v.19, p.1117-1123, 1972.
- COYLE, J.T.; HENRY, D. Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *Journal of Neurochemistry*, v.21, p.61-67, 1973.
- CULLINAM, W.E.; HERMAN, J.P.; HELMREICH, D.L.; WATSON JR., S.J. A neuroanatomy of stress. In: Friedman, M.J.; Charney, D.S.; Deutch, A.Y. (eds). *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishes, 1995. p. 3-26.
- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.62, p.1-55, 1964. Suplemento 232.
- DAIKOKU, S.; KAWANO, H.; OKAMURA, Y.; TOKUZEN, M.; NAGATSU, I. Ontogenesis of immunoreactive tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat hypothalamus. *Developmental Brain Research*, v.28, p.85-98, 1986.
- DECAVEL, C.; GEFFARD, M.; CALAS, A. Comparative study of dopamine- and noradrenaline-immunoreactive terminals in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neuroscience Letters*, v.77, p.149-154, 1987.
- DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of Infantile stimulation. *Psychological Review*, v.71, p.335-351, 1964.
- DENENBERG, V.H.; BRUMAGHIM, J.T.; HALTMAEYER, G.C.; ZARROW, M.X. Increased adrenocortical activity in the neonatal rat following handling.

Endocrinology, v.81, n.5, p.1047-1052, 1967.

EATON, M.J.; CHEUNG, S.; MOORE, K.E.; LOOKINGLAND, K.J. Dopamine-receptor-mediated regulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*, v.738, p.60-66, 1996.

EVERITT, B.J.; HÖKFELT, T.; WU, JY.; GOLDSTEIN, M. Coexistence of tyrosine hydroxylase-like and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, v.39, p.189-191, 1984.

EVERITT, B.J.; MEISTER, B.; HÖKFELT, T.; MELANDER, T.; TERENIUS, L.; RÖKAEUS, A.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; DOCKRAY, G.; EDWARDSON, J.; CUELLO, C.; ELDE, R.; GOLDSTEIN, M.; HEMMINGS, H.; OUIMET, C.; WALAAS, I.; GREENGARD, P.; VALE, W.; WEBER, E.; WU, JY.; CHANG, KJ. The hypothalamic arcuate nucleus- median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Research Reviews*, v.11, p.97-155, 1986.

FARAH, J.H., MALCOLM, JR, D.S.; MUELLER, G.P. Dopaminergic inhibition of pituitary β -endorphin-like immunoreactivity secretion in the rat. *Endocrinology*, v.110, p.657-659, 1982.

FRANCIS, D.; DIORIO, J., LaPLANTE; WEAVER, S.; SECKL, J.; MEANEY, M. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.794, p.136-152, 1996.

FREMEAU, JR, R.T.; DUNCAN, G.E.; FOMARETTO, M.-G.; DEARRY, A.; GINGRICH, J.A.; BREESE, G.R.; CARON, M.G. Localization of D₁ dopamine mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl. Acad Sci USA*, v.88, p.3772-3776, 1991.

FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiologica scandinavica*, v.64, p.37-84, 1965. Suplemento 247.

GALLYAS, F.; GÖRCS, T.; MERCHENTHALER, I. High-grade intensification of end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry*, v.30, p.183-184, 1982.

GOUDREAU, J.L.; LINDLEY, S.E.; LOOKINGLAND, K.J.; MOORE, K.E. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, v.56, p.100-105, 1992.

GOULD, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.743, p.73-93,

1994.

GRAHAM, J.R.; KARNOVSKY, M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney, ultrastructural cytochemistry by a new technique. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.14, n.4, p.291-302, 1966.

GUILLAMÓN, A.; de BLAS, M.R.; SEGOVIA, S. Effects of sex steroids on the development of the locus coeruleus in the rat. *Developmental Brain Research*, v.40, p.306-310, 1988.

HESS, J.L.; DENENBERG, V.H.; ZARROW, M.X.; PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling of infancy. *Physiology & Behavior*, v.4, p.109-111, 1969.

HÖKFELT, T.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; JOHANSSON, O. Evidence for adrenaline neurons in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.89, p.286-288, 1973.

_____. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. *Brain Research*, v.66, p.235-251, 1974.

HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacological Reviews*, v.18, n.2, p. 925-964, 1966.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry Cytochemistry*, v.29, p.577-580, 1981.

IBATA, Y.; KAWAKAMI, F.; FUKUI, K.; OBATA-TSUTO, H.L.; TANAKA, M.; KUBO, T.; OKAMURA, H.; MORIMOTO, N.; YANAHARA, C.; YANAHARA, N. Light and electron microscopic immunocytochemistry of neurotensin-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. *Brain Research*, v.302, p.221-230, 1984.

IMBODEN, H.; FELIX, D. Immunocytochemistry in brain tissue. *Methods in Neuroscience*, v.24, p.236-260, 1995.

IMPERATO, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; CASOLINI, P.; ZOCCHI, A.; ANGELUCCI, L. Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterone. *European Journal of Pharmacology*, v.165, p.337-338, 1989.

INGLIS, F.M.; MOGHADDAM, B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*, v.72, n3, p.1088-1094, 1999.

JÖHREN, O.; SANVITTO, G.L.; EGIDY, G.; SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT1A receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in

- dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. *The Journal of Neuroscience*, v.17, n.21, p.8283-8292, 1997.
- KAWA, A.; YOSHIYASU, T.; KATSUMI, M.; SEIICHIROYU, T.A.; TAKESHI, A.; FUMIO, K.; TAKUYA, K. Effect of intraventricular administration of noradrenaline and dopamine on the levels of corticosterone in the rats and denervation hypersensitivity resulting from intraventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Life Sciences*, v.23, p.991-998, 1978.
- KAWANO, H.; DAIKOKU, S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*, v.265, p.242-253, 1987.
- KEHOE, P.; SHOEMAKER, W.J.; TRIANO, L.; CALLAHAN, M.; RAPPOLT, G. Adult rats stressed as neonates show exaggerated behavioral responses to both pharmacological and environmental challenges. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, n.1., p.116-125, 1998.
- KHUN, C.M.; PAUK, J.; SCHANBERG, S.M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Develop Psychobiol*, v.23, p.395-410, 1990.
- KOBAYASHI, R.M.; PALKOVITS, M.; KOPIN, I.J.; JACOBOWITZ, D.M. Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Research*, v.77, p.269-279, 1974.
- KONIGSMARK, B.W. Methods for the counting of neurons. In: *Contemporary Research methods in neuroanatomy*. Nauta, W.J.H.; Ebesson, S.O.E. (eds). New York: Springer-Verlag, 1970. p.315-340.
- KVETNANSKÝ, R.; PACÁK, K.; SABBAN, E.L.; KOPEN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Advances in Pharmacology*, v.42, p.552-556, 1998.
- LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in Infancy. *Science*, v.135, p.795-799, 1962.
- _____. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.746, p.275-293, 1994.
- _____. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.697, p.61-69, 1993.
- LEVINE, S.; HUCHTON, D.M.; WIENER, S.G.; ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant. *Develop Psychobiol*, v.24, p.547-558, 1991.
- LINDVALL, O.; BJÖRKLUND, A.; SKAGERBERGER, G. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei.

Brain Research, v.306, p.19-30, 1984.

LIPOSITS, Zs.; PAULL, W.K. Association of dopaminergic fibers with corticotropin releasing-hormone (CRH)-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Histochemistry*, v.93, p.119-127, 1989.

LIPOSITS, Zs.; SHERMAN, D.; PHELIX, C.; PAULL, W.K. A combined light and electron microscopic immunocytochemical method for the simultaneous localization of multiple tissues antigens. Tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rats. *Histochemistry*, v.85, p.95-106, 1986.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J.C.; FRANCIS, D.D.; MEANEY, M. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, v.3, n.8, p.799-806, 2000.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P.; MEANEY, M. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, v.277, n.5332, p. 1659-1662, 1997.

LOIZOU, L.A. The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Research*, v.40, p.395-418, 1972.

LOIZOU, L.A.; SALT, P. Regional changes in monoamines of the rat brain during postnatal development. *Brain Research*, v.20, p.467-470, 1970.

LUCION, A.B.; PADOIN, M.J.; PEREIRA, F.; MANDARIM-de-LACERDA, C.A.; SCHENEIDER, F.L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex (F2) of rats submitted to neonatal stimulation. In: 29 Annual Meeting of Society for Neuroscience, 1999, Miami Beach, FLA. Anais... v.25, part 1, p.617, 1999.

LUPPI, P.H.; SAKAI, K.; SALVERT, D.; BEROD, A., JOUVET, M. Periventricular dopaminergic neurons terminating in the neuro-intermediate lobe of the cat hypophysis. *The Journal of comparative Neurology*, v.244, p.204-212, 1986.

MAYHEW, T.M. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *Journal of Neurocytology*, v.21, p.313-328.

McGEER, E.G.; GIBSON, S.; WADA, J.A.; McGEER, P.L. Distribution of tyrosine hydroxylase activity in adult and developing brain. *Canadian Journal of Biochemistry*, v.45, p.1943-1952, 1967.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Developmental Brain Research*, v.22, p.301-304, 1985.

MEANEY, M.J.; DORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.;

- SMITHE, J.W.; SHARMA, S.; TANNENHAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.746, p.260-273, 1994.
- MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMITHE, J.W.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.697, p.70-85, 1993.
- MELIA, K.R.; et al. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.88, n.19, p.8382-8386, 1991.
- MISTRETTA, Ch.M.; BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain and Behavioral development. In: *Studies on the development of behavior and nervous System*. New York: Academic Press, 1978. p. 215-246.
- MØLLER, A.; STRANGE, P.; GUNDERSEN, H.J.G. Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the dissector. *Journal of Microscopy*, v.159, p.61-71, 1989.
- MOORE, K.E.; DEMAREST, K.T.; JOHNSTON, C.A. Influence of prolactin on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. *Fed. Proc.*, v.39, n.11, p.2912-2916, 1980.
- MOORE, K.E.; DEMAREST, K.T.; LOOKINGLAND, K.J. Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuropharmacology*, v.26, n.7B, p.801-808, 1987.
- MOORE, R.Y.; BLOOM, F.E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Reviews Neuroscience*, v.1, p.129-169, 1978.
- MOOS, F.; RICHARD, P. Excitatory effect of dopamine on oxytocin and vasopressin reflex releases in the rat. *Brain Research*, v.241, p.249-260, 1982.
- NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *Journal Biol. Chem.*, v.239, p.2910-2917, 1964.
- NAKAMURA, H.; MOROGI, T.; NOHARA, S.; NAKAMURA, H.; OKADA, A. Activation of cerebral dopaminergic systems by noise and whole-body vibration. *Environmental Research*, v.57, p.10-18, 1992.
- NUÑEZ, J.F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, R.M.; TOBENÁ, A.; FERNANDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiology & Behavior*, v.60, n.5, p. 1355-1359, 1996.

- OKAMURA, H.; MURAKAMI, S.; CHIRARA, K.; NAGATSU, I.; IBATA, Y. Coexistence of growth hormone releasing factor-like and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, v.41, p.177-179, 1985.
- PALKOVITS, M.; KOBAYASHI, R.M.; KIZER, J.S.; JAKOBOWITZ, D.M.; KOPIN, I.J. Effects of stress on catecholamines and tyrosine hydroxylase activity of individual hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology*, v.18, p.144-153, 1975.
- PALKOVITS, M.; MEZEY, E.; ZÁBORSZKY, A.; FEMINGER, A.; VERSTEEG, D.H.G.; WIJNEM, H.J.L.M.; de JONG, W.; FEKETE, M.I.K.; HERMAN, J.P.; KANYICSKA, B. Adrenergic innervation of the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, v.18, p.237-243, 1980a.
- PALKOVITS, M.; ZÁBORSZKY, A.; FEMINGER, A.; MEZEY, E.; FEKETE, M.I.K.; HERMAN, J.P.; KANYICSKA, B.; SZABÓ, D. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus experimental biochemical and electronmicroscopic studies. *Brain Research*, v.191, p.161-171, 1980b.
- PASSO, S.S.; THORNBOROUGH, J.R.; FERRIS, C.F. A functional analysis of dopaminergic innervation of the neurohypophysis. *American Journal Physiology*, v.241, p.E186-E190, 1981.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1997.
- PEINADO, M.A.; PEDROSA, J.A.; RODRIGO, J. (eds). *Inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaén: Universidad, 1996.
- PEREIRA, G.A.M. Expressão da imunorreatividade à somatostatina no hipotálamo de ratos de 11 dias de vida pós-natal submetidos à estimulação neonatal. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- PICKEL, V.M.; BECKLEY, S.C.; JOH, T.H.; REIS, D.J. Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Research*, v.225, p.373-385, 1981.
- PLOTSKY, P.M.; CUNNINGHAM, E.T.J.; WIDMAIER, E.P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology Reviews*, v.547, p.7-12, 1989.
- PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, v.18, p.195-200, 1993.
- RADNAI, Z.; ENDROCZI, E. Involvement of dopaminergic receptors in action of corticotropin releasing factor (CRF) under *in vitro* conditions. *Acta Physiol*

Acad Sci Hung, v.54, n.2, p.129-139, 1979.

- REICHLIN, S. Neuroendocrinology: hypothalamus and pituitary. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W.; Kronenberg, H.M.; Larsen, P.R. (eds). *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p. 165-248.
- ROSENFELD, P.; GUTIERREZ, Y.R.; MANTIN, A.M.; MALLET, H.A.; ALLEVA, E.; LEVINE, S. Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rat. *Physiology & Behavior*, v.50, p.661-671, 1991.
- SAAVEDRA, J.M.; PALKOVITS, M.; KIZER, J.S.; BROWNSTEIN, M.; ZIVIN, J.A. Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *Journal of Neurochemistry*, v.25, p.257-260, 1975.
- SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance or glucocorticoid endangerment of hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.746, p.294-307, 1994.
- SAPOLSKY, R.M.; MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*, v.11, p.65-76, 1986.
- SCHWARTZ, J.H. Chemical messengers: small molecules and peptides. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. (eds). *Principles of Neural Science*. Norwalk: Appleton & Lange, Part III, 1991. p.213-224.
- SENOGLES, S.E. The D₂ dopamine receptor mediates inhibition of growth in GH42R7 cells: involvement of protein kinase-C epsilon. *Endocrinology*, v.134, p.783-789, 1994.
- STANTON, M.E.; GUTIERREZ, Y.R.; LEVINE, S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. *Behavioural Neurosciences*, v.102, p.692-700, 1988.
- STENBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J.; EMEYER, H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *The Journal of Histochemistry and citochemistry*, v.18, n.5, p.315-333, 1970.
- STOLL, G.; MARTIN, R.; VOIGHT, K.-H. Control of peptide release from cells of the intermediate lobe of the rat pituitary. *Cell Tissue Research*, v.236, p.561-566, 1984.
- STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.771, p.1-18, 1995.
- SUCHECKI, D.; MOZZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat.

Neuroendocrinology, v.57, p.204-212, 1993.

SUDHA, S.; PRADHAN, N. Stress-induced changes in regional monoamine metabolism and behavior in rats. *Physiology & Behavior*, v.57, n.6, p.1061-1066, 1995.

SWANSON, L.W.; KUYPERS, H.G.J.M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *The Journal of comparative Neurology*, v.194, p.555-570, 1980.

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Reviews Neuroscience*, v.6, p.269-324, 1983.

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; BÉROD, A.; HARTMAN, B.K.; HELLE, K.B.; VANORDEN, D.E. An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *The Journal of comparative Neurology*, v.196, p.271-285, 1981.

THIERRY, A.M.; JAVOY, F.; GLOWINSKY, J.; KETY, S.S. Effect of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.163, p.163-171, 1968.

THIERRY, A.M.; TASSIN, J.P. ; BLANC, G.; GLOWINSKY, J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature*, v.263, p.242-244, 1976.

TILDERS, F.J.H.; MULDER, A.H.; SMELIK, P.G. On the presence of a MSH-release inhibiting system in the rat neurointermediate lobe. *Neuroendocrinology*, v.18, p.125-130, 1975.

TILDERS, F.J.H.; VAN der WOUDE, H.A.; SWAAB, D.F.; MULDER, A.H. Identification of MSH-release-inhibiting elements in the neurointermediate lobe of the rat. *Brain Research*, v.171, p.425-435, 1979.

UDENFRIEND, S. Tyrosine hydroxylase. *Pharmacological Reviews*, v.18, p.43-51, 1966.

UGRUMOV, M.V.; TAXI, J.; TIXIER-VIDAL, A.; THIBAUT, J.; MITSKEVICH, M.S. Ontogenesis of tyrosine hydroxylase immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cell bodies. *Neuroscience*, v.29, n.1, p.135-156, 1989.

UNGERSTEDT, W. Stereotaxic mapping of monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiologica scandinavica*, v.367, p.1-48, 1971.

URSIN, H.; OLFF, M. The stress response. In: Stanford, SC e Salmon, P (eds).

- Stress: from synapse to syndrome*. London: Academy Press Ltd, 1993. p.3-22.
- VAN den POL, A.N.; HERBST, R.S.; POWELL, J.F. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience*, v.13, n.4, p.1117-1156, 1984.
- WALKER, C.D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*, v.118, n.4, p.1445-1451, 1986.
- WANG, C.T.; HUANG, R.C.; TAI, M.Y.; TSAI, Y.F.; PENG, M.T. Dopamine release in the nucleus accumbens during sexual behavior in prenatally stressed adult male rats. *Neuroscience Letters*, v.200, n.1, p.29-32, 1995.
- WATANABE, H. Activation of dopamine synthesis in mesolimbic dopamine neurons by immobilization stress in the rat. *Neuropharmacology*, v.23, p.1335-1338, 1984.
- WINKELMANN, E.C.; PEREIRA, F.M.; SANVITTO, G.L.; FRANCI, J.A.F.; LUCION, A.B. Estimulação neonatal, número e tamanho de neurônios do locus coeruleus em ratas. In: XV Reunião Anual de sociedades de Biologia Experimental, 2000, Caxambu, MG. Anais... p. 43.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1984.