



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia

Manipulação Neonatal, Aprendizado Olfatório e Reprodução em Ratos

Charlis Rainecki

Porto Alegre – 2006



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia

Manipulação Neonatal, Aprendizado Olfatório e Reprodução em Ratos

*Tese apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas: Fisiologia.*

Charlis Rainecki

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre - 2006

"A verdade em ciência pode ser definida como a hipótese de trabalho melhor adequada para abrir caminho para uma próxima que seja melhor."

Konrad Lorenz

"O meu único objetivo, na realidade que então me existia, era o de descobrir os segredos da natureza, aprender, experimentar. E registrar, para um incerto proveito de alguém, aquilo que conseguisse encontrar. E assim foi."

Fernil

"É mais freqüente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento. São os que conhecem pouco, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência."

Charles Darwin

"Aos Meus Pais"

Agradecimientos

A *Deus* pela oportunidade de chegar até aqui e conseguir superar todas as dificuldades.

Ao meu orientador *Professor Dr. Aldo Bolten Lucion* pela oportunidade concedida, pela confiança, pela compreensão e pelos ensinamentos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho, permitindo o meu ingresso no mundo científico.

Aos *Professores Dr. Martin Cammarota e Dra. Lia Bevilaqua* do *Centro de Memória da PUC* por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos. Também pelo apoio teórico que muito contribuiu para a composição desse trabalho.

Ao *Professor Dr. Gilberto Sanvitto* pelo auxílio e contribuições durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

À *Professora Dra. Janete A. Anselmo-Franci* e ao pós-doutorando *Raphael Szawka* do *Laboratório de Neuroendocrinologia da USP-RP* por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos.

À *Professora Dra. Adriane Belló-Klein* e a doutoranda *Jaqueline Barpp* do *Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS* por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Aos professores membros da banca examinadora ***Dra. Annabel Ferreira*** (Universidad de la Republica), ***Dra. Deborah Suchecki*** (Universidade Federal de São Paulo) e ***Dr. Carlos Alexandre Netto*** (UFRGS) pela atenção, interesse e sugestões.

À ***Cármem, Ana Lúcia, Márcia Azevedo e Márcio*** pela grande amizade e companheirismo; pessoas especiais que me acompanharam durante toda a minha trajetória dentro do laboratório.

Às amigas ***Sara, Andréa, Ligia e Juliana de Castilhos*** pela grande amizade; pessoas especiais com quem convivi durante os caminhos da Pós-Graduação

À ***Maiara, Marta, Luz Felipe e Vanise***, alunos de *Iniciação Científica* que auxiliaram, e muito, na realização dos experimentos dessa tese e também pela amizade.

Aos amigos e colegas de laboratório ***Clarice, Anelise, Márcia Breigeiron, Natália, Rosane, Elisa, Gabriela, Rosana, Fernando, Isabel, Camila, Ana Raquel, Marcelo, Ligia, Tatiane e Caroline***, pelos bons momentos vividos durante esse período, agradeço pelo carinho e atenção sempre demonstrado.

Aos amigos ***Juliana Bonini, Janine e Weber*** pelos bons momentos e pelo auxílio enquanto estive trabalhando no *Centro de Memória*.

À bioterista *Ângela* que cuidou dos animais, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho.

Aos meus pais *Rodolfo Raineki* e *Geni Pisatis Raineki*, por serem meu porto seguro, meu estímulo e apoio incondicional desde o primeiro minuto; pelo grande amor, enfim, muito obrigado por tudo.

Um agradecimento muito especial à *minha família*, que mesmo distantes, sempre estiveram do meu lado apoiando e incentivando em todos os momentos.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia* pela oportunidade de fazer parte desse curso.

Às secretárias da Pós-Graduação *Uíra, Alice, Fabiana, Ana* e *Andréia*; sempre disponíveis para solucionar os problemas.

Ao *CNPq* e *FAPESP* órgãos que tornaram economicamente possíveis e viáveis a realização de todos os experimentos apresentados nessa tese.

A todo que, cientes ou não, contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

Resumen

Apresentação

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	1
Manipulação Neonatal	2
Relação mãe-filhote	6
OBJETIVO GERAL:	8
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE O APRENDIZADO OLFATÓRIO	9
INTRODUÇÃO	10
Sistema Olfatório	10
Aprendizado Olfatório	11
Aprendizado Olfatório e Via Noradrenalina/CREB	12
Aprendizado Olfatório e Óxido Nítrico	16
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVOS:	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
Animais	19
Manipulação Neonatal	19
Protocolo Experimental	21
Procedimentos Utilizados	23
Análise Estatística	27
RESULTADOS	29
<i>Experimento I – Preferência pelo odor maternal em filhotes manipulados no período neonatal.</i>	29
<i>Experimento II – Participação da via Noradrenalina/CREB no aprendizado olfatório em filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.</i>	33
<i>Experimento III – Produção de óxido nítrico no bulbo olfatório de filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.</i>	37
DISCUSSÃO	38
CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A PREFERÊNCIA SEXUAL	46
INTRODUÇÃO	47
Manipulação Neonatal e Reprodução	47
Sistema Olfatório e Motivação Sexual	48
JUSTIFICATIVA	50
OBJETIVOS:	50
MATERIAL E MÉTODOS	
Protocolo Experimental	
Procedimentos Utilizados	53
Análise Estatística	57
RESULTADOS	58

<i>Experimento I – Preferência sexual em diferentes fases do ciclo estral de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal.</i>	58
<i>Experimento II – Preferência sexual de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal: efeito da experiência sexual.</i>	60
<i>Experimento III – Preferência sexual de machos adultos manipulados no período neonatal: efeito da experiência sexual.</i>	63
DISCUSSÃO	67
CAPÍTULO 4 - EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE GNRH EM FÊMEAS	76
INTRODUÇÃO	77
Reprodução em Fêmeas	77
Manipulação Neonatal e Reprodução em Fêmeas	85
JUSTIFICATIVA	87
OBJETIVO:	87
MATERIAL E MÉTODOS	88
Protocolo Experimental	88
Procedimentos Utilizados	89
Análise Estatística	92
RESULTADOS	93
<i>Experimento I – Produção de noradrenalina em ratas adultas manipuladas no período neonatal.</i>	93
<i>Experimento II – Produção de óxido nítrico em ratas adultas manipuladas no período neonatal.</i>	95
DISCUSSÃO	96
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	100
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS	103
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXOS	127

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO. Para o filhote aprender a ter preferência por um odor é necessário o pareamento deste odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003).	13
Figura 2. Foto ilustrativa do protocolo de manipulação neonatal.	20
Figura 3. A figura A mostra a descrição visual do esquema utilizado para o teste de preferência olfatória. A figura B mostra a caixa utilizada para o teste de preferência olfatória, onde se vê as duas áreas contendo as maravalhas e a linha neutra (em vermelho) que divide as duas áreas. A figura C mostra o posicionamento do filhote no início de cada teste.	24
Figura 4. Preferência pelo odor maternal em ratos, fêmeas (A) e machos (B). Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias seguido de <i>Newman-Keuls</i> . * $p < 0,0001$ quando comparado área com maravalha do ninho e área com maravalha limpa dentro do mesmo grupo. Para fêmeas $n = 12 - 15$, e para machos $n = 14 - 17$.	31
Figura 5. Preferência pelo odor da maravalha da caixa moradia do outro grupo experimental, em fêmeas (A) e machos (B). Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste <i>t</i> de <i>Student</i> . Para fêmeas * $p < 0,002$ e para machos * $p = 0,05$ quando comparado com a área com maravalha do ninho manipulado. O $n = 8$ para todos os grupos de fêmeas e machos.	32
Figura 6. Conteúdo de NA (A) e MHPG (B) e taxa de MHPG/NA (C) no bulbo olfatório de ratas aos 7 dias de idade. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de <i>Newman-Keuls</i> . Para NA * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. Para MHPG * $p < 0,009$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para a taxa MHPG/NA * $p < 0,03$ quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. O $n = 6$ para o grupo não-manipulado, $n = 7$ para os grupos manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia.	34
Figura 7. Conteúdo de CREB e pCREB no bulbo olfatório de ratas aos 7 dias de idade. Em cima (A), figura representativa dos <i>western blots</i> de CREB e pCREB. Em baixo (B), porcentagem da densidade óptica de CREB e pCREB em relação ao grupo não-manipulado. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de <i>Newman-Keuls</i> . * $p < 0,03$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para CREB $n = 3$ e para pCREB $n = 5$ em todos os grupos .	36
Figura 8. Conteúdo de NOx no BO de filhotes fêmeas. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste <i>t</i> de <i>Student</i> . Para o grupo não-manipulado $n = 10$ e para o grupo manipulação repetida $n = 9$.	37

Figura 9. A figura **A** mostra o esquema utilizado para o teste de preferência sexual, onde o rato a ser testado se ambienta por 15 minutos e a seguir os animais-estímulos são colocados e se inicia a filmagem dos comportamentos por 15 minutos. A figura **B** mostra a caixa utilizada para o teste de preferência sexual. 54

Figura 10. Preferência sexual de fêmeas na noite do proestro e diestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com macho sexualmente ativo dentro do mesmo grupo. $n = 12 - 15$ para todos os grupos. 59

Figura 11. Preferência sexual de fêmeas e experiência sexual. Em **A** a escolha da rata testada é entre um macho sexualmente ativo e um macho castrado, em **B** a escolha da rata testada é entre um macho sexualmente ativo e uma fêmea receptiva. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com macho sexualmente ativo dentro do mesmo grupo. $n = 10 - 12$ para todos os grupos. 62

Figura 12. Preferência sexual de machos e experiência sexual. Em **A** a escolha do rato testado é entre uma fêmea receptiva e uma fêmea não-receptiva, em **B** a escolha do rato testado é entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com a fêmea receptiva dentro do mesmo grupo. $n = 11 - 18$ para todos os grupos. 66

Figura 13. Diagrama esquemático da integração entre o neurônio noradrenérgico, interneurônio NOérgico e o neurônio produtor de GnRH (Rettori *et al.* 1993). 84

Figura 14. Conteúdo de NA (**A**) e MHPG (**B**) e taxa de MHPG/NA (**C**) na APOM e HMB de ratas na tarde do proestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de *Student*. Para APOM: grupo não-manipulado $n = 10$, grupo manipulação repetida $n = 9$. Para HMB: grupo não-manipulado $n = 10$, grupo manipulação repetida $n = 8$. 94

Figura 15. Conteúdo de NOx no hipotálamo total de ratas na tarde do proestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de *Student*. * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para o grupo não-manipulado $n = 9$ e para o grupo manipulação repetida $n = 8$. 95

Lista de Abreviaturas

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA - análise de variância
APOM - área pré-óptica medial
BNST - núcleo da base da estria terminal
BO - bulbo olfatório
BOA - bulbo olfatório acessório
BOP - bulbo olfatório principal
CBP - proteína ligante ao CREB
CRE - elemento responsivo ao AMPc
CREB - proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
CRH - hormônio liberador de corticotrofinas
e-NOS - óxido nítrico sintase endotelial
EPM - erro padrão da média
FSH - hormônio folículo-estimulante
GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas
HMB - hipotálamo médio basal
HPA - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC-ED - cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica
i-NOS - óxido nítrico sintase induzida
i.p. - intraperitônio
LC - *locus coeruleus*
LH - hormônio luteinizante
L-NMMA - N-mono-metil-L-arginina
ME - eminência mediana
MHPG - 3-metoxi-4-hidroxifeniletanol
mPN - núcleo pré-óptico mediano
NA - noradrenalina
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
NOx - nitritos e nitratos
n-NOS - óxido nítrico sintase neuronal
OVTL - órgão vascular da lâmina terminal
OVX - ovariectomizadas

- pCREB - proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc fosforilada
- PKA - proteína quinase dependente de AMPc
- PRL - prolactina
- PVN - núcleo paraventricular
- SNC - Sistema Nervoso Central
- SNP - *sodium nitropurside*
- SON - núcleo supraóptico
- VMH - núcleo ventromedial

Resumo

Raineki, Charlis. **Manipulação Neonatal, Aprendizado Olfatório e Reprodução em Ratos**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

Em ratos, um procedimento simples, como “manipular” os filhotes por alguns minutos durante as duas primeiras semanas de vida, pode marcar decisivamente o desenvolvimento do indivíduo. Assim, esse modelo experimental tem sido muito utilizado para se examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal podem afetar seu desenvolvimento. A manipulação neonatal tem como consequência, na vida adulta, uma série de alterações comportamentais e neuroendócrinas que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo. Por outro lado, esse procedimento também induz a uma diminuição da função reprodutiva tanto em machos quanto em fêmeas. No entanto, os mecanismos neurais afetados por essas intervenções no período neonatal são pouco conhecidos.

Em filhotes de ratos, a identificação da mãe é vital para a sobrevivência. Esse reconhecimento ocorre devido ao aprendizado olfatório, que se dá por condicionamento, através do pareamento do cuidado maternal (estímulo tátil) com o cheiro da mãe. O estímulo tátil, realizado pela mãe, atua sobre o *locus coeruleus* promovendo um aumento na liberação de noradrenalina no bulbo olfatório, que vai resultar na fosforilação do CREB, fundamental para a formação da memória olfatória. Os resultados apresentados nessa tese mostram que a manipulação neonatal repetida interfere com esse aprendizado olfatório, impedindo o reconhecimento do odor maternal. Esse efeito da manipulação neonatal é dependente de sexo, pois apenas as fêmeas foram afetadas. A manipulação neonatal interfere com a via noradrenalina/CREB, pois as ratas do grupo manipulação repetida aos 7 dias após o nascimento apresentam uma redução no conteúdo de noradrenalina no bulbo olfatório e um aumento no conteúdo de MHPG (metabólito da noradrenalina), indicando um aumento da atividade noradrenérgica no bulbo olfatório. Esse aumento pode interferir com a fosforilação do CREB, uma vez que os ratos manipulados não apresentam um aumento na fosforilação do CREB. Portanto, a ausência do reconhecimento da mãe, pelo filhote manipulado, provavelmente seja devido a um aumento da estimulação tátil que o filhote recebe o que, por sua vez, altera o sistema noradrenérgico, que está envolvido na regulação da fosforilação do CREB, fundamental para a formação da memória olfatório no bulbo olfatório.

Além de interferir na relação mãe-filhote, experiências no início da vida do indivíduo podem determinar o comportamento sexual do animal quando adulto, isto provavelmente ocorre porque os odores que são associados à infância, apresentam um valor na vida adulta, entretanto, o papel desse odor muda da infância (reconhecimento da mãe) para a vida adulta (reprodução). Os resultados apresentados nessa tese mostraram que a manipulação neonatal repetida reduz a motivação sexual tanto em machos quanto em fêmeas, evidenciado pelo teste de preferência sexual. O efeito da manipulação neonatal sobre a ausência de preferência sexual é dependente de sexo, pois em machos a experiência sexual foi capaz de reverter esse efeito, o que não aconteceu em fêmeas.

Assim como a motivação sexual adequada, a regulação da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) também é essencial para o sucesso reprodutivo. O GnRH desempenha um papel crucial na receptividade sexual e na ovulação. O sistema noradrenérgico e o óxido nítrérgico apresentam um papel fundamental na regulação indireta da secreção do GnRH. Ratas manipuladas no período neonatal, quando adultas, apresentam um aumento do conteúdo de GnRH na área pré-óptica medial. Os resultados apresentados nessa tese mostraram que a manipulação neonatal repetida não altera o conteúdo de noradrenalina e MHPG na pré-óptica medial e hipotálamo médio basal. No entanto, o conteúdo de óxido nítrico no hipotálamo está reduzido nas ratas do grupo manipulação repetida, podendo ser uma das prováveis causas do aumento do conteúdo de GnRH na pré-óptica medial da rata manipulada no período neonatal, resultando na redução do pico de LH na tarde do proestro e conseqüentemente na redução da ovulação.

Em conclusão, a manipulação no período neonatal interfere negativamente no estabelecimento de relações sociais como a relação mãe-filhote e a escolha do parceiro sexual.

Abstract

Raineki, Charlis. **Neonatal Handling, Olfactory Learning and Reproduction in Rats.** Thesis (Doctoral) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

In rats, a simple procedure as “handling” the pups for some minutes during the first two weeks of age may have strong impact in the development of the individual. Thus, this experimental procedure has been used to examine the mechanisms by which variations in the environment of the animal can affect its development. Neonatal handling promotes behavioral and neuroendocrine changes that are basically characterized by a reduction of the fear. Furthermore, this procedure also induces impairments in the reproductive function in males and females. However, neural mechanisms that are affected by these interventions in the neonatal period still remain unclear.

In rat pups, the identification of the mother is critical for the survival. This recognition is due to the olfactory learning, that occurs by conditioning, through pairing the maternal care (tactile stimulation) with the maternal odor. Tactile stimulation, performed by the mother, acts on *locus coeruleus* increasing noradrenaline release in the olfactory bulb, that results in the phosphorylation of CREB, crucial for the formation of the olfactory learning. The results presented in this thesis shows that repeated handling interferes with olfactory learning, preventing the recognition of the maternal odor. This effect of the neonatal handling is sex dependent, because only females has been affected. In addition, neonatal handling also interferes with the noradrenaline/CREB pathway, since the pups of the group repeated handling present a reduction in the noradrenaline levels and an increase in the MHPG levels in the olfactory bulb (noradrenaline metabolite), indicating an increase of the noradrenergic activity. This increase can interfere with the phosphorylation of CREB, because repeatedly handled rats do not present an increase in the phosphorylated CREB. Thus, the failure in the recognition of the mother by repeatedly handled pups can be due to an increase of the tactile stimulation received by them. Repeated handling modifies the noradrenergic system, that is involved in the regulation of the phosphorylation of CREB, critical for the formation of the olfactory learning.

Besides disrupting the mother-pup relationship, early-life experiences can also determine the sexual behavior of the animal in adulthood. This probably occurs because the odors that are associated with infancy retain value into adulthood, however, the role

of this odor changes from attachment to the mother in infancy to reproduction in adulthood. Results showed that the repeated handling reduces the sexual motivation in male and females in the sexual preference test. The effect of the neonatal handling on the absence of sexual preference is sex dependent, since in males the sexual experience was capable to revert this effect, an effect not observed in females.

Besides adequate sexual motivation, the regulation of the secretion of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) also is essential for the reproductive success. The GnRH plays a crucial role in the sexual receptivity and ovulation. The noradrenergic and the NOergic systems have critical roles in the indirect regulation of the GnRH secretion. In adulthood, neonatal handled female rats present an increase of the GnRH content in the medial preoptic area. Results showed that the repeated handling does not modify the noradrenaline and MHPG levels in the medial preoptic area and medial basal hypothalamus. However, reduced hypothalamic nitric oxide levels in the repeated handling rats were found, suggesting that this reduction as a possible cause of increased GnRH content in the medial preoptic area, resulting in the reduction of the LH surge in the afternoon of proestrus and consequently in the reduction of the ovulation.

In conclusion, handling in the neonatal period interferes negatively with the establishment of social relations, such as the mother-pup relationship and the choice of the sexual partner.

Resumen

Raineki, Charlis. **Manipulación Neonatal, Aprendizaje Olfativo y Reproducción en Ratas**. Tesis (Doctorado) – Programa de Postgrado en Ciencias Biológicas: Fisiología, Universidad Federal de Rio Grande do Sul, 2006.

En la rata, un procedimiento simple como la manipulación de las crías por algunos minutos durante las dos primeras semanas de vida, puede provocar cambios drásticos en el desarrollo de los individuos. Así, este modelo experimental ha sido muy utilizado para estudiar los mecanismos por los cuales variaciones en el ambiente temprano del animal pueden afectar su desarrollo. La manipulación neonatal produce alteraciones comportamentales y neuroendócrinas durante la edad adulta, caracterizadas por una disminución del miedo y de la función reproductiva de machos y hembras. Los mecanismos neurales involucrados en los efectos producidos por esta intervención neonatal son poco conocidos.

El reconocimiento de la madre es vital para la supervivencia de las crías de rata. Éste ocurre debido al aprendizaje olfativo que se da por condicionamiento, a través de la asociación del cuidado maternal (estímulo táctil) con el olor de la madre. Este estímulo táctil, brindado por la madre, actúa sobre el *locus coeruleus* promoviendo un aumento en la liberación de noradrenalina en el bulbo olfativo, que resulta en la fosforilación de CREB, fundamental para la formación de la memoria olfativa. Los resultados que se presentan en esta tesis muestran que la manipulación neonatal repetida interfiere con el aprendizaje olfativo de las crías, impidiendo el reconocimiento del olor maternal. Este efecto de la manipulación neonatal es dependiente del sexo, ya que solamente las crías hembras fueron afectadas. La manipulación neonatal interfiere en la vía noradrenalina/CREB, ya que las ratas hembras manipuladas durante los 7 primeros días de vida presentan una reducción en el contenido de noradrenalina en el bulbo olfativo y un aumento del contenido de MHPG (metabolito de la noradrenalina), indicando un aumento de la actividad noradrenérgica en el bulbo olfativo. Este aumento podría interferir con la fosforilación de CREB, ya que las ratas manipuladas no presentan un aumento de la misma. Por lo tanto, la ausencia de reconocimiento de la madre, por parte de la cría manipulada, se debería a un aumento de la estimulación táctil que éste recibe, lo que a su vez altera el sistema noradrenérgico, involucrado en la regulación de la fosforilación de CREB.

Alteraciones en la experiencia temprana de los individuos interfieren en la relación madre-cría y además pueden determinar el comportamiento sexual de los

animales adultos. Este fenómeno probablemente se deba a que los olores asociados durante la infancia continúan teniendo importancia en la vida adulta, sin embargo, el papel de ese olor cambia desde la infancia (reconocimiento de la madre) a la edad adulta (reproducción). Los resultados que se presentan en esta tesis muestran que la manipulación neonatal repetida reduce la motivación sexual tanto en machos como en hembras, durante la prueba de preferencia sexual. El efecto de la manipulación neonatal sobre la ausencia de preferencia sexual es dependiente del sexo, ya que el efecto fue revertido por la experiencia sexual en machos pero no en hembras.

Así como una motivación sexual adecuada, la regulación de la secreción de GnRH también es esencial para el éxito reproductivo. La GnRH desempeña un papel crucial en la receptividad sexual y la ovulación. El sistema noradrenérgico y el óxido nítrico tienen un papel fundamental en la regulación indirecta de la secreción de GnRH. Las ratas hembras manipuladas durante el período neonatal presentan un aumento en el contenido de GnRH en el área preóptica medial. Los resultados presentados en esta tesis muestran que la manipulación neonatal repetida no altera el contenido de noradrenalina y MHPG en el área preóptica medial ni en el hipotálamo medio basal. Entretanto, el contenido de óxido nítrico en el hipotálamo es menor en las ratas que sufrieron manipulación repetida, probablemente ocasionando el aumento en el contenido de GnRH observado en el área preóptica medial, resultando en una reducción en el pico de LH en la tarde del proestro y consecuentemente en una disminución de la ovulación.

En conclusión, la manipulación durante el período neonatal interfiere negativamente en el establecimiento de relaciones sociales, como el vínculo madre-cría y la elección del compañero sexual.

APRESENTAÇÃO

Essa tese, que tem por objetivo analisar o papel da manipulação neonatal no estabelecimento das relações sociais tanto no início da vida, como o reconhecimento da mãe pelo filhote, quanto na vida adulta, no reconhecimento do parceiro sexual, está estruturada em capítulos. O *Capítulo 1* traz uma introdução geral, descrevendo o modelo experimental de manipulação neonatal utilizado nesta tese. Os capítulos 2, 3 e 4 são a parte experimental da tese, e cada um está estruturado em: introdução, justificativa, objetivo, material e métodos e discussão. No *Capítulo 2*, se analisam os efeitos da manipulação sobre o aprendizado olfatório em filhotes. No *Capítulo 3*, são analisados os efeitos da manipulação neonatal sobre a motivação sexual em ratos adultos. No *Capítulo 4*, se analisam os efeitos da manipulação neonatal sobre mecanismos reguladores da secreção de GnRH em fêmeas adultas. Nos *Capítulos 5 e 6*, estão as conclusões e as perspectivas, respectivamente e no *Capítulo 7*, as referências bibliográficas.

Capítulo 1

Introdução Geral

Manipulação Neonatal

Animais quando submetidos a estímulos estressantes apresentam uma rápida ativação de sistemas neuroendócrinos como resposta. Uma das reações que está bem estabelecida é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que tende a minimizar possíveis desvios do equilíbrio homeostático (Charmandari *et al.* 2005, López *et al.* 1999b, Chrousos & Gold 1992). Em ratos, durante as duas primeiras semanas de vida, essa resposta é diminuída. Dessa forma, esse período é denominado “período hiporresponsivo ao estresse” (Levine 2001, 1994, Walker & Vrana 1993, Sapolsky & Meaney 1986, Walker *et al.* 1986).

A manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é essencial para sua normal maturação. Sendo assim, a administração de glicocorticóides durante o período neonatal promove efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação do Sistema Nervoso Central (SNC) (Levine 2001). Altas concentrações de glicocorticóides em neonatos causam diminuição de mitose, mielinização e neuromorfogênese (Bohn 1980), como também alterações neuroendócrinas quando adultos (Erkine *et al.* 1979). Assim, é de grande importância que o animal mantenha o eixo HPA sob certa supressão durante o período neonatal, sendo essa, uma característica padrão durante o período de desenvolvimento dos ratos, nos quais a corticosterona basal apresenta-se elevada durante a fase final da gestação e nos dois primeiros dias após o nascimento, a partir daí cai drasticamente e assim permanece até o 14º dia de vida. Além da corticosterona, o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) apresentam baixas concentrações durante os 14 primeiros dias de vida (Walker *et al.* 1986, Martin *et al.* 1977).

Algumas hipóteses têm sido propostas como causas do período hiporresponsivo ao estresse em ratos. Essas hipóteses incluem um impedimento da síntese, secreção e transporte de CRH (Grino *et al.* 1989) e a incapacidade da maioria dos estressores para superar um mecanismo de retroalimentação negativa aumentada (Schmidt *et al.* 2005, Walker *et al.* 1986). Entretanto, muitos estudos têm demonstrado que o comportamento maternal é crítico para a manutenção do eixo HPA suprimido durante o período hiporresponsivo ao estresse (Levine 2002, 2001, Suchecki *et al.* 1995, 1993).

Conforme Levine (2001) o comportamento maternal é responsável por inibir as respostas endócrinas ao estresse de filhotes após o nascimento. De fato, após vinte e quatro horas de separação maternal, ratos neonatos apresentam concentrações plasmáticas de corticosterona basais elevadas quando comparado a ratos que não foram separados das mães. Além disso, os ratos neonatos que foram separados das mães por vinte e quatro horas apresentam uma resposta aumentada da corticosterona e do ACTH ao estresse (Dent *et al.* 2000, Suchecki *et al.* 1995, 1993, Stanton *et al.* 1988). A expressão do RNA mensageiro para *c-fos* no núcleo paraventricular (PVN) também é aumentada em filhotes que foram separados da mãe (Van Oers *et al.* 1998). Somando-se a esses resultados, Dent *et al.* (2001) demonstraram que o sistema noradrenérgico central, através de neurônios do *locus coeruleus* (LC), também participa na modulação da resposta neuroendócrina ao estresse em ratos privados do contato com a mãe durante o período de desenvolvimento. Sendo assim, a manutenção do período hiporresponsivo ao estresse parece ser dependente de comportamentos maternos que ocorrem durante uma normal interação mãe-filhote.

Durante o período hiporresponsivo ao estresse, tanto estimulações aparentemente inofensivas, como a manipulação neonatal, quanto estímulos estressores, como frio e choque elétrico, induzem a alterações comportamentais e neuroendócrinas

na vida adulta (Levine 2005, 1994, Padoin *et al.* 2001). Em ratos, um procedimento simples, como “manipular” os filhotes por alguns minutos durante as duas primeiras semanas de vida, induz a essas alterações. Assim, a manipulação neonatal dos filhotes tem sido usada como um modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces no ambiente do animal podem afetar o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (Padoin *et al.* 2001, Liu *et al.* 2000a, Meerlo *et al.* 1999, Denenberg 1964, Levine 1962).

Dentre as alterações comportamentais observa-se que ratos manipulados no período neonatal apresentam uma atenuação no medo quando expostos a ambientes novos na vida adulta, ou seja, são mais ativos explorando as áreas centrais do campo aberto (Madruga *et al.* 2006, Fernández-Teruel *et al.* 1991, Levine *et al.* 1967). Padoin *et al.* (2001) sugerem que a manipulação neonatal poderia afetar a interpretação de estímulos ambientais, pois os ratos manipulados que foram avaliados no teste de campo aberto, além de apresentarem um aumento geral da atividade de locomoção na ausência do predador, exploraram ativamente a área quando um gato é colocado no campo aberto. Isso indica que os animais manipulados no período neonatal apresentam uma redução na inibição comportamental.

Conforme Meerlo *et al.* (1999), animais adultos manipulados durante as primeiras semanas de vida apresentam uma forte atenuação da ansiedade induzida pelo estresse quando comparados com o grupo controle. No teste de labirinto em cruz elevado, os animais manipulados permanecem significativamente mais tempo nos braços abertos do que o grupo não-manipulado, o que é um indicativo de menor ansiedade (Severino *et al.* 2004, Pellow *et al.* 1985).

Sabe-se que os ratos manipulados na infância têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides e prolactina (PRL) quando expostos a estímulos estressores, ou seja, ratos manipulados apresentam uma menor secreção de corticosterona e PRL que ratos não-manipulados em situação de estresse. O retorno a concentrações plasmáticas basais desses hormônios ocorre com uma maior rapidez em ratos manipulados comparado aos não-manipulados (Severino *et al.* 2004, Meerlo *et al.* 1999, Levine *et al.* 1993, Meaney *et al.* 1993, Hess *et al.* 1969,). Porém, não há diferença nas concentrações plasmáticas basais de corticosterona e PRL entre animais manipulados e não-manipulados no período pós-natal (Severino *et al.* 2003, Meerlo *et al.* 1999).

Para a secreção de corticosterona em resposta ao estresse, a diferença entre os animais manipulados e não-manipulados deve-se a um aumento da sensibilidade ao mecanismo de retroalimentação negativo da adrenal sobre o eixo HPA. Comparado aos não-manipulados, os animais manipulados apresentam um aumento no número de receptores de glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal, o que não foi observado no hipotálamo, hipófise e nem na amígdala (Levine 1994, Meaney *et al.* 1993, Sapolsky 1994). Portanto, postula-se que esse aumento no número de receptores de glicocorticóides no hipocampo seria a causa das diferenças entre animais manipulados e não-manipulados quando submetidos a estímulos estressantes (Meaney *et al.* 1993, Sapolsky 1994). Sendo que, essa resposta atenuada ao estresse, da corticosterona, pode proteger os animais da perda de células hipocâmpais e também pode impedir alterações cognitivas associadas com a idade (Meaney *et al.* 1988). De fato, os ratos manipulados no período neonatal apresentam um aumento no número de neurônios da região CA1 do hipocampo comparado aos não-manipulados (Winkelmann-Duarte 2004). Além disso, resultados obtidos por Lucion *et al.* (2003) indicam que ratos manipulados no período

neonatal apresentam uma redução significativa no número de neurônios no LC aos 11, 26, 35 e 90 dias de vida quando comparados aos ratos não-manipulados. Assim, estímulos ambientais durante o período neonatal têm efeitos plásticos estáveis que podem estar afetando os comportamentos emocionais e a reatividade ao estresse em animais adultos.

Relação mãe-filhote

Para muitas espécies, a mãe representa fonte de alimentação, calor, proteção e educação, essenciais para o desenvolvimento de habilidades sociais normais (Kuhn & Schanberg 1998). Em algumas espécies, como o furão e o coelho, os filhotes permanecem sozinhos a maior parte do dia; o furão recebe apenas uma, porém longa refeição; o coelho recebe cuidados maternos de 3 a 10 minutos por dia. Outros, como os ratos, requerem alimentação contínua durante os primeiros dias após o nascimento, porém gradualmente os períodos de ausência maternal vão se tornando mais longos até a maturidade. De maneira similar, filhotes de primatas não humanos permanecem grudados a suas mães a maior parte do dia durante os primeiros dias ou meses após o nascimento. Semelhante aos ratos, com o passar do tempo eles vão realizando mais atividades em separado, até se tornarem independentes das suas mães (Denenberg 1999, Kuhn & Schanberg 1998).

Em humanos, falhas no cuidado maternal de crianças no início da vida devido à negligência, abuso físico e/ou psicológico, estão associadas à alteração no padrão de apego mãe-filho, o que pode aumentar a vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta (Kaufman *et al.* 2000, Heim *et al.* 2000, 1997, Field 1998, Carlson & Earls 1997, Kaufman 1991). Assim, cada vez mais, estudos têm focalizado seus objetivos na

explicação dos efeitos de influências ambientais no início da vida sobre a fisiologia e o comportamento do animal na fase adulta.

Dentre os comportamentos realizados pela mãe, em ratos, estão: construção do ninho antes do parto; limpeza do filhote após o parto; carregar o filhote na boca até o ninho; lambe o filhote, especialmente na região ano-genital; e se posiciona sobre os filhotes de forma a facilitar a amamentação. Por outro lado, os filhotes realizam comportamentos que são mais estereotipados que os comportamentos maternos, entre eles estão: resposta de orientação em direção à mãe; localizar e sugar o mamilo da mãe para alimentação; emitir sinais sonoros e odoríferos para induzir respostas maternas (Fleming *et al.* 1999).

Em ratos, alterações ou interferências sobre a relação mãe-filhote no período neonatal, como a manipulação neonatal, podem provocar um distúrbio nesta relação, modificando assim o comportamento da mãe em relação a sua prole. Em geral, as mães de filhotes manipulados permanecem mais tempo cuidando da sua prole, sendo que, um dos comportamentos que se alteram é o de lambe os filhotes; as mães de filhotes manipulados lambem mais a prole do que as mães de filhotes não-manipulados (Liu *et al.* 1997). Sabe-se que esse comportamento da mãe em relação ao filhote pode alterar o desenvolvimento do SNC (Levine 2001, Liu *et al.* 2000b, 1997, Francis *et al.* 1994, Levine *et al.* 1994, Meaney *et al.* 1993). Portanto, postula-se que seria a alteração nesta relação mãe-filhote a responsável pelo padrão comportamental e neuroendócrino observado em ratos manipulados no período pós-natal.

Há dados mostrando que, no rato, ocorrem variações naturais no cuidado maternal que alteram permanentemente o comportamento e a regulação neuroquímica dos filhotes (Champagne *et al.* 2003, Bredy *et al.* 2003, Francis *et al.* 2002). Liu *et al.* (1997) mostraram que os filhotes de mães que permanecem mais tempo com os

mesmos, lambendo-os mais, quando adultos apresentam um aumento da concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma menor secreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse. Esses dados são similares aos dos animais que foram manipulados no período neonatal (Levine 1994, Meaney *et al.* 1993, Sapolsky 1994). Outra característica que é similar entre os filhotes que foram manipulados e os que naturalmente receberam maior cuidado maternal é o seu comportamento no campo aberto quando adulto, os dois apresentam um aumento geral da atividade exploratória (Champagne *et al.* 2003, Padoin *et al.* 2001). Animais cujas mães que tem um alto cuidado com a sua prole apresentam um aumento na taxa de sinaptogênese ou aumento na sobrevivência das sinapses no hipocampo comparado a animais cujas mães têm um baixo cuidado com a sua prole (Liu *et al.* 2000b). Sendo assim, a variação no cuidado maternal pode ser considerada o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes.

Objetivo Geral:

Analisar o papel da manipulação neonatal no estabelecimento das relações sociais tanto no início da vida, como o reconhecimento da mãe pelo filhote, como na vida adulta, no reconhecimento do parceiro sexual. Além disso, avaliar o efeito da manipulação neonatal na regulação da secreção de GnRH em ratas.

Capítulo 2

*Efeito da Manipulação Neonatal Sobre o
Aprendizado Olfatório*

INTRODUÇÃO

Sistema Olfatório

A identificação do mundo externo se dá através das entradas sensoriais. O sistema olfatório de mamíferos tem a capacidade de discriminar milhares de estímulos químicos diferentes, e a partir destes gerar respostas adequadas. Os estímulos se dividem em dois grupos: substâncias químicas não-voláteis presentes nos líquidos, os ferormônios, e uma grande variedade de substâncias químicas voláteis presentes no ar. Esses estímulos são percebidos por dois sistemas olfatórios diferentes, o acessório e o principal (Sánchez-Andrade *et al.* 2005, Keverne 2004, Holy 2003, Shipley *et al.* 1995).

As diferenças anatômicas entre os dois sistemas olfatórios se refletem na natureza das diferentes informações que os dois sistemas processam. O sistema olfatório principal tem um papel complexo na discriminação de uma grande variedade de odores presente no ambiente e é capaz de associar esses odores com uma resposta comportamental adequada. Por outro lado, o sistema olfatório acessório desempenha uma tarefa mais simples, pois ele reconhece uma variedade limitada de moléculas de ferormônios, transmite essas informações para centros superiores para iniciar respostas endócrinas ou comportamentais estereotipadas (Brennan & Keverne 1997). No entanto, para Keverne (2004) não existe uma clara distinção entre as funções do sistema olfatório principal e do sistema olfatório acessório como descrita na literatura.

No sistema olfatório principal, os odores são detectados pelos receptores olfatórios, que se localizam no epitélio olfatório da cavidade nasal. As informações captadas pelos receptores olfatórios são enviadas para o bulbo olfatório principal (BOP),

e a partir daí são enviadas para o córtex órbitofrontal e insular, sistema límbico e tálamo (Sánchez-Andrade *et al.* 2005, Brennan & Keverne 1997). As informações que são enviadas para áreas corticais como os córtices órbitofrontal e insular vão gerar respostas que estão envolvidas em percepção e atenção, enquanto que as informações que chegam a áreas do sistema límbico como amígdala e hipotálamo estão envolvidas em respostas emocionais e motivacionais (Sánchez-Andrade *et al.* 2005).

O órgão sensorial do sistema olfatório acessório é o órgão vomeronasal, localizado na base do septo nasal. O órgão vomeronasal se conecta com o bulbo olfatório acessório (BOA), que está localizado na parte dorsocaudal do BOP, através do nervo vomeronasal. O BOA envia projeções, via amígdala e núcleo da base da estria terminal (BNST), para o hipotálamo, que vai mediar as respostas comportamentais e hormonais aos estímulos olfatórios específicos (Stockhorst & Pietrowsky 2004, Brennan & Keverne 1997). O órgão vomeronasal é estimulado por ferormônios, que são substâncias químicas produzidas por um membro de uma espécie que irão gerar respostas em outros membros da mesma espécie, respostas essas que podem ser endócrinas ou comportamentais (Stockhorst & Pietrowsky 2004, Holy 2003, Whitten & Champlin 1959). Em mamíferos, os ferormônios estão presentes em secreções de várias origens como: pele, esperma, urina e secreções vaginais (Monti-Bloch *et al.* 1994).

Aprendizado Olfatório

Uma capacidade crítica para o filhote no período próximo ao nascimento é a identificação da mãe. Essa capacidade de identificação da mãe é vital para a sobrevivência e para um desenvolvimento normal do filhote, pois durante esse período ele depende inteiramente da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e

alimentação. O olfato é fundamental na mediação dessa atração mãe-filhote, pois a identificação da mãe ocorre pelo aprendizado olfatório (Leon 1998, Sullivan *et al.* 1989).

Tanto em humanos como em ratos, esse aprendizado olfatório se dá pelo paradigma clássico de condicionamento, onde se faz o pareamento do cuidado maternal (estímulo incondicionado) com o cheiro da mãe (estímulo condicionado) (Sullivan 2003, Leon 1998). Em ratos esse cuidado maternal pode ser substituído pela estimulação tátil, que é realizado com o auxílio de um pincel, que visa mimetizar o comportamento de lambar da mãe (Sullivan *et al.* 1991, 1989), o qual é fundamental para o desenvolvimento do SNC (Levine 2001, 1994, Francis *et al.* 1994, Meaney *et al.* 1993). Assim, quando essa estimulação tátil com pincel é pareada com um novo odor, o filhote aprende a ter preferência por esse cheiro (Sullivan *et al.* 1991, 1989).

Aprendizado Olfatório e Via Noradrenalina/CREB

A estimulação tátil com pincel em filhotes promove um aumento da atividade elétrica do LC (Nakamura *et al.* 1987), núcleo esse que é o principal grupo de neurônios noradrenérgicos do SNC. A noradrenalina (NA) do LC tem um papel fundamental no desenvolvimento e modificação do sistema sensorial de mamíferos (Kasamatsu *et al.* 1979, Sullivan & Wilson 1994). Como mostra a figura 1, uma das áreas que recebe densa projeção noradrenérgica do LC é o bulbo olfatório (BO), área essa que apresenta receptores β -adrenérgicos que já estão funcionais durante as primeiras semanas de vida dos ratos (Woo & Leon 1995a, McLean & Shipley 1991, Wilson & Leon 1988). A NA liberada pelo LC age no BO via receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos e quando na presença

de um novo odor produz uma preferência por esse odor (Harley *et al.* 2006, Yuan *et al.* 2000, Langdon *et al.* 1997, Sullivan & Wilson 1994, Sullivan *et al.* 1991, 1989).

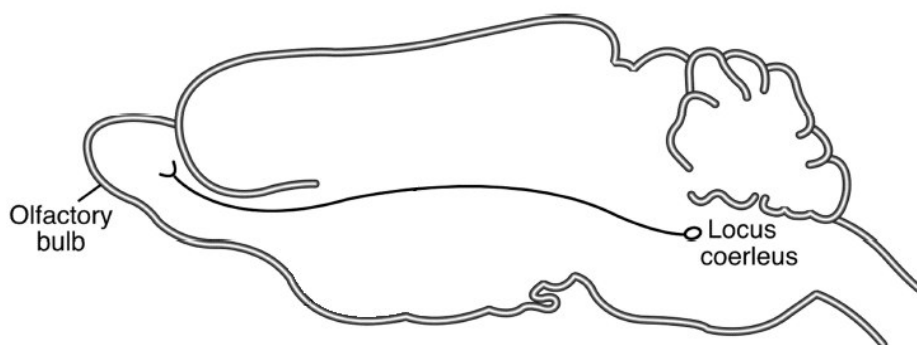


Figura 1. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO. Para o filhote aprender a ter preferência por um odor é necessário o pareamento deste odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003).

Rangel e Leon (1995) demonstraram que a estimulação tátil com pincel é capaz de promover um aumento no conteúdo de NA no BO. De fato, a estimulação do LC com acetilcolina pareado com a apresentação de um novo odor, induz a preferência por esse odor no filhote (Sullivan *et al.* 2000). No entanto, lesão bilateral do LC em filhotes, com 6-OHDA, reduz o conteúdo de NA no BO impedindo a formação do aprendizado olfatório nesses animais (Sullivan *et al.* 1994). Portanto, logo após o nascimento, quando a mãe lambe o filhote (estimulação tátil) ela promove liberação de NA pelo LC que age no BO e promove o aprendizado olfatório, fazendo com que o filhote tenha preferência pelo cheiro da mãe.

A liberação de NA pelo LC induzida pela estimulação tátil, necessária para o aprendizado olfatório, pode ser substituída pela microinjeção de isoproterenol (agonista β -adrenérgico) diretamente no BO (Sullivan *et al.* 2000) ou periféricamente (Harley *et al.* 2006, McLean *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 1991, 1989). A ação do isoproterenol no

aprendizado olfatório exibe uma curva em U invertida, em que injeções periféricas com doses baixas (1 mg/kg) ou altas (4 mg/kg) não são efetivas na indução do aprendizado, o que ocorre com uma dose moderada (2 mg/kg), que é uma concentração ótima para o aprendizado olfatório (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989).

A ligação da NA aos receptores β -adrenérgicos do BO (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989) promove um aumento da concentração de AMPc que é um segundo mensageiro intracelular, que por sua vez, ativa uma proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA atua fosforilando inúmeros substratos intracelulares, entre eles o fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc), cuja fosforilação ocorre na serina 133, passo fundamental para a ativação desse fator de transcrição (Lamprecht 1999, Silva *et al.* 1998, Hunter 1995).

O CREB pertence a uma família de fatores de transcrição denominada CREB/ATF, da qual fazem parte, no mínimo, dez produtos gênicos distintos. O CREB participa de eventos de sinalização intracelular que regulam uma grande variedade de funções biológicas, incluindo a proliferação celular na hipófise (Struthers *et al.* 1991), diferenciação sexual do SNC (Auger *et al.* 2001), espermatogênese (Don & Stelzer 2002, Scobey *et al.* 2001) e formação de memória (Cammarota *et al.* 2000, Silva *et al.* 1998). A ativação transcricional mediada por CREB depende da presença de uma proteína nuclear denominada CBP (proteína ligante ao CREB), a qual se liga especificamente à forma fosforilada do CREB. Após, o complexo CREB/CBP liga-se a regiões específicas do DNA, pois as proteínas pertencentes à família de fatores de transcrição CREB/ATF apresentam, em sua estrutura, domínios para a ativação da transcrição e regiões que permitem a dimerização e a ligação ao DNA, os quais são responsáveis pela ligação à sequência CRE (elemento responsivo ao AMPc), permitindo

o início da transcrição de genes que apresentam uma seqüência que responde ao estímulo por AMPc nos seus promotores (Lamprecht 1999, Silva *et al.* 1998).

Utilizando o pareamento de um novo odor com a estimulação tátil com pincel, McLean *et al.* (1999) demonstraram que, 10 minutos após o pareamento dos dois estímulos, ocorre um grande aumento na fosforilação do CREB no BO do filhote, mais especificamente nas células mitraais, mostrando assim que a fosforilação do CREB é um passo fundamental para a formação do aprendizado olfatório. Da mesma maneira que existe uma concentração ótima para a ação da NA no BO induzindo o aprendizado olfatório (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989), a fosforilação do CREB também ocorre apenas em um nível ótimo de estimulação, pois doses baixas (1 mg/kg) ou altas (6 mg/kg) de isoproterenol não são efetivas para aumentar a fosforilação de CREB. Por sua vez, uma dose moderada (2 mg/kg) promove um grande aumento na fosforilação do CREB no BO (McLean *et al.* 2005, Yuan *et al.* 2000).

A participação do CREB na indução do aprendizado olfatório foi comprovada por meio de experimentos que utilizam vetores com um gene modificado do CREB. Quando se injeta um vetor com CREB normal, induz-se uma expressão adicional do CREB no BO do filhote, com isso a dose de isoproterenol que era considerada baixa (1 mg/kg) passa a ser capaz de induzir o aprendizado olfatório, enquanto que a dose que era considerada moderada (2 mg/kg) passa ser uma dose alta, o que impede a formação do aprendizado olfatório. No entanto, quando se injeta um vetor com CREB mutante na serina 133, o que impede a sua fosforilação, é necessário uma dose de isoproterenol que antes era considerada alta (4 mg/kg) para a indução do aprendizado olfatório (Yuan *et al.* 2003).

Portanto, para que o estabelecimento da relação mãe-filhote ocorra, é necessário que o filhote reconheça a sua mãe e crie uma preferência pelo seu cheiro, sendo que

essa capacidade se dá pelo aprendizado olfatório (Sullivan 2003, Leon 1998). Esse aprendizado ocorre mediante o pareamento do odor da mãe com uma estimulação tátil realizada por ela, como o comportamento de lambar. Essa estimulação tátil induz à liberação de NA, proveniente do LC no BO, a qual se liga aos receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos aumentando os níveis de AMPc. O aumento dos níveis de AMPc leva a fosforilação do CREB, que é o evento culminante para a indução da formação de uma memória de longo prazo (McLean & Harley 2004).

Aprendizado Olfatório e Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso que é produzido pela oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO em quantidades iguais. Essa reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS é uma enzima que apresenta três isoformas distintas, sendo duas constitutivas, a neuronal (n-NOS) e a endotelial (e-NOS) e uma induzida (i-NOS) encontrada em macrófagos. Apenas as isoformas constitutivas são dependentes de cálcio (Förstermann *et al.* 1994). Em ratos, a enzima NOS está presente desde a primeira semana após o nascimento em muitas áreas do SNC, incluindo o sistema olfatório (Samama & Boehm 1996, Takemura *et al.* 1996, Samama *et al.* 1995, Yan *et al.* 1994).

Já está bem estabelecido o papel do NO em diversos mecanismos de aprendizado e memória, como: memória espacial (Noda *et al.* 1997, Baratti & Kopf 1996), memória olfatória em reconhecimento social (Böhme *et al.* 1993) e esquia passiva (Fin *et al.* 1995). Em camundongos, o NO no BOA participa da formação da memória do ferormônio do macho com o qual a fêmea acabou de realizar comportamento sexual (Okere & Kaba 2000, Brennan & Keverne 1997, Okare *et al.*

1996). Samama & Boehm (1999) demonstraram que o NO também participa da formação do aprendizado olfatório em filhotes de ratos, pois a inibição da NOS quando um novo odor é pareado com estimulação tátil realizada com o auxílio de um pincel impede a formação do aprendizado olfatório desse novo odor. No entanto, os autores desconhecem o mecanismo pelo qual essa inibição impede a formação do aprendizado olfatório.

JUSTIFICATIVA

O reconhecimento do odor materno é fundamental para a sobrevivência de filhotes altriciais como os ratos, pois eles dependem da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e alimentação. Essa identificação da mãe ocorre devido ao aprendizado olfatório, que se dá pelo pareamento do cuidado materno (estímulo tátil) com o cheiro da mãe (Leon 1992). O estímulo tátil, aplicado pela mãe, atua sobre o LC promovendo uma liberação de NA no BO, essa NA se liga aos receptores α e β -adrenérgicos, o que vai resultar na fosforilação do CREB, fundamental para a formação da memória olfatória (McLean & Harley 2004). A manipulação neonatal por si só já é um estímulo tátil, induz um aumento do comportamento materno, em especial do comportamento de lambar o filhote (Liu *et al.* 1997). Além disso, o NO também participa da formação do aprendizado olfatório, pois a inibição da NOS é capaz de impedir a formação do aprendizado olfatório (Samama & Boehm 1999).

Objetivos:

Verificar se o aumento da estimulação tátil que o filhote manipulado recebe é capaz de interferir com o aprendizado olfatório, levando a um não reconhecimento do odor materno.

Avaliar a participação da via NA/CREB no aprendizado olfatório das ratas manipuladas no período neonatal.

Analisar o efeito da manipulação neonatal sobre a produção de NO no BO das ratas filhotes.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Essas ratas tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes. Os animais que foram utilizados quando adultos, aos 21 dias de vida foram desmamados e mantidos em caixas com no máximo 5 ratos até a idade adulta. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 18 horas e com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida constante em torno de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Manipulação Neonatal

A manipulação neonatal consistiu 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 gentilmente por 1 minuto, utilizando-se luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho. Após essa manipulação todos os filhotes foram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe, conforme figura 2.

Grupo não-manipulado (controle): animais que não sofreram qualquer tipo de manipulação, tanto do experimentador quanto dos bioteristas, até o 10º dia após o nascimento.

Grupo manipulação única: animais que foram manipulados durante 1 minuto, apenas no 7º dia após o nascimento.

Grupo manipulação repetida: animais que foram manipulados durante 1 minuto por dia, durante os 10 primeiros dias após o nascimento. Os procedimentos de manipulação iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes (Dia 1).



Figura 2. Foto ilustrativa do protocolo de manipulação neonatal.

Protocolo Experimental

Experimento I – Preferência pelo odor maternal em filhotes manipulados no período neonatal.

Ratos, machos e fêmeas, dos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulação repetida foram submetidos ao teste de preferência pelo odor maternal. Os animais do grupo não-manipulado foram testados apenas no 7º dia de vida. Os animais dos grupos manipulação única e manipulação repetida foram testados no 7º dia de vida, 15 minutos após a manipulação e no 8º dia de vida, 24 horas após a manipulação.

O teste de preferência pelo odor maternal permite ao filhote testado escolher entre duas áreas com maravalhas com odores diferentes. Em um primeiro teste, a escolha foi entre: maravalha limpa (odor neutro) e maravalha proveniente do ninho da sua caixa moradia (odor familiar). Esse experimento teve como objetivo avaliar se os filhotes testados apresentam preferência pelo odor da mãe que está impregnado na maravalha do ninho da caixa moradia. Em um segundo teste, com outros animais, a escolha foi entre: maravalha limpa e maravalha proveniente do ninho da caixa moradia do outro grupo experimental. Por exemplo: para um filhote do grupo manipulação repetida a escolha foi entre maravalha limpa e maravalha proveniente do ninho de uma caixa moradia de filhotes não-manipulados. Esse experimento teve como objetivo avaliar se os filhotes testados apresentam preferência pelo odor de mãe, independente se é a sua mãe, e assim descartar qualquer possibilidade de que a preferência ou não pela maravalha do ninho da caixa moradia seja devido a alguma alteração no cheiro da maravalha da caixa moradia.

Experimento II – Participação da via noradrenalina/CREB no aprendizado olfatório em filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.

Ratas dos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulação repetida foram decapitadas no 7º dia após o nascimento. As ratas do grupo não-manipulado foram decapitadas o mais breve possível após ser retirada do ninho. Os filhotes do grupo manipulação única foram manipulados por 1 minuto apenas no 7º dia e após foram devolvidos ao ninho e a mãe, 15 minutos após as ratas foram decapitadas o mais breve possível. Os filhotes do grupo manipulação repetida foram manipulados todos os dias, do 1º ao 7º dia. No 7º dia pós-natal, após a manipulação, os filhotes foram devolvidos ao ninho e a mãe, e 15 minutos após as ratas foram decapitadas o mais breve possível. Após a decapitação, o BO foi retirado e congelado no isopentano em gelo seco e armazenado em -70°C para posteriormente serem utilizados para quantificação de NA e MHPG por HPLC-ED e CREB e pCREB por *western blot*.

Experimento III – Produção de óxido nítrico no bulbo olfatório de filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.

Ratas dos grupos não-manipulado e manipulação repetida foram decapitadas no 7º dia após o nascimento. As ratas do grupo não-manipulado foram decapitadas o mais breve possível após serem retiradas do ninho. Os filhotes do grupo manipulação repetida foram manipulados todos os dias, do 1º ao 7º dia. No 7º dia pós-natal, após a manipulação os filhotes foram devolvidos ao ninho e a mãe e 15 minutos após as ratas foram decapitadas o mais breve possível. Após a decapitação, o BO foi retirado e congelado no isopentano em gelo seco e armazenado em -70°C para posteriormente serem utilizados para quantificação de nitritos e nitratos com a utilização da reação de Griess.

Procedimentos Utilizados

Teste de Preferência pelo Odor Maternal

O teste de preferência pelo odor maternal foi realizado em uma caixa de acrílico de 34 cm de largura x 40 cm de comprimento x 24 cm de altura (Figura 3B). Essa caixa foi dividida em duas áreas de 19 cm por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, 300 mL de maravalha limpa ou maravalha do ninho da caixa residência foi colocado no canto de cada área e o filhote foi colocado na linha que determina a zona neutra, encostado na parede oposta com a região da cabeça voltada para as áreas com maravalha, conforme mostra a figura 3C. O comportamento de cada filhote foi filmado por 1 minuto, ao fim dessa filmagem a caixa foi limpa com álcool 70% e as maravalhas foram trocadas de lado, ou seja, onde estava a maravalha limpa foi colocado a maravalha do ninho da caixa residência e onde estava a maravalha do ninho da caixa residência foi colocado maravalha limpa. Após, o mesmo filhote foi testado novamente. Esse procedimento de troca das maravalhas e novo teste ocorreram cinco vezes com um intervalo de 2 minutos entre os testes, conforme mostra o esquema da figura 3A. Os vídeos foram analisados com o auxílio do programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou o tempo total que o filhote permaneceu sobre cada área. Os resultados foram expressos pela soma dos tempos sobre as áreas nos 5 testes para cada filhote.

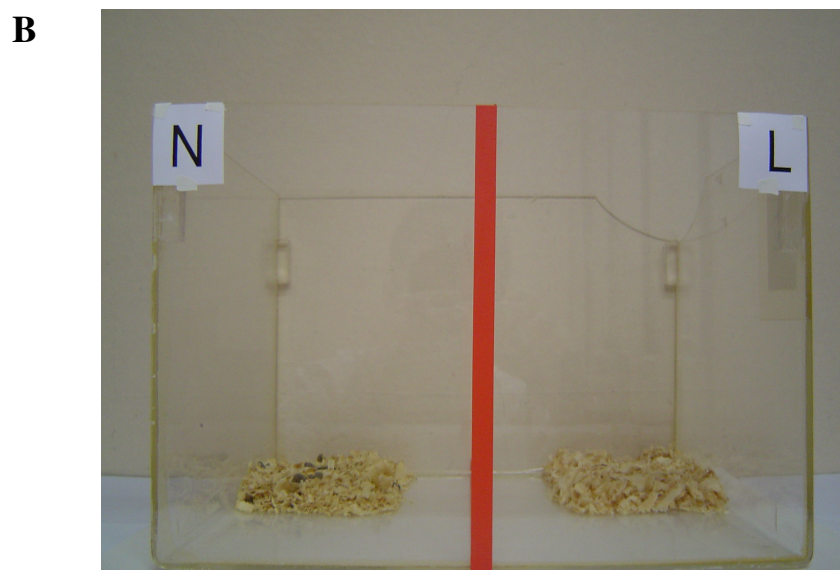
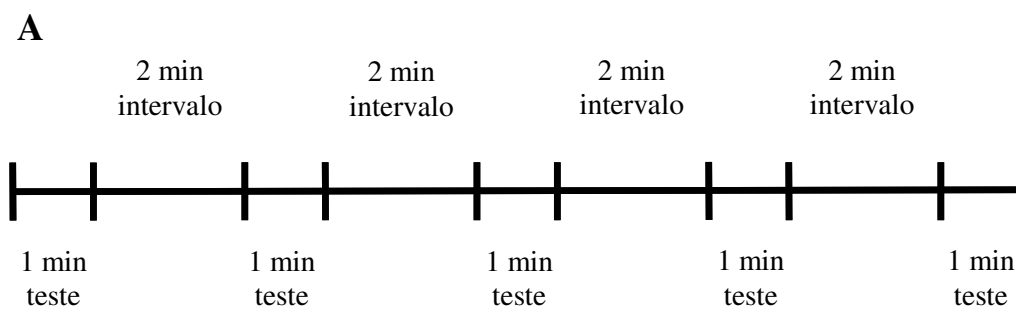


Figura 3. A figura **A** mostra a descrição visual do esquema utilizado para o teste de preferência olfatória. A figura **B** mostra a caixa utilizada para o teste de preferência olfatória, onde se vê as duas áreas contendo as maravalhas e a linha neutra (em vermelho) que divide as duas áreas. A figura **C** mostra o posicionamento do filhote no início de cada teste.

Western Blots

Os bulbos olfatórios congelados foram homogeneizados em 500 μ L de tampão de homogeneização (Tris-HCl 20mM, pH 7,4 contendo ortovanadato de sódio 1mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, fluoreto de sódio 50mM e fenilmetilsulfonil fluoreto 1mM). Desse homogeneizado determinou-se o conteúdo de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). Posteriormente, quantidades iguais de proteína (30 μ g para cada amostra) foram carregadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação de acordo com a sua mobilidade. Após, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, EUA). A efetividade da separação das proteínas no gel e a sua transferência para a membrana foram verificadas pela coloração da membrana com *Ponceou S*. A seguir, a membrana foi colocada em tampão salina Tween-Tris (TTBS; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo 0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de Tween 20) contendo albumina 5% por 2 horas a temperatura ambiente para bloquear os sítios inespecíficos. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos a membrana foi incubada *overnight*, a 4°C, com anticorpos primários que reconhecem os seguintes antígenos: pCREB na Ser-133 (pCREB; 1:1000, *Upstate Biotechnology*, EUA) ou CREB (1:4000, *Santa Cruz Biotechnology*, EUA). Posteriormente, a membrana foi lavada em TTBS e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho IgG, na concentração de 1:20000 diluído em TTBS. A membrana foi lavada novamente com TTBS e após a imunoratividade foi detectada pela alteração de quimioluminescência (ECL *Western blotting analysis system*, Amersham). A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o auxílio do programa *MCID Image Analysis System* (versão 5.02, *Imaging Research*, Canadá).

Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED)

HPLC-ED foi utilizado para determinar as concentrações de NA e seu metabólito 3-metoxi-4-hidroxifeniletlenoglicol (MHPG) em amostras do BO. Utilizando-se um sonicador, as amostras do BO foram homogeneizadas em 400 µL de solução de ácido perclórico 0,2 M e EDTA 0,1 mM, contendo 150 nM de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA, Aldrich; padrão interno). O homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 12000 g. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millex PVDF, Millipore). No precipitado remanescente foi determinado o conteúdo de proteína pelo método de Bradford (1976). No rato, o MHPG é conjugado a MHPG-sulfato por ação de fenolsulfatotransferases (Flods e Meek, 1974). O MHPG-sulfato não é eletroquimicamente ativo, portanto, os sobrenadantes foram hidrolisados a 95°C por 5 minutos para a obtenção de MHPG livre, como previamente descrito (Lookingland *et al.*, 1991). Posteriormente, 30 µL de cada amostra foram injetados no HPLC por um injetor automático (SIL-10Advp; Shimadzu, Japão). A separação foi realizada em coluna de fase reversa C 18 (Shim-pack VP-ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm; Shimadzu, Japão) precedida de pré-coluna C18 (Shim-pack VP-ODS, 5 µm, 10 x 4,6 mm; Shimadzu, Japão) a temperatura ambiente. A fase móvel, preparada em água Milli-Q (Millipore), era constituída de NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,28 mM, metanol 20 % e pH de 3,5, ajustado com H₃PO₄. O fluxo da bomba do HPLC (LC-10ADvp; Shimadzu, Japão) foi de 0,8 mL/min e o potencial do detector eletroquímico, 0,65 V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 *electrochemical flow cell*; Antec Leyden, Holanda). Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o programa Class-VP (Shimadzu, Japão). NA e MHPG foram identificados de acordo com os respectivos tempos de eluição de seus picos e a

quantificação foi feita pelo método de padrão interno (DHBA), utilizando-se a área dos picos como referência.

Determinação de Nitritos e Nitratos

Para dosagem de nitritos e nitratos (NO_x) no BO das ratas foi feito um homogeneizado do BO em tampão fosfato-salina (pH 7,4). A concentração de NO_x no homogeneizado foi medida pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger *et al.* (1999). Aliquotas de 50 µL das amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos (10 µL de NADPH 0,02 mM, 7 µL de Tris 1M pH 7,5, 23 µL de uma mistura de Glicose 6-fosfato 5 mM/Glicose 6-fosfato desidrogenase 10U/mL) e 10 µL de nitrato redutase 1 U/mL por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação, para conversão de nitrato em nitrito. Após, foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftiletilendiamina, 2,3mL de ácido ortofosfórico 85% e 97,7mL de água destilada) e a reação foi incubada novamente a temperatura ambiente sob agitação por mais 10 minutos. Posteriormente a absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm no ELISA. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrito de sódio 1 mM.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (EPM), e o nível crítico fixado foi de 5% ($p \leq 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

No teste de preferência pelo odor maternal as comparações entre o tempo sobre as áreas com maravalha limpa e maravalha do ninho da caixa moradia, e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA)

de duas vias de medidas repetidas, seguida de *Newman-Keuls*. Porém, quando foi testada a preferência entre a maravalha limpa e a maravalha do ninho da caixa moradia do outro grupo experimental foi utilizado o teste *t* de *Student*.

A comparação entre os grupos para os conteúdos de NA, MHPG, CREB e CREBp e a razão MHPG/NA no BO de filhotes foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de *Newman-Keuls*.

A comparação entre os grupos para o conteúdo de NOx no BO de filhotes foi realizada utilizando o teste *t* de *Student*.

RESULTADOS

Experimento I – Preferência pelo odor maternal em filhotes manipulados no período neonatal.

A figura 4 mostra o primeiro teste de preferência pelo odor maternal de filhotes, machos e fêmeas, onde a escolha do filhote foi entre a área com maravalha limpa (odor neutro) e a área com maravalha proveniente do ninho da sua caixa moradia (odor familiar). Nesse teste foram utilizados 5 grupos experimentais: não-manipulado, manipulação única 7º dia, manipulação única 8º dia, manipulação repetida 7º dia e manipulação repetida 8º dia.

Em fêmeas (figura 4A), foi observado efeito significativo para *grupo* [$F_{(4,66)}=6,03$; $p<0,0001$], e para *área* [$F_{(1,66)}=51,97$; $p<0,0001$], como também foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(4,66)}=6,08$; $p<0,0001$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que as fêmeas do grupo não-manipulado (controle) permanecem significativamente mais tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia quando comparado à área com maravalha limpa. No entanto, as fêmeas que foram manipuladas 1 minuto por dia durante os 7 primeiros dias após o nascimento e foram testadas no 7º dia, 15 minutos após a manipulação (manipulação repetida 7º dia) ou foram testadas no 8º dia, 24 horas após a manipulação (manipulação repetida 8º dia) não mostraram preferência pelo odor maternal, permanecendo o mesmo tempo sobre a área com maravalha limpa e maravalha do ninho da caixa moradia. Porém, as fêmeas que foram manipuladas apenas no 7º dia pós-natal e foram testadas 15 minutos após a manipulação (manipulação única 7º dia) ou foram testadas no 8º dia, 24 horas após a manipulação (manipulação única 8º dia) permanecem significativamente

mais tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia quando comparado à área com maravalha limpa, semelhante as fêmeas não-manipuladas.

Em machos (figura 4B), não foi observado efeito significativo para *grupo* [$F_{(4,76)}=2,06$; $p=0,10$], entretanto, foi detectado efeito significativo para *área* [$F_{(1,76)}=189,76$; $p<0,0001$]. No entanto, não foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(4,76)}=1,89$; $p=0,12$]. O teste de *Newman-Keuls* para *área* mostrou que os machos de todos os grupos experimentais testados permanecem significativamente mais tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia quando comparado à área com maravalha limpa.

A figura 5 mostra o segundo teste de preferência pelo odor maternal. A escolha nesse segundo teste foi entre: área com maravalha limpa e área com maravalha proveniente do ninho da caixa moradia do outro grupo experimental. Nesse teste foram utilizados apenas os grupos: não-manipulado e manipulação repetida 7º dia.

As fêmeas (figura 5A) não-manipuladas permanecem significativamente mais tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia do grupo manipulação repetida 7º dia quando comparado à área com maravalha limpa [$t_{(14)}=4,05$; $p<0,002$]. No entanto, as fêmeas do grupo manipulação repetida 7º dia permanecem o mesmo tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia do grupo não-manipulado e sobre a área com maravalha limpa [$t_{(14)}=0,78$; $p=0,44$]. Da mesma forma que as fêmeas, os machos (figura 5B) não-manipulados permanecem significativamente mais tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia do grupo manipulação repetida 7º dia quando comparado à área com maravalha limpa [$t_{(14)}=2,06$; $p=0,05$]. No entanto, os machos do grupo manipulação repetida 7º dia permanecem o mesmo tempo sobre a área com maravalha do ninho da caixa moradia do grupo não-manipulado e sobre a área com maravalha limpa [$t_{(14)}=1,22$; $p=0,24$].

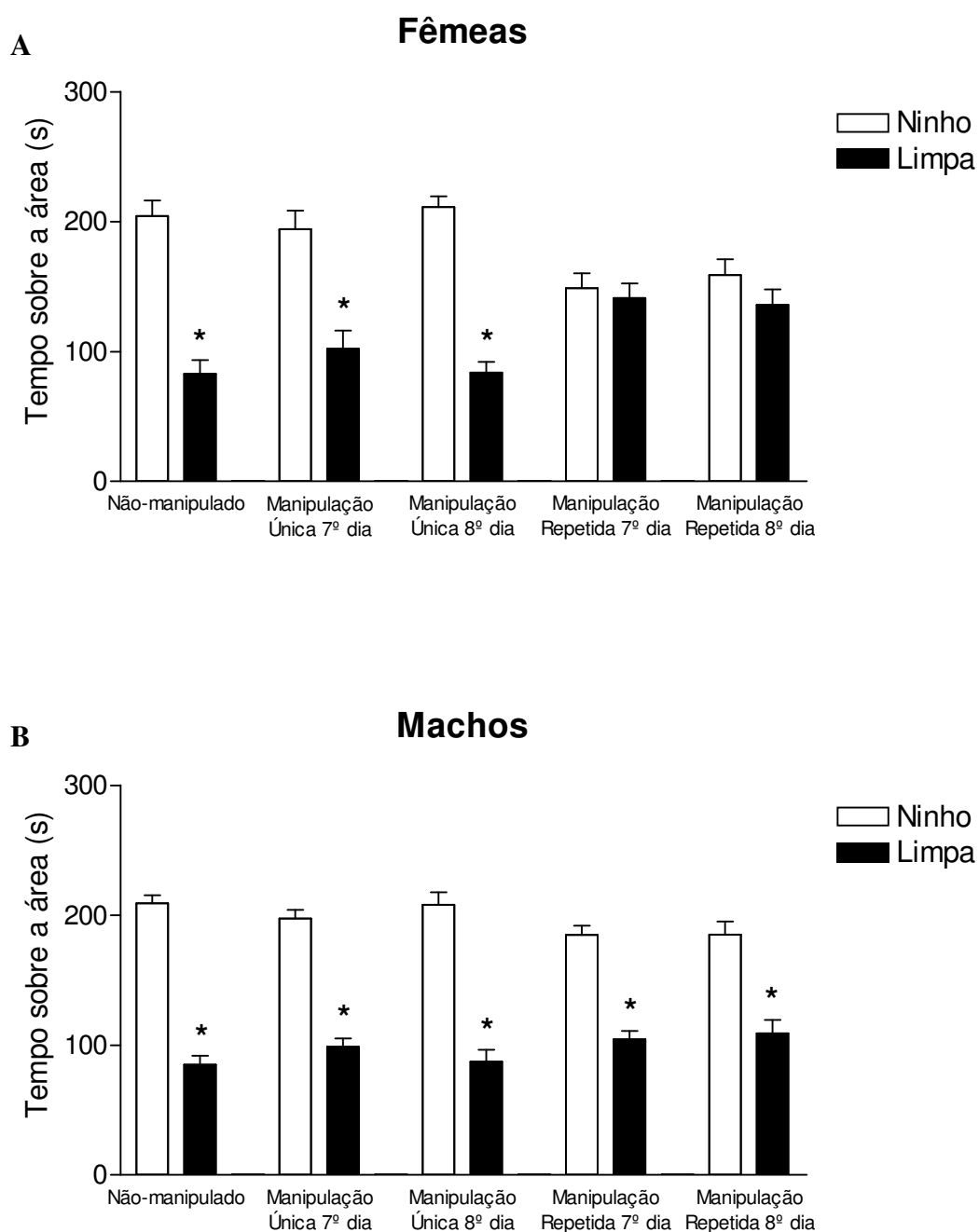


Figura 4. Preferência pelo odor maternal em ratos, fêmeas (A) e machos (B). Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de duas vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado área com maravalha do ninho e área com maravalha limpa dentro do mesmo grupo. Para fêmeas $n = 12 - 15$, e para machos $n = 14 - 17$.

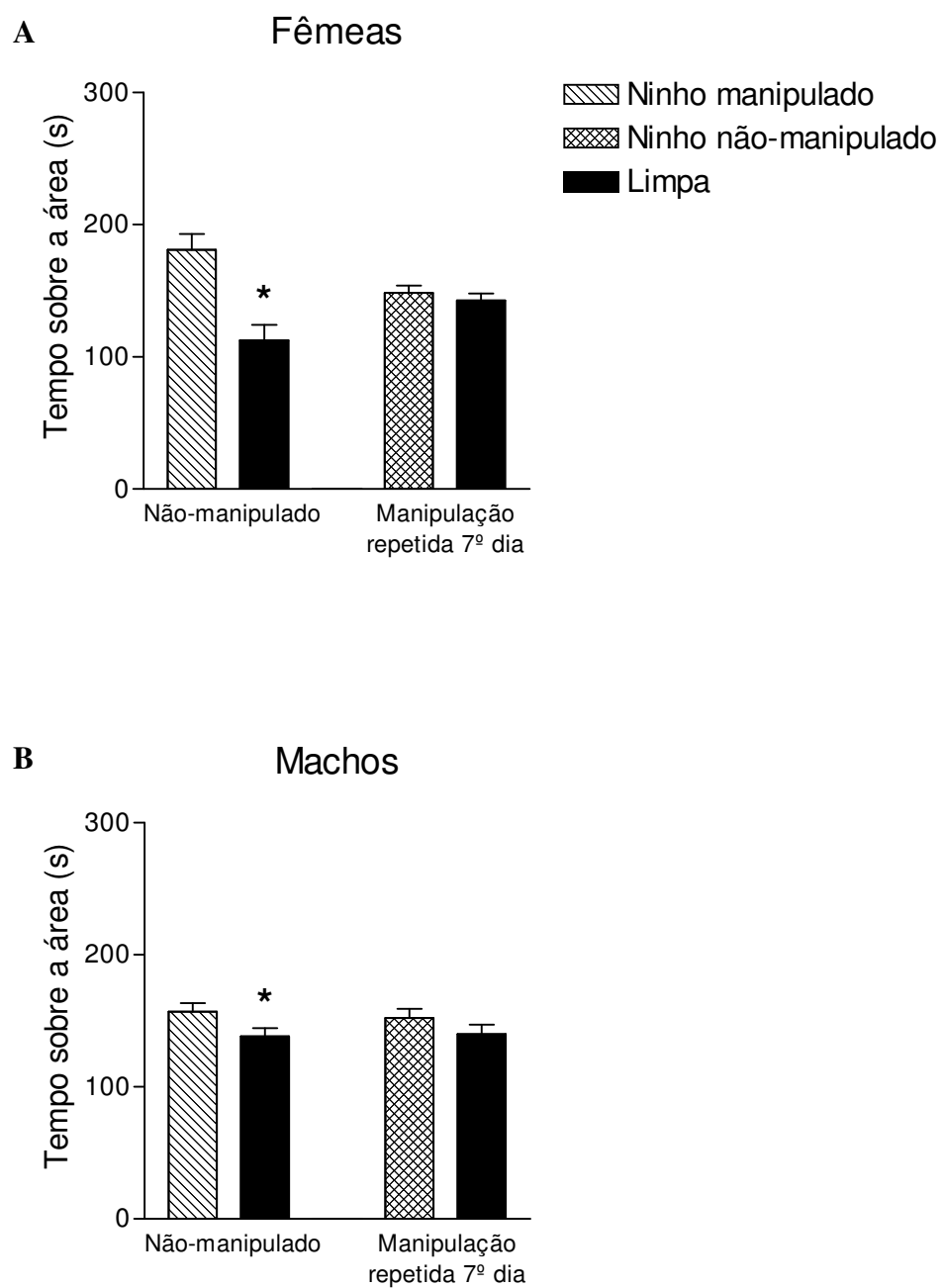


Figura 5. Preferência pelo odor da maravalha da caixa moradia do outro grupo experimental, em fêmeas (**A**) e machos (**B**). Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de Student. Para fêmeas * $p < 0,002$ e para machos * $p = 0,05$ quando comparado com a área com maravalha do ninho manipulado. O $n = 8$ para todos os grupos de fêmeas e machos.

Experimento II – Participação da via Noradrenalina/CREB no aprendizado olfatório em filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.

A figura 6 mostra o conteúdo de NA, MHPG no BO e a taxa de MHPG/NA de filhotes dos grupos não-manipulado, manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia.

Para o conteúdo de NA no BO (figura 6A), foi observado efeito significativo entre os *grupos* [$F_{(2,17)}=4,13$; $p<0,04$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que os filhotes do grupo manipulação repetida 7º dia apresentaram uma redução no conteúdo de NA no BO quando comparado aos grupos não-manipulados e manipulação única 7º dia. No entanto, não houve diferença significativa no conteúdo de NA no BO entre os grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia.

Para o conteúdo de MHPG no BO (figura 6B), foi observado efeito significativo entre os *grupos* [$F_{(2,17)}=6,83$; $p<0,007$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que os filhotes dos grupos manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia apresentaram um aumento no conteúdo de MHPG no BO quando comparado ao grupo não-manipulado. No entanto, não houve diferença significativa no conteúdo de MHPG no BO entre os grupos manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia.

Para a razão MHPG/NA (figura 6C), foi observado efeito significativo entre os *grupos* [$F_{(2,17)}=7,96$; $p<0,004$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que o grupo manipulação repetida 7º dia apresentou um aumento na razão MHPG/NA quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. No entanto, não houve diferença significativa na razão MHPG/NA entre os grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia.

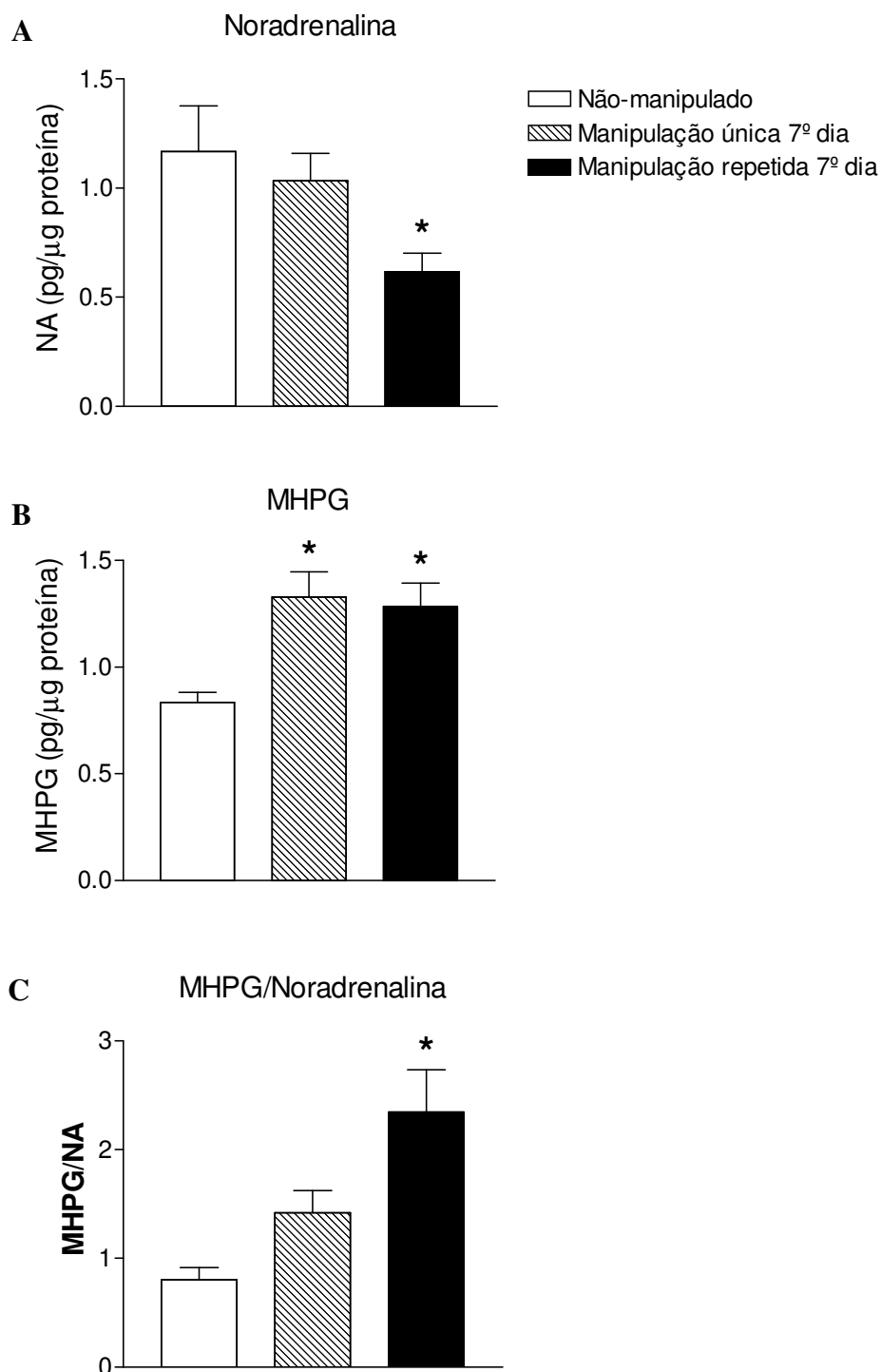


Figura 6. Conteúdo de NA (A) e MHPG (B) e taxa de MHPG/NA (C) no bulbo olfatório de ratas aos 7 dias de idade. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de *Newman-Keuls*. Para NA * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. Para MHPG * $p < 0,009$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para a taxa MHPG/NA * $p < 0,03$ quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. O $n = 6$ para o grupo não-manipulado, $n = 7$ para os grupos manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia.

A figura 7 mostra o conteúdo de CREB e pCREB no BO de filhotes dos grupos não-manipulado, manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia. A manipulação repetida durante os 7 primeiros dia após o nascimento ou apenas uma única manipulação no 7º dia não alterou o conteúdo de CREB no BO [$F_{(1,6)}=0,04$; $p=0,96$]. Para o conteúdo de pCREB foi observado efeito significativo entre os *grupos* [$F_{(2,12)}=5,03$; $p<0,03$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que a fosforilação do CREB no grupo manipulação repetida 7º dia não é diferente da que ocorre nos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia. No entanto, o grupo manipulação única 7º dia apresenta um aumento significativo da fosforilação do CREB quando comparado ao grupo não-manipulado.

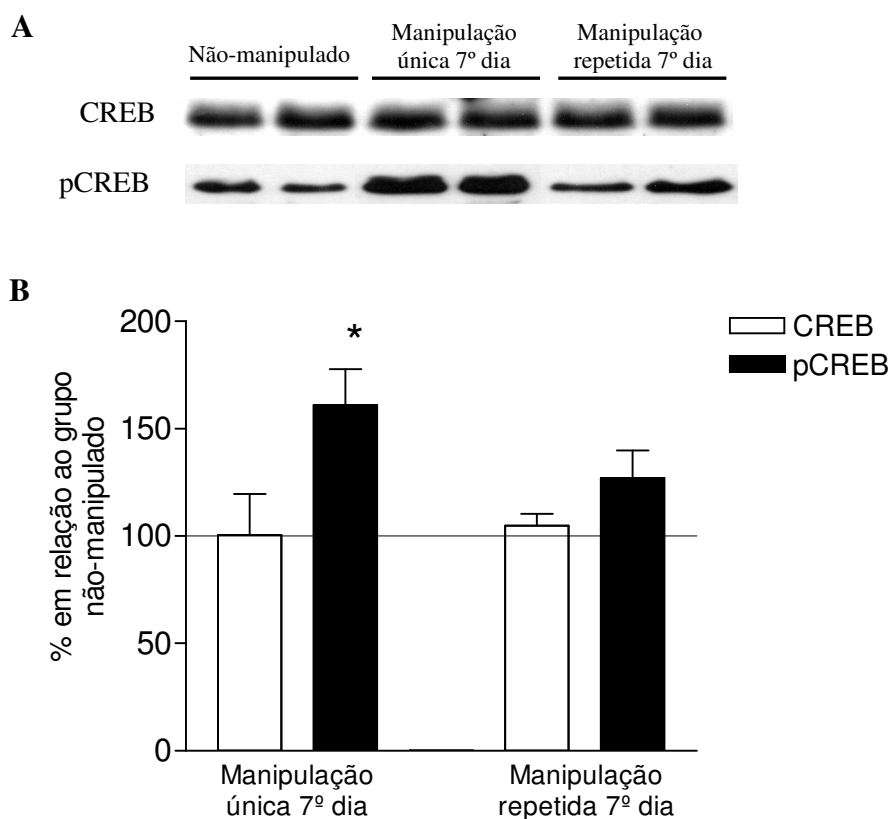


Figura 7. Conteúdo de CREB e pCREB no bulbo olfatório de ratas aos 7 dias de idade. Em cima (A), figura representativa dos *western blots* de CREB e pCREB. Em baixo (B), porcentagem da densidade óptica de CREB e pCREB em relação ao grupo não-manipulado. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,03$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para CREB $n = 3$ e para pCREB $n = 5$ em todos os grupos .

Experimento III – Produção de óxido nítrico no bulbo olfatório de filhotes fêmeas manipuladas no período neonatal.

A figura 8 mostra o conteúdo de óxido nítrico (NOx) no BO de ratas aos 7 dias após o nascimento. As ratas do grupo manipulação repetida não apresentam alteração no conteúdo de NOx no BO quando comparado as ratas do grupo não-manipulado [$t_{(17)}=0,90$; $p=0,38$].

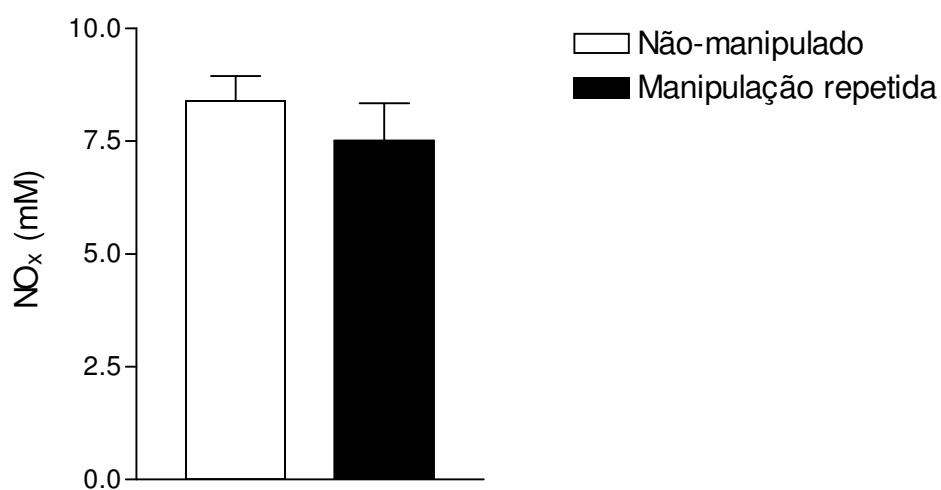


Figura 8. Conteúdo de NOx no BO de filhotes fêmeas. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de *Student*. Para o grupo não-manipulado $n = 10$ e para o grupo manipulação repetida $n = 9$.

DISCUSSÃO

O estabelecimento de uma interação normal entre a mãe e o filhote é crítico para o crescimento e o desenvolvimento comportamental na maioria das espécies de mamíferos (Moriceau & Sullivan 2005, Sullivan 2003). A realização de comportamentos recíprocos entre a mãe e o filhote aumenta a chance do filhote sobreviver, e vindo a sobreviver, ele irá se reproduzir e criar, com sucesso, seus próprios filhos (Insel & Young 2001, Anand & Scalzo 2000, Fleming *et al.* 1999).

Os resultados apresentados nessa tese mostraram que, em fêmeas, a manipulação repetida induziu a uma ausência de preferência pelo odor maternal. Pois as ratas do grupo manipulação repetida, testadas tanto no 7º dia quanto no 8º dia pós-natal, permanecem o mesmo tempo sobre a área com maravalha do seu ninho comparado à área com maravalha limpa. Da mesma forma, as ratas do grupo manipulação repetida permanecem o mesmo tempo sobre a área com maravalha do ninho dos ratos não-manipulados comparado à área com maravalha limpa. No entanto, uma única manipulação não interferiu na preferência pelo odor maternal. Pois as ratas do grupo manipulação única, testadas tanto no 7º dia quanto no 8º dia pós-natal, permanecem mais tempo sobre a área com maravalha do seu ninho comparado à área com maravalha limpa. Mostrando que a repetição do estímulo de manipulação neonatal foi necessária para que ocorresse a alteração no padrão de preferência pelo odor maternal característico, padrão esse que foi observado no grupo de ratas não-manipuladas.

Por outro lado, em machos, a repetição do estímulo de manipulação neonatal não foi capaz de induzir a ausência da preferência pelo odor maternal, pois os animais do grupo manipulação repetida preferem o odor da maravalha do seu ninho quando

comparado à maravalha limpa. No entanto, os filhotes machos do grupo manipulação repetida não apresentam preferência pelo odor da maravalha do ninho dos animais do grupo não-manipulado comparado à maravalha limpa, como as fêmeas.

Moore & Morelli (1979) mostraram que, em ratos, as mães, naturalmente, interagem diferentemente com seus filhotes machos e fêmeas, sendo que as mães permanecem mais tempo cuidando dos machos do que das fêmeas. Esse padrão de interação diferente entre mãe e machos e entre mãe e fêmeas se deve à maior concentração de testosterona que os machos apresentam, pois quando fêmeas recebem uma injeção de testosterona, no primeiro dia pós-natal, as mães aumentam o cuidado maternal para com aquelas fêmeas (Moore 1982). Assim, os machos, naturalmente, recebem maior cuidado maternal que as fêmeas, portanto, os machos estão mais acostumados com estímulos táteis.

Para que ocorra o aprendizado olfatório no filhote, possibilitando a ele identificar o odor da sua mãe, é necessário o pareamento de dois estímulos: o tátil (cuidado maternal) e o olfatório (odor da mãe) (Sullivan 2003, Leon 1998). Assim, uma variação no padrão de estimulação tátil, recebido pelo filhote, poderia ser prejudicial para a formação da memória do odor maternal. A manipulação neonatal, que por si só já é um estímulo tátil, induz um aumento no cuidado maternal (Liu *et al.* 1997), no entanto, não foi demonstrado ainda se esse cuidado maternal das mães cujos filhotes foram manipulados é maior nos filhotes machos ou se esse aumento é igual para machos e fêmeas. Dessa forma, o aumento na estimulação tátil sobre o filhote, que ocorre devido manipulação neonatal, pode ser percebida de forma diferenciada entre os machos e fêmeas. Como, naturalmente, as fêmeas recebem menos estímulos táteis que os machos, o aumento na estimulação tátil devido à manipulação neonatal pode ser mais prejudicial para as fêmeas que para os machos. O que poderia explicar a diferença que

existe entre machos e fêmeas quanto à preferência pelo odor maternal no grupo manipulação repetida, mostrado nessa tese.

Leon (1992) descreveu que a origem da atração do filhote pelo odor da mãe está nas fezes da rata lactante, pois o filhote prefere as fezes de uma rata lactante quando comparado às fezes de uma rata não-lactante (Leon 1974). A razão pela qual os filhotes preferem as fezes da rata lactante é a presença de *cecotrophe*, esse material é extremamente atrativo para os filhotes. O *cecotrophe* é produzido no ceco de todos os ratos adultos, no entanto, apenas as ratas lactantes são capazes de excretar *cecotrophe* suficiente para atrair os filhotes (Leon 1992, 1974). Muito provavelmente, isso se deve ao aumento no consumo de alimento durante a lactação, o que vai levar a um aumento da defecação, pois quando ratas lactantes são submetidas a uma restrição alimentar elas deixam de ser atrativas para os filhotes, uma vez que ocorre uma redução na defecação e conseqüentemente na excreção de *cecotrophe* (Leon 1975). Além do consumo alimentar, outros fatores, como o hormonal, atuam na regulação da excreção do *cecotrophe* pelas ratas lactantes, pois nessas ratas uma redução da concentração de PRL, interrompe a lactação e previne o aumento no consumo alimentar e o aumento na defecação, conseqüentemente reduz a atratividade maternal (Leon 1974). Dessa forma, o odor maternal (*cecotrophe*) que atrai os filhotes poderia estar sendo alterado pela manipulação neonatal, sendo assim, o responsável pela ausência da preferência pelo odor maternal das ratas que foram manipuladas todos os 7 dias. No entanto, essa hipótese não se confirmou, pois os filhotes do grupo não-manipulado, tanto machos quanto fêmeas, preferem o odor das mães de filhotes que foram manipulados durante os 7 dias, indicando que a manipulação neonatal não altera a produção de *cecotrophe* pelas mães. Além disso, os filhotes manipulados continuam não apresentando preferência pelo odor de uma mãe cujos filhotes não foram manipulados.

A estimulação tátil com pincel é capaz de induzir um aumento da atividade elétrica do LC de filhotes (Nakamura *et al.* 1987), como também promove um aumento da liberação de NA no BO (Rangel & Leon 1995). Nossos resultados mostraram que, em fêmeas, a manipulação repetida induziu a uma redução do conteúdo de NA no BO quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação única, indicando que a estimulação crônica do sistema noradrenérgico, devido a manipulação realizada durante os 7 dias, pode ser capaz de induzir uma exaustão na produção de NA, levando à redução do conteúdo de NA. Entretanto, tanto as ratas que foram manipuladas todos os 7 dias quanto as ratas que foram manipuladas apenas uma única vez apresentaram um aumento do conteúdo de MHPG no BO comparado às ratas não-manipuladas. Esse aumento do conteúdo de MHPG no BO, mesmo com a redução do conteúdo de NA no BO da rata que foi manipulada todos os 7 dias anteriores, sugere que a rata ainda consegue promover uma liberação de NA em resposta ao estímulo tátil (manipulação), indicando que está ocorrendo um aumento da atividade noradrenérgica no BO das ratas do grupo manipulação repetida. Em macacos, a separação maternal por um longo período (22 meses) resultou em redução da concentração de NA no fluido cérebroespinal, que para o autor, pode ser devido à exaustão ou redução da atividade noradrenérgica (Kraemer *et al.* 1989). Além disso, a separação maternal também induziu a um aumento da concentração de MHPG no fluido cérebroespinal em macacos (Gunnar *et al.* 1981), mostrando assim que intervenções que interferem na relação-mãe filhote são capazes de alterar o sistema noradrenérgico do filhote.

A NA proveniente do LC é necessária para a indução do aprendizado olfatório em filhotes (Sullivan & Wilson 2003, 1994), sua ação no BO exibe uma curva em U invertida, pois concentrações baixas ou altas não são eficazes na indução do aprendizado olfatório, o que ocorre com uma concentração moderada, chamada de

concentração ótima para o desenvolvimento do aprendizado olfatório (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989). Portanto, uma estimulação tátil adequada dos filhotes, por exemplo, pelo comportamento de lambar que a mãe faz normalmente, regula a liberação de NA pelo LC em uma concentração ótima o que favorece o aprendizado olfatórios durante as 2 primeiras semanas de vida. No entanto, a manipulação neonatal repetida, que é um estímulo tátil, altera esse padrão normal de comportamento maternal, induzindo um aumento no cuidado da mãe em relação a sua prole (Liu *et al.* 1997). Esses dois estímulos táteis (manipulação neonatal e aumento do comportamento de lambar) podem estar atuando sobre o sistema noradrenérgico, fazendo com que a liberação de NA pelo LC, na rata que foi manipulada durante os 7 dias, esteja além do ótimo para o aprendizado olfatório. Muito provavelmente o sistema noradrenérgico esteja deslocando para a extremidade da curva em U invertida com altas concentrações de noradrenalina, pois as células do BO estão recebendo uma estimulação repetida do sistema, como evidenciado pelo aumento do conteúdo de MHPG no BO.

Para a indução do aprendizado olfatório, a NA do LC age nas células do BO via receptores α_1 e β_1 -adrenérgicos (Harley *et al.* 2006, Langdon *et al.* 1997, Sullivan & Wilson 1994). Lesão do LC em filhotes, com 6-OHDA, reduz o conteúdo de NA no BO (Sullivan *et al.* 1994), e aumenta a densidade de receptores β -adrenérgicos no BO (Woo *et al.* 1996). No entanto, a estimulação tátil com pincel pareada com um novo odor induz um aumento na liberação de NA no BO (Rangel & Leon 1995), como também promove uma redução na densidade de receptores β -adrenérgicos no BO (Woo & Leon 1995b). Portanto, experiências olfatórias que alteram o conteúdo de NA podem afetar a densidade de receptores β -adrenérgicos no BO dos filhotes. Como a manipulação neonatal repetida, em ratas, promoveu um aumento da atividade noradrenérgica no BO, devido ao aumento do conteúdo de MHPG, sugere-se que a densidade de receptores β -

adrenérgicos destas ratas pode estar reduzida, sendo um dos motivos pelos quais as ratas que foram manipuladas durante os 7 primeiros dias pós-natal não apresentam preferência pelo odor maternal. Essa hipótese é corroborada por trabalhos que mostraram que a manipulação neonatal pode promover uma alteração no sistema noradrenérgico dos ratos (Baamonde *et al.* 2002, 1999). De fato, a manipulação neonatal reduz a afinidade dos receptores β -adrenérgicos no córtex, cerebelo e hipocampo em ratos com 1 mês de idade (Baamonde *et al.* 1999). No entanto, essa alteração não se mantém após os 60 dias de idade, pois após essa data não existe diferença na afinidade dos receptores β -adrenérgicos entre os animais manipulados e não-manipulados (Baamonde *et al.* 1999, Hilakivi-Clarke *et al.* 1991). Para Baamonde *et al.* (1999) essa alteração apenas no início da vida pode ser uma resposta adaptativa à manipulação neonatal. Além disso, a manipulação neonatal altera a eficácia da sinalização noradrenérgica no córtex, cerebelo e hipocampo, pois os ratos manipulados apresentam uma redução na acumulação de AMPc em resposta a estimulação dos neurônios noradrenérgicos (Baamonde *et al.* 2002).

A ligação da NA com os receptores β -adrenérgicos do BO (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989) promove um aumento da concentração de AMPc, o que vai levar à fosforilação do CREB (Lamprecht 1999, Silva *et al.* 1998, Hunter 1995). Essa fosforilação é um passo fundamental para o estabelecimento do aprendizado olfatório (Yuan *et al.* 2003, McLean *et al.* 1999). Nossos resultados mostraram que a manipulação repedida não foi capaz de promover um aumento da fosforilação do CREB no BO comparado aos ratos não-manipulados, no entanto, a manipulação única promoveu um aumento da fosforilação do CREB. Sendo assim, o passo fundamental para que ocorra a formação da memória do odor maternal, que é a fosforilação do CREB, está alterado na rata que foi submetida a uma estimulação tátil. Pode-se inferir

que provavelmente a estimulação tátil repetida tenha sido excessiva, podendo ser a causa da ausência de preferência pelo odor maternal mostrado nessa tese. Essa ausência do aumento na fosforilação do CREB nas ratas do grupo manipulação repetida pode ser, como anteriormente proposto, devido a provável alteração na afinidade e/ou densidade dos receptores β -adrenérgicos do BO. Pois essa alteração nos receptores β -adrenérgicos poderia levar a uma menor formação de AMPc, o que impossibilitaria a fosforilação do CREB.

Yuan *et al.* (2003) mostraram que a variação do conteúdo de CREB no BO pode ser prejudicial para o aprendizado olfatório uma vez que conteúdo adicional de CREB, induzido pela injeção de um vetor com CREB, ou uma redução nos sítios disponíveis para a sua fosforilação, induzido pela injeção de um vetor com CREB mutante que impede a sua fosforilação, alteram a concentração ótima de NA necessária para que ocorra a fosforilação do CREB. Sendo assim, uma grande expressão ou uma redução na expressão do CREB total pode interferir com o aprendizado olfatório. Além de alterar a formação do aprendizado olfatório no filhote, uma excessiva expressão de CREB total no animal adulto também interfere com o aprendizado em outros paradigmas, com o labirinto aquático (Guzowski & McGaugh 1997). Nossos resultados mostraram que tanto a manipulação repetida quanto a uma única manipulação no período neonatal não foram capazes de alterar o conteúdo de CREB total no BO, indicando que a ausência de preferência pelo odor maternal se deve a uma alteração no padrão de fosforilação do CREB e não ao conteúdo de CREB total no BO.

Como descrito por Samama & Boehm (1999) o NO participa da formação do aprendizado olfatório em filhotes, entretanto, os autores desconhecem o mecanismo pelo qual o NO atua. Porém, o NO é necessário apenas para a aquisição da memória olfatória no filhote, pois a inibição da NOS só interfere no processo de aprendizado

olfatório quando ela ocorre antes da sessão de treino, não tendo nenhum efeito sobre a evocação mostrado pela inibição da NOS após a sessão de treino (Samama & Boehm 1999). O que está de acordo com outros trabalhos que mostram que o NO atua na aquisição e consolidação das memórias e não na evocação (Kendrick *et al.* 1997, Baratti & Kopf 1996). A produção de NO no BO das ratas do grupo manipulação repetida não está alterada comparada às ratas do grupo não-manipulado, indicando que a manipulação neonatal repetida não foi capaz de promover nenhuma alteração na produção de NO no BO das ratas aos 7 dias após o nascimento, não sendo, portanto, o NO o responsável pela ausência de preferência pelo odor maternal das ratas do grupo manipulação repetida.

Capítulo 3

*Efeitos da Manipulação Neonatal Sobre a
Preferência Sexual*

INTRODUÇÃO

Manipulação Neonatal e Reprodução

Trabalhos prévios mostraram que tanto estimulações aparentemente inofensivas como a manipulação neonatal quanto os estímulos estressores como frio e choque elétrico, durante o período de diferenciação do SNC (pré-natal e logo após o nascimento), além de promover alterações relacionadas ao estresse, induzem a alterações estáveis que se manifestam de modo a alterar a função reprodutiva dos animais (Padoin *et al.* 2001, Gomes *et al.* 1999, Sieck & Ramaley 1975, Ward 1972).

O procedimento de manipulação neonatal induz a uma diminuição do comportamento sexual tanto em machos quanto em fêmeas (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). Em machos, esse déficit no comportamento sexual do rato manipulado é demonstrado por uma redução tanto na frequência de intromissões penianas quanto no número de animais que realizam esse comportamento de intromissão (Padoin *et al.* 2001). Mazaro & Lamano-Carvalho (2006) demonstraram que, em machos, a manipulação neonatal reduz o peso dos testículos bem como o diâmetro dos tubos seminíferos. A manipulação neonatal também reduz o número de células de Sertoli e a produção diária de espermatozóides.

Já em fêmeas, a redução do comportamento sexual está relacionada a uma diminuição da frequência de lordose realizada pelas ratas manipuladas quando elas são colocadas na presença de um macho com experiência sexual (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). Além disso, Gomes *et al.* (1999) demonstraram que ratas

manipuladas quando em estro têm uma drástica redução do número de oócitos quando comparado a ratas não-manipuladas.

Sistema Olfatório e Motivação Sexual

A percepção dos odores influencia e/ou determina muitas fases do processo reprodutivo como: reconhecimento do parceiro, comportamento sexual (López *et al.* 1999a, Brennan & Keverne 1997, Edwards *et al.* 1996, Okere *et al.* 1996) e comportamento maternal (Lévy *et al.* 2004). O reconhecimento do estado reprodutivo do parceiro é fundamental para o desenvolvimento dos comportamentos pré-copulatórios, que vão culminar no comportamento sexual propriamente dito.

Uma ótima ferramenta que tem sido usada há muito tempo para se testar a motivação sexual é o teste de preferência sexual. Nele se apresentam simultaneamente ao animal testado, dois animais-estímulos, um é o parceiro sexual natural, e o outro é um animal neutro (geralmente um animal do sexo oposto castrado). Assim, esse teste consiste na discriminação do odor dos animais-estímulos, o que vai determinar o reconhecimento do parceiro (Avitsur & Yirmiya, 1999, Edwards *et al.* 1996, Edwards & Pfeifle 1983). Nesse teste, um rato macho adulto mostra uma clara preferência pela fêmea sexualmente receptiva quando comparado a uma não-receptiva (Edwards *et al.* 1996). Do mesmo modo, uma fêmea adulta receptiva (no proestro ou castrada reposta com estradiol e progesterona) mostra uma clara preferência pelo macho sexualmente ativo quando comparado a um macho castrado (Avitsur & Yirmiya, 1999, Edwards & Pfeifle 1983). Todos estes dados mostram a motivação sexual, tanto no macho quanto na fêmea.

Porém, ratos machos que tiveram o BO completamente removido não distinguem a fêmea receptiva da não-receptiva, pois eles permanecem o mesmo tempo investigando as duas ratas. Além disso, os ratos bulbectomizados mostram uma frequência muito baixa tanto na investigação ano-genital quanto no comportamento de monta (Edwards *et al.* 1990). Em fêmeas, a remoção do órgão vomeronasal ou a transecção do nervo olfatório elimina a preferência pelo macho sexualmente ativo (Romero *et al.* 1990). Portanto, a bulbectomia, com a destruição de um ou todos os componentes do sistema olfatório vai resultar na diminuição da motivação sexual nos ratos. Os efeitos sobre a preferência e o comportamento de cópula ocorrem, provavelmente, por uma diminuição da habilidade desse sistema em detectar odores (Edwards *et al.* 1990).

De fato, os ferormônios do macho interferem na fisiologia reprodutiva da fêmea, pois ratas em idade avançada ou ratas jovens em estro constante ou com ciclo irregular voltam a ter ciclo estral regular após a exposição à urina do rato macho (Mora & Cabrera 1997, Mora *et al.* 1994). Esse efeito é mediado pela estimulação do órgão vomeronasal da fêmea que ocorre devido à presença dos ferormônios oriundos do macho (Mora & Cabrera 1997), uma vez que elas apresentam um aumento na expressão de *Fos* no BOA quando expostos à urina de um rato macho (Yamaguchi *et al.* 2000).

JUSTIFICATIVA

Experiências no início da vida do indivíduo podem determinar o comportamento sexual do animal quando adulto (Kendrick *et al.* 1998, Fillion & Blass 1986). A manipulação neonatal interfere nos processos reprodutivos tanto de machos quanto de fêmeas. Os animais manipulados no período neonatal quando adultos apresentam uma redução no comportamento sexual; em fêmeas a manipulação neonatal reduziu o quociente de lordose, e em machos a manipulação reduziu o número de montas (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). Sendo que em machos a experiência sexual reverteu essa redução do comportamento sexual (Padoin *et al.* 2001). Assim, os testes, referentes à reprodução, realizados até hoje em animais manipulados só verificaram aspectos consumatórios do comportamento sexual, não tendo nenhum trabalho que tenha testado aspectos motivacionais. O teste de preferência sexual é um teste muito usado para se testar a motivação sexual, além disso, ele é extremamente dependente da percepção dos odores.

Objetivos:

Analisar os efeitos da manipulação neonatal sobre a preferência sexual de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

Analisar os efeitos da manipulação neonatal sobre a preferência sexual tanto em machos quanto em fêmeas e avaliar os efeitos da experiência sexual nessa preferência.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo Experimental

Experimento I – Preferência sexual em diferentes fases do ciclo estral de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal.

Para esse teste de preferência sexual, em ratas adultas, foram utilizadas as ratas dos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulação repetida utilizadas para o teste de preferência pelo odor maternal quando filhotes. As ratas filhotes do grupo manipulação repetida foram manipuladas por mais 3 dias após o teste de preferência pelo odor maternal, ou seja, foram manipuladas do 1º ao 10º dia de vida, como o protocolo experimental de manipulação neonatal estabelecido e utilizado no nosso laboratório. As ratas filhotes dos outros dois grupos experimentais não sofreram nenhuma outra intervenção após o teste de preferência pelo odor maternal.

Quando adultas (80 dias de idade) as fêmeas tiveram o ciclo estral verificado, apenas ratas com 3 ciclos estrais regulares consecutivos foram utilizadas para o teste de preferência sexual. As ratas foram testadas primeiro no proestro, quando a rata está sexualmente receptiva, e depois no diestro. Nesse teste de preferência sexual a rata testada pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo um macho sexualmente ativo e outra contendo um macho castrado.

Experimento II – Preferência sexual de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal: efeito da experiência sexual.

Um outro lote de fêmeas dos grupos não-manipulado e manipulação repetida foram utilizadas para a realização desses testes de preferência sexual, essas ratas não foram submetidas ao teste de preferência pelo odor maternal quando filhotes. As fêmeas tiveram o ciclo estral verificado, e apenas ratas com 3 ciclos estrais regulares consecutivos foram utilizadas para o teste de preferência sexual, primeiro sem experiência sexual e depois com experiência sexual. As ratas foram testadas sempre no proestro, sendo que entre o primeiro e o segundo teste, elas receberam experiência sexual na noite do proestro com um macho sexualmente ativo vasectomizado.

Foram realizados dois testes de preferência sexual: no primeiro, a rata pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo um macho sexualmente ativo e outra contendo um macho castrado; no segundo, a rata pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo um macho sexualmente ativo e outra contendo uma fêmea receptiva (castrada repostada com estradiol e progesterona).

Experimento III – Preferência sexual de machos adultos manipulados no período neonatal: efeito da experiência sexual.

Os filhotes machos usados para o teste de preferência pelo odor maternal, quando adultos (90 dias de idade) foram utilizados para o teste de preferência sexual, primeiro sem experiência sexual e depois com experiência sexual. Nesse teste de preferência sexual, o rato pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo uma fêmea receptiva (castrada repostada com estradiol e progesterona) e outra contendo uma fêmea não-receptiva (castrada).

Um outro lote de machos dos grupos não-manipulado e manipulação repetida foram utilizados para a realização de outro teste de preferência sexual. Esses animais não foram submetidos ao teste de preferência pelo odor maternal quando filhotes. Os machos foram testados conforme o protocolo usado anteriormente, ou seja, primeiro sem experiência sexual e depois com experiência sexual. No entanto, nesse teste de preferência sexual foram modificados os animais-estímulos, ou seja, o animal testado pôde escolher entre uma fêmea receptiva (castrada reposta com estradiol e progesterona) e um macho sexualmente ativo.

Procedimentos Utilizados

Teste de Preferência Sexual

O teste de preferência sexual foi realizado em uma caixa de acrílico de 90 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm altura (Figura 9B). Essa caixa é dividida em três compartimentos iguais de 30 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm altura. Cada compartimento lateral tem uma porta que se comunica com o compartimento central. Essa porta permite o contato visual e olfatório, no entanto, não permite contato físico entre o animal testado, que está no compartimento central, e os animais-estímulos, que estão nos compartimentos laterais. O rato a ser testado foi colocado no compartimento central, 15 minutos antes do início do teste para ambientação. No final desse período de ambientação os animais-estímulos foram colocados cada um em um dos compartimentos laterais e o comportamento do rato foi filmado por 15 minutos, conforme esquema da figura 9A. Todos os testes de preferência sexual foram realizados no início do período escuro do ciclo claro-escuro, sob a iluminação de uma lâmpada vermelha. Os vídeos foram analisados com o auxílio do

programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou o tempo total cheirando as áreas.

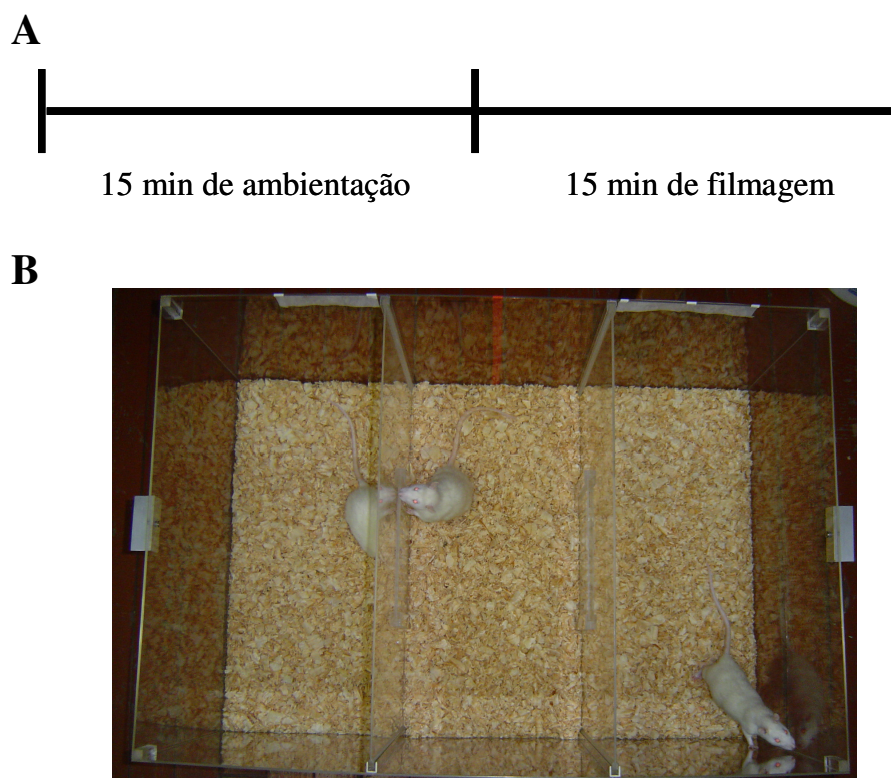


Figura 9. A figura **A** mostra o esquema utilizado para o teste de preferência sexual, onde o rato a ser testado se ambienta por 15 minutos e a seguir os animais-estímulos são colocados e se inicia a filmagem dos comportamentos por 15 minutos. A figura **B** mostra a caixa utilizada para o teste de preferência sexual.

Ciclo Estral

A partir de 80 dias de idade, o ciclo estral foi verificado pelo esfregaço vaginal, que foi coletado diariamente ao redor das 9 horas da manhã e analisado a fresco em microscópio óptico. Foram utilizadas, no experimento, somente ratas com 3 ciclos estrais regulares seguidos.

Castração das Fêmeas

Ratas adultas foram anestesiadas com injeção i.p. de xilasina e cloridrato de ketamina, ambas na dose de 100 mL/Kg de peso corporal. A ovariectomia foi feita por meio de incisões laterais de cerca de 1cm, por meio das quais os ovários e as porções superiores uterinas foram expostos. Após ligadura entre essas duas estruturas, os ovários foram retirados. Após a cirurgia, as ratas foram colocadas em caixas coletivas e só foram utilizadas no mínimo 12 dias depois.

Reposição Hormonal de Fêmeas

O protocolo de reposição hormonal consistiu em duas injeções subcutâneas: a primeira, contendo 20 µg de estradiol (benzo-ginoestril ap[®] 5mg – SARSA) diluído em 0,2 mL de óleo mineral, que foi aplicada 48 horas antes da utilização da rata, e a segunda, contendo uma mistura de 20 µg de estradiol + 2,5 mg de progesterona (Sigma) diluída em 0,4 mL de óleo mineral, 6 horas antes da utilização da rata.

Castração dos Machos

Ratos adultos foram anestesiadas com injeção i.p. de xilasina e cloridrato de ketamina, ambas na dose de 100 mL/Kg de peso corporal. A orquiectomia foi feita por meio de incisões transversais únicas nos sacos escrotais de cerca de 2 cm, estando o

animal em decúbito dorsal. Os ramos vasculares foram rigorosamente atados e, após, os testículos foram removidos. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas coletivas e só foram utilizados no mínimo 12 dias depois.

Vasectomia

Ratos adultos, aprovados no teste de desempenho sexual, foram anestesiados com injeção i.p. de xilasina e cloridrato de ketamina, ambas na dose de 100 mL/Kg de peso corporal. A vasectomia foi feita por meio de incisões bilaterais, paralela à linha alba e à abertura prepucial, de cerca de 2cm, por meio das quais os vasos deferentes foram localizados. Após a ligadura, realizada em dois pontos nos vasos deferentes, eles foram seccionados. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas coletivas e só foram utilizados no mínimo 12 dias depois.

Teste de Desempenho Sexual dos Machos

O teste de desempenho sexual foi o critério utilizado para incluir um rato macho no grupo de animais sexualmente ativos utilizados como estímulo no teste de preferência sexual ou no grupo de animais que foram vasectomizados e utilizados para dar experiência sexual às fêmeas. O teste consistia em colocar os machos perante uma rata sexualmente receptiva, aqueles que apresentaram 6 ou mais montas com intromissão peniana no intervalo de 10 minutos foram considerados como sexualmente ativos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (EPM), e o nível crítico fixado foi de 5% ($p \leq 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

Para o teste de preferência sexual, as comparações entre os grupos experimentais, a área com os animais-estímulos e as fases do ciclo estral ou experiência sexual foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de três vias de medidas repetidas, seguida de *Newman-Keuls*.

RESULTADOS

Experimento I – Preferência sexual em diferentes fases do ciclo estral de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal.

A figura 10 mostra o teste de preferência sexual, onde a rata pôde escolher entre dois estímulos: um macho sexualmente ativo e um macho castrado. O teste foi realizado na noite do proestro, quando a rata está sexualmente receptiva, e na noite do diestro. Nesse teste foram utilizadas as mesmas ratas que foram testadas quanto à preferência pelo odor maternal quando filhotes, ou seja, 5 grupos experimentais: não-manipulado, manipulação única 7º dia, manipulação única 8º dia, manipulação repetida 7º dia e manipulação repetida 8º dia. No entanto, estamos mostrando apenas as ratas que foram testadas no 7º dia de vida quanto a sua preferência pelo odor maternal, pois os resultados das ratas que quando filhotes foram testadas no 8º dia pós-natal é semelhante ao das ratas testadas no 7º.

Foi observado efeito significativo para *grupo* [$F_{(2,70)}=3,47$; $p<0,04$], para *área* [$F_{(1,70)}=96,94$; $p<0,0001$] e para *fase do ciclo estral* [$F_{(1,70)}=5,13$; $p<0,03$]. Foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(2,70)}=8,81$; $p<0,0004$] e para a interação entre *fase do ciclo estral* e *área* [$F_{(1,70)}=27,95$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito para a interação entre *grupo* e *fase do ciclo estral* [$F_{(2,70)}=0,98$; $p=0,38$]. Foi detectado efeito significativo para a interação entre *grupo*, *área* e *fase do ciclo estral* [$F_{(2,70)}=7,09$; $p<0,002$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que as ratas dos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia, quando no proestro, permanecem significativamente mais tempo cheirando a área do macho sexualmente ativo comparado à área com o macho castrado. No entanto, as ratas do

grupo manipulação repetida 7º dia não apresentam diferença no tempo que permanecem cheirando as áreas com o macho sexualmente ativo e o macho castrado. No diestro, todos os grupos permanecem o mesmo tempo cheirando as áreas com o macho sexualmente ativo e o macho castrado.

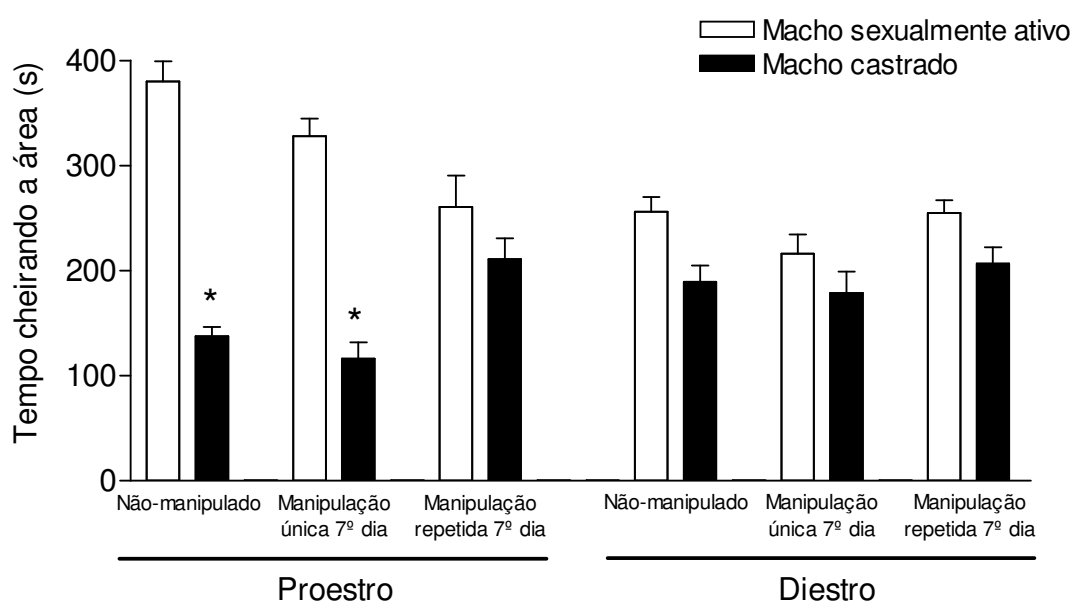


Figura 10. Preferência sexual de fêmeas na noite do proestro e diestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com macho sexualmente ativo dentro do mesmo grupo. $n = 12 - 15$ para todos os grupos.

Experimento II – Preferência sexual de fêmeas adultas manipuladas no período neonatal: efeito da experiência sexual.

A figura 11 mostra o teste de preferência sexual em fêmeas na noite do proestro. Foram realizados dois testes: no primeiro, a rata testada pôde escolher entre um macho sexualmente ativo e um macho castrado; no segundo, a rata testada pôde escolher entre um macho sexualmente ativo e uma fêmea receptiva. Para esses testes foram utilizadas ratas dos seguintes grupos: não-manipulado e manipulação repetida. Nesses experimentos os testes foram realizados primeiramente nas ratas sem experiência sexual e posteriormente com experiência sexual.

Preferência entre macho sexualmente ativo e macho castrado

No teste de preferência sexual em fêmeas no qual a escolha foi entre um macho sexualmente ativo e um macho castrado (figura 11A) foi observado efeito significativo para *área* [$F_{(1,40)}=53,25$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito significativo para *grupo* [$F_{(1,40)}=0,93$; $p=0,34$] e nem para *experiência sexual* [$F_{(1,40)}=2,33$; $p=0,13$]. Foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(1,40)}=41,32$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito para a interação entre *grupo* e *experiência sexual* [$F_{(1,40)}=1,57$; $p=0,21$] e nem para a interação entre *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,40)}=2,66$; $p=0,11$]. Não foi detectado efeito significativo para a interação entre *grupo*, *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,40)}=0,02$; $p=0,87$]. Assim, a *experiência sexual* não alterou o padrão de preferência sexual das ratas não-manipuladas e nem das ratas manipuladas, quando a escolha é entre um macho sexualmente ativo e um macho castrado. O teste de *Newman-Keuls*, para a interação entre *grupo* e *área*, mostrou que as ratas do grupo não-manipulado, independente da *experiência sexual*, cheiram por muito mais tempo a área com o macho sexualmente

ativo quando comprado ao macho castrado. No entanto, as ratas do grupo manipulação repetida permanecem o mesmo tempo cheirando a área com macho sexualmente ativo e área com o macho castrado, independente da *experiência sexual*.

Preferência entre macho sexualmente ativo e fêmea receptiva

No teste de preferência sexual em fêmeas no qual a escolha foi entre um macho sexualmente ativo e uma fêmea receptiva (figura 11B) foi observado efeito significativo para *área* [$F_{(1,38)}=57,64$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito significativo para *grupo* [$F_{(1,38)}=0,46$; $p=0,50$] e nem para *experiência sexual* [$F_{(1,38)}=2,91$; $p=0,10$]. Foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(1,38)}=51,16$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito para a interação entre *grupo* e *experiência sexual* [$F_{(1,38)}=1,02$; $p=0,32$] e nem para a interação entre *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,38)}=1,68$; $p=0,20$]. Não foi detectado efeito significativo para a interação entre *grupo*, *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,38)}=0,01$; $p=0,91$]. Assim, a *experiência sexual* não alterou o padrão de preferência sexual das ratas não-manipuladas e nem das ratas manipuladas, quando a escolha é entre um macho sexualmente ativo e uma fêmea receptiva. O teste de *Newman-Keuls*, para a interação entre *grupo* e *área*, mostrou que as ratas do grupo não-manipulado, independente da *experiência sexual*, cheiram por muito mais tempo a área com o macho sexualmente ativo quando comprado à área com a fêmea receptiva. No entanto, as ratas do grupo manipulação repetida permanecem o mesmo tempo cheirando a área com o macho sexualmente ativo e a área com a fêmea receptiva, independente da *experiência sexual*.

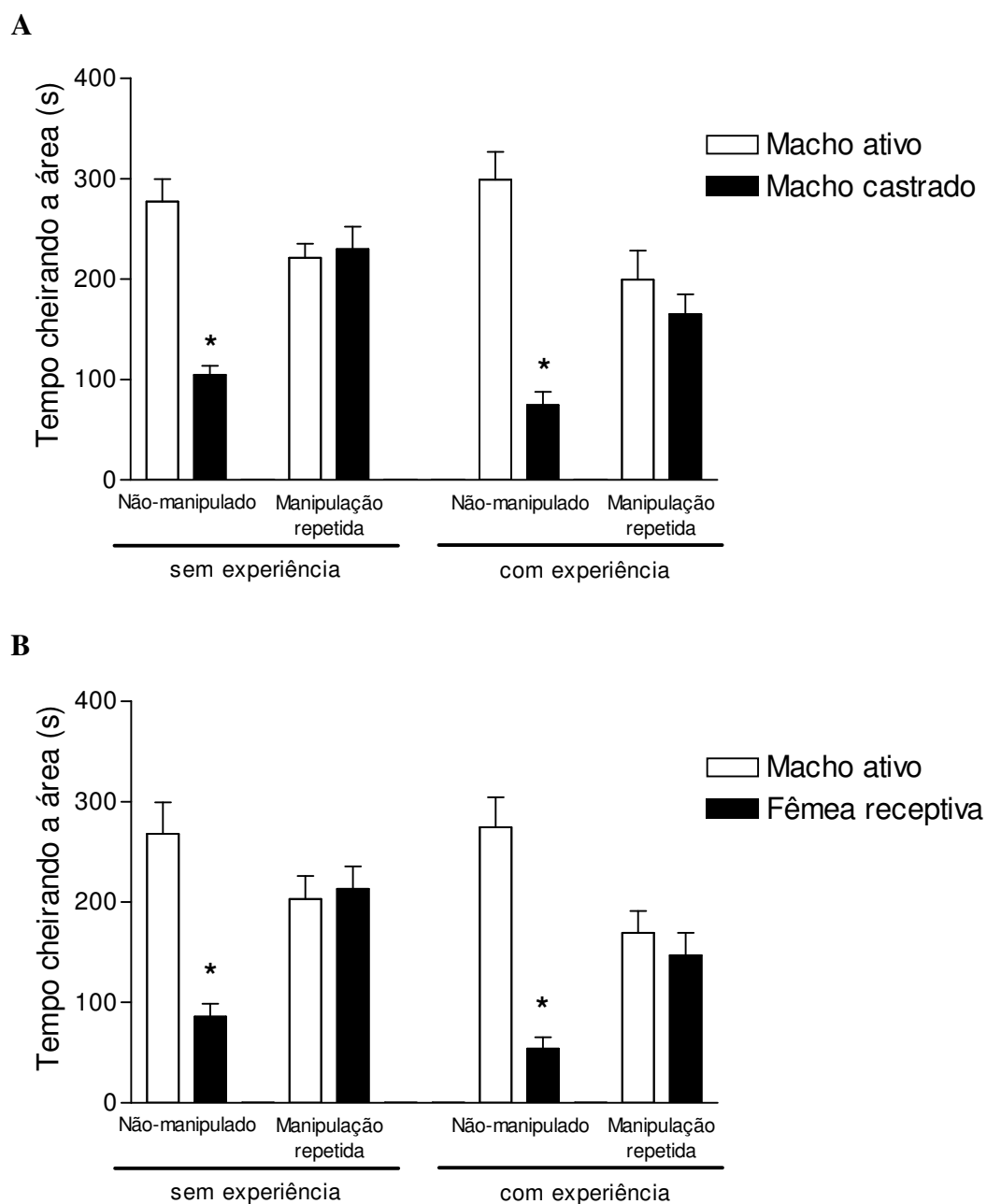


Figura 11. Preferência sexual de fêmeas e experiência sexual. Em **A** a escolha da rata testada é entre um macho sexualmente ativo e um macho castrado, em **B** a escolha da rata testada é entre um macho sexualmente ativo e uma fêmea receptiva. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com macho sexualmente ativo dentro do mesmo grupo. $n = 10 - 12$ para todos os grupos.

Experimento III – Preferência sexual de machos adultos manipulados no período neonatal: efeito da experiência sexual.

A figura 12 mostra o teste de preferência sexual em machos. Foram realizados dois testes: no primeiro, o rato testado pôde escolher entre uma fêmea receptiva e uma fêmea não-receptiva, para esse teste foram utilizados ratos machos dos seguintes grupos: não-manipulado, manipulação única 7º dia e manipulação repetida 7º dia; no segundo, o rato testado pôde escolher entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo, para esses testes foram utilizados ratos machos dos seguintes grupos: não-manipulado e manipulação repetida. Nesses experimentos os testes foram realizados primeiramente nos ratos sem experiência sexual e posteriormente com experiência sexual.

Preferência entre fêmea receptiva e fêmea não-receptiva

No teste de preferência sexual em machos onde a escolha foi entre uma fêmea receptiva e uma fêmea não-receptiva (figura 12A) foi observado efeito significativo para *grupo* [$F_{(2,92)}=6,56$; $p<0,003$] e para *área* [$F_{(1,92)}=333,73$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito significativo para *experiência sexual* [$F_{(1,92)}=0,48$; $p=0,49$]. Foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(2,92)}=12,03$; $p<0,0001$] e para a interação entre *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,92)}=13,25$; $p<0,0005$], entretanto, não foi detectado efeito para a interação entre *grupo* e *experiência sexual* [$F_{(2,92)}=0,86$; $p=0,43$]. Foi detectado efeito significativo para a interação entre *grupo*, *área* e *experiência sexual* [$F_{(2,92)}=8,02$; $p<0,0007$]. O teste de *Newman-Keuls* mostrou que os ratos dos grupos não-manipulado e manipulação única 7º dia, sem experiência sexual, permanecem significativamente mais tempo cheirando a área com a fêmea receptiva quando comprado à área com a fêmea não-receptiva, sendo que a experiência

sexual não alterou esse padrão de preferência sexual. Porém, os ratos que foram manipulados 1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida não mostraram preferência pela parceira sexual, permanecendo o mesmo tempo cheirando a área com a fêmea receptiva e a área com a fêmea não-receptiva, no entanto, a experiência sexual reverteu essa ausência de preferência sexual, pois os ratos do grupo manipulação repetida 7º dia, após a experiência sexual, permanecem significativamente mais tempo cheirando a área com a fêmea receptiva quando comparado à área com a fêmea não-receptiva. Os dados de preferência sexual dos ratos dos grupos manipulação única e repetida que foram testados quanto à preferência pelo odor maternal no 8º dia de vida foram semelhantes ao dos ratos testados no 7º dia de vida, respectivamente, assim optamos por não mostrar os dados.

Preferência entre fêmea receptiva e macho sexualmente ativo

No teste de preferência sexual em machos onde a escolha foi entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo (figura 12B) foi observado efeito significativo para *área* [$F_{(1,44)}=48,12$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito significativo para *grupo* [$F_{(1,44)}=1,86$; $p=0,18$] e nem para *experiência sexual* [$F_{(1,44)}=0,52$; $p=0,47$]. Foi observado efeito significativo para a interação entre *grupo* e *área* [$F_{(1,44)}=59,67$; $p<0,0001$], entretanto, não foi detectado efeito para a interação entre *grupo* e *experiência sexual* [$F_{(1,44)}=0,57$; $p=0,45$] e nem para a interação entre *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,44)}=0,07$; $p=0,78$]. Não foi detectado efeito significativo para a interação entre *grupo*, *área* e *experiência sexual* [$F_{(1,44)}=0,008$; $p=0,93$]. Assim, a *experiência sexual* não alterou o padrão de preferência sexual dos ratos não-manipulados e nem dos ratos manipulados, quando a escolha é entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo. O teste de *Newman-Keuls*, para a interação

entre *grupo* e *área*, mostrou que os ratos do grupo não-manipulado, independente da *experiência sexual*, cheiram por um tempo significativamente maior a fêmea receptiva comprado ao macho sexualmente ativo. No entanto, os ratos do grupo manipulação repetida permanecem o mesmo tempo cheirando a área com a fêmea receptiva e a área com o macho sexualmente ativo, independente da *experiência sexual*.

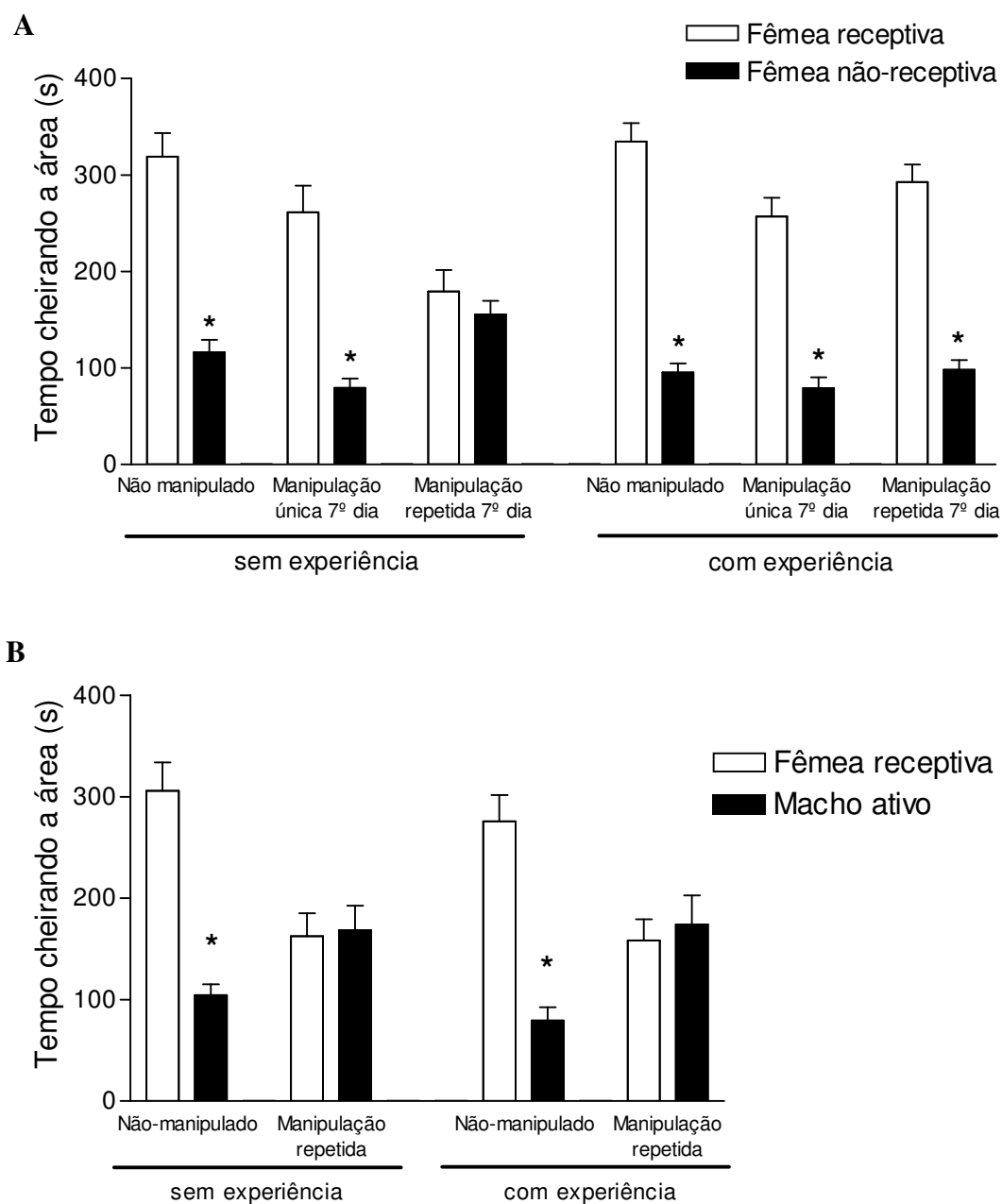


Figura 12. Preferência sexual de machos e experiência sexual. Em **A** a escolha do rato testado é entre uma fêmea receptiva e uma fêmea não-receptiva, em **B** a escolha do rato testado é entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de três vias seguido de *Newman-Keuls*. * $p < 0,0001$ quando comparado com área com a fêmea receptiva dentro do mesmo grupo. $n = 11 - 18$ para todos os grupos.

DISCUSSÃO

Um dado genótipo pode expressar diferentes fenótipos dependendo das condições ambientais em que o indivíduo se encontra (Bateson *et al.* 2004, Weaver *et al.* 2004). Sendo assim, para muitas espécies animais, inclusive a humana, o ambiente em que o filhote permanece logo após o nascimento influencia o padrão comportamental desse indivíduo quando adulto, sendo a qualidade da relação mãe-filhote muito importante para o estabelecimento das respostas defensivas e das estratégias reprodutivas do filhote quando adulto (Cameron *et al.* 2005, Kaufman *et al.* 2000, Carlson & Earls 1997). Para Bateson *et al.* (2004) mesmo que as condições para o desenvolvimento de um indivíduo não sejam as ideais, ele necessita de estratégias para sobreviver. No entanto, o custo dessa sobrevivência pode ser o seu sucesso reprodutivo no futuro. Assim, muitos comportamentos são moldados durante períodos críticos no início da vida do indivíduo. Konrad Lorenz (1935), ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1973, em um trabalho com gansos, que foi traduzido para o inglês e republicado em 1970, mostrou como o reconhecimento e o estabelecimento de uma relação com a mãe no início da vida pode ser fundamental para a escolha do parceiro na vida adulta, ele chamou esse processo de *imprinting* sexual (o termo em português seria estampagem, no entanto, não se costuma traduzir esse termo). Assim, para Lorenz o reconhecimento da mãe, quando filhote, vai influenciar a escolha do parceiro sexual quando adulto.

Em mamíferos, o *imprinting* sexual foi demonstrado por outros autores (Kendrick *et al.* 1998, Moore *et al.* 1996, Fillion & Blass 1986, Bateson 1978). Em ratos, o *imprinting sexual* ficou demonstrado num experimento no qual um odor cítrico

foi colocado no ventre de ratas lactantes durante todo o período de lactação. Os filhotes dessas ratas, quando adultos, demonstraram clara preferência por ratas sexualmente receptivas que apresentavam o mesmo odor cítrico que suas mães quando comparado às ratas receptivas que não apresentavam o odor cítrico (Fillion & Blass 1986). Segundo Moriceau & Sullivan (2005), os odores que são associados à infância apresentam um valor na vida adulta, entretanto, o papel desse odor muda da infância (reconhecimento da mãe) para a vida adulta (reprodução). Além disso, Kendrick *et al.* (1998) mostraram que ovelhas que foram criadas por cabras desde o nascimento preferem cabras como parceiro sexual, da mesma forma, cabras que foram criadas por ovelhas desde o nascimento preferem ovelhas como parceiro sexual. Demonstra-se assim, como experiências no início da vida do indivíduo podem determinar o comportamento sexual do animal quando adulto (Fillion & Blass 1986).

Os resultados apresentados nessa tese mostraram que os animais que foram manipulados durante os 10 primeiros dias pós-natal não demonstraram preferência pelo seu parceiro sexual, diferente dos que foram manipulados apenas uma única vez ou dos que nunca foram manipulados, pois esses apresentam uma clara preferência pelo parceiro sexual. Mostrando, novamente, que a repetição do estímulo de manipulação neonatal é importante para a indução de seus efeitos.

Em fêmeas, as ratas do grupo manipulação repetida, quando em proestro, não reconhecem o parceiro sexual, pois permanecem o mesmo tempo cheirando o macho sexualmente ativo e o macho castrado. Esses animais, também, permanecem o mesmo tempo cheirando o macho sexualmente ativo e a fêmea receptiva, não tendo, a experiência sexual nenhuma influência sobre a preferência sexual desses animais. Um padrão muito semelhante foi observado quanto à preferência pelo odor maternal, ou seja, as ratas do grupo manipulação repetida não reconhecem o odor de suas mães,

reconhecimento esse que ocorreu claramente nos grupos manipulação única e não-manipulado. Portanto, em fêmeas, essa ausência no reconhecimento da mãe na infância pode influenciar o reconhecimento do parceiro sexual na vida adulta, como proposto inicialmente por Lorenz (1970) e posteriormente por Bateson (1978).

Em machos, os animais do grupo manipulação repetida permanecem o mesmo tempo cheirando a rata receptiva e a não-receptiva, como também permanecem o mesmo tempo cheirando a rata receptiva e o macho sexualmente ativo. No entanto, a experiência sexual, alterou esse padrão de preferência sexual, pois depois da experiência sexual, os ratos do grupo manipulação repetida passaram a reconhecer a rata receptiva quando comparado à rata não-receptiva. Isso não ocorreu quando a escolha foi entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo, pois os ratos do grupo manipulação repetida continuaram a não reconhecer a sua parceira sexual. Sendo assim, em machos, o efeito da manipulação neonatal sobre a ausência de reconhecimento do parceiro sexual parece ser mais branda, pois uma única sessão de interação social, como a experiência sexual, foi capaz de reverter, parcialmente, esse efeito. Da mesma forma, o efeito da manipulação neonatal sobre o reconhecimento do odor maternal foi mais lábil em machos, pois os filhotes do grupo manipulação repetida reconhecem o odor maternal.

Como salientado anteriormente, Kendrick *et al.* (2001, 1998) mostraram que ovelhas que foram criadas por cabras preferem cabras como parceiros sexual, da mesma forma, cabras que foram criadas por ovelhas preferem ovelhas como parceiras sexual. Entretanto, esse *imprinting* sexual pode ser revertido em fêmeas, pois o convívio com animais da mesma espécie, por um longo período (1 a 2 anos), foi capaz de fazer com que as cabras e ovelhas preferissem animais da sua espécie como parceiro sexual. No entanto, em macho, o convívio com animais de sua espécie (por 3 anos) não conseguiu

reverter a preferência sexual, pois eles continuam preferindo, como parceiro sexual, animais da mesma espécie que a sua mãe adotiva. Sendo assim, em ovelhas e cabras, a influência maternal sobre as preferências sociais e sexuais é mais forte em machos do que em fêmeas (Kendrick *et al.* 2001, 1998). Outros autores (Vos 1995, Fabricius 1991, Ten Cate 1985) também descreveram que em aves os efeitos do *imprinting* sexual são mais marcados em machos do que em fêmeas. Porém, os nossos resultados mostram que a manipulação neonatal foi mais eficaz em alterar a preferência sexual de fêmeas que de machos, muito provavelmente, porque a ligação entre mãe e filhote foi mais afetada em fêmeas do que em machos, como evidenciado pela preferência pelo odor maternal.

Alguns trabalhos com manipulação neonatal têm mostrado efeitos dependentes de sexo. Para Panagiotaropoulos *et al.* (2004) a manipulação neonatal apresenta efeitos mais adversos em fêmeas, aumentando sua predisposição para psicopatologias como a depressão. Em um teste de nado forçado crônico, os machos manipulados assumem uma estratégia de luta mais ativa, pois eles apresentam apenas um pequeno período de imobilidade comparado aos animais não-manipulados. Já, as ratas manipuladas não assumem a mesma postura de luta ativa que os machos, pois elas ficam imóveis por um longo período comparado às ratas não-manipuladas (Papaioannou *et al.* 2002).

Trabalhos prévios do nosso laboratório (Padoin *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2006a) já haviam mostrado que a manipulação neonatal interfere com o processo reprodutivo dos animais, pois tanto machos quanto fêmeas apresentam uma drástica diminuição do comportamento sexual. Padoin *et al.* (2001) demonstraram que, em machos, essa redução do comportamento sexual nos animais manipulados pode ser revertida pela experiência sexual, pois ratos manipulados no período neonatal com experiência sexual apresentam o mesmo número de intromissões penianas que os ratos não-manipulados. Os resultados apresentados nessa tese mostraram que a experiência sexual também

reverteu, parcialmente, os efeitos da manipulação neonatal em machos, pois os ratos do grupo manipulação repetida que receberam experiência sexual reconheceram a fêmea receptiva quando comparado à fêmea não-receptiva. Mas, quando a escolha é entre uma fêmea receptiva e um macho sexualmente ativo a experiência sexual não foi eficiente em reverter os efeitos da manipulação neonatal. Em fêmeas, o efeito da experiência sexual sobre o comportamento sexual de ratas manipuladas ainda não foi estudado, entretanto, os resultados apresentados nessa tese mostraram que a preferência sexual não foi alterada pela experiência sexual. Clark *et al.* (2004) já haviam mostrado que a experiência sexual não interfere com a preferência sexual de fêmeas receptivas.

Xiao *et al.* (2004) demonstraram que a preferência sexual em ratos é decisivamente dependente do estado hormonal do indivíduo. Machos sexualmente ativos preferem o odor das fêmeas receptivas ao odor dos machos sexualmente ativos, no entanto, a castração reverte esse efeito, pois os machos castrados (2 semanas após castração) passaram a preferir o odor dos machos sexualmente ativos ao odor das fêmeas receptivas. Porém, se o teste for realizado cinco semanas após a castração, os machos não apresentam mais preferência por nenhum dos dois animais-estímulos (Xiao *et al.* 2004, Edwards & Einhorn 1986). Demonstra-se assim que os esteróides gonadais influenciam o padrão de preferência sexual. Para os autores (Xiao *et al.* 2004) esse padrão de preferência sexual pode ser decorrente de uma sensibilidade diferenciada aos esteróides gonadais, pois após a castração, e com o passar do tempo, os animais passam a apresentar padrões diferentes de preferência sexual. Após cinco semanas de castração resulta em uma ausência de preferência sexual, provavelmente porque a concentração plasmática de andrógenos já esteja muito baixa. Resultados do nosso laboratório mostraram que ratos manipulados apresentam uma tendência à redução da concentração plasmática de testosterona comparado aos ratos não-manipulados (Breigeiron, Lucion e

Sanvitto, *dados não publicados*). Assim, essa ausência de preferência sexual dos ratos do grupo manipulado sem experiência sexual pode ser decorrente dessa alteração hormonal promovida pela manipulação.

Como em machos, o estado hormonal das fêmeas também influencia a preferência sexual. Ratas castradas não apresentam preferência por nenhum dos animais-estímulos, tanto duas quanto cinco semanas após a castração, no entanto, a reposição hormonal (estradiol e progesterona) faz com que as ratas prefiram o odor de machos sexualmente ativos ao odor de fêmeas receptivas ou de machos castrados (Xiao *et al.* 2004, Edwards & Pfeifle 1983). Da mesma forma, ratas em proestro permanecem mais tempo cheirando o macho sexualmente ativo que ratas em diestro (Clark *et al.* 2004). Dados do nosso laboratório mostraram que a manipulação neonatal interfere com a secreção dos hormônios relacionados com a reprodução, pois ratas manipuladas apresentam uma redução da concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e estradiol durante à tarde do proestro comparado a ratas não-manipuladas (Gomes *et al.* 2005). Assim, essa redução do estradiol na tarde do proestro pode influenciar essa ausência de preferência sexual em fêmeas manipuladas.

A manipulação neonatal é capaz de promover alterações morfológicas no SNC, caracterizadas por uma alteração no número de neurônios em diversas áreas do SNC, alterações essas que perduram ao longo da vida do animal (Camozzato 2006, Winkelmann-Duarte 2004, Lucion *et al.* 2003). Algumas dessas alterações promovidas pela manipulação neonatal ocorreram em áreas do SNC que estão envolvidas com a percepção de odores, em especial com a percepção de ferormônios, ou seja, áreas que fazem parte do sistema olfatório acessório como a amígdala medial e a área pré-óptica

medial (APOM; Sánchez-Andrade *et al.* 2005, Stockhorst & Pietrowsky 2004, Brennan & Keverne 1997).

A amígdala medial transmite entradas dos quimiossensores do BO para a APOM, sendo fundamental nos comportamentos de investigação sexual (Wood 1997). Uma grande lesão na amígdala reduz a tendência normal de interação social em ratos, no entanto, esse efeito não é tão aparente em experimentos em que a lesão é em núcleos específicos da amígdala (Baumbach & Sieck 1977). Uma lesão na amígdala medial elimina a preferência sexual em fêmeas (Kondo & Sakuma 2005), porém, não interfere com a preferência sexual em machos (Kondo & Sachs 2002). Isso sugere que a preferência sexual de machos e fêmeas pode ser regulada por substratos neurais diferentes e independentes, pelo menos, no processamento das informações olfatórias na amígdala medial. Resultados do nosso laboratório mostraram que ratas manipuladas apresentam uma redução do número de neurônios da amígdala medial postero-dorsal quando comparado a ratas não-manipuladas (Camozzato 2006). Em machos, esse experimento não foi realizado, no entanto, pode-se supor que uma redução semelhante pode estar ocorrendo. Porém, como provavelmente a amígdala medial tem um papel mais decisivo sobre a preferência sexual em fêmeas, como mostrado pelos experimentos com lesão (Kondo & Sakuma 2005, Kondo & Sachs 2002), essa redução do número de neurônios pode ser uma das causas do efeito da manipulação neonatal ser maior nas fêmeas do que nos machos quanto à preferência sexual.

Está bem estabelecido que a APOM desempenha um papel crucial no controle de comportamentos relacionados à reprodução tanto em machos quanto em fêmeas (Guarraci & Clark 2006, Paredes 2003, Kato & Sakuma 2000, Paredes *et al.* 1998, Wood 1997). Em fêmeas, a lesão da APOM não interfere com a preferência pelo odor do macho sexualmente ativo em um teste de preferência sexual semelhante ao usado

nessa tese, ou seja, onde o indivíduo analisado não entra em contato físico com os animais-estímulos (Guarraci & Clark 2006, Paredes *et al.* 1998). No entanto, quando o teste permite o contato físico entre o indivíduo avaliado e os animais-estímulos, as ratas com lesão da APOM apresentam uma redução na preferência pelo macho sexualmente ativo (Guarraci & Clark 2006). Para Grarraci & Clark (2006) e Yang & Clemens (2000) a lesão da APOM faz com que aumente a sensibilidade à estimulação sexual, como a estimulação vaginocervical promovida pela intromissão peniana, o que faz com que o macho sexualmente ativo se torne aversivo para a fêmea receptiva com lesão na APOM. Assim, a rata com lesão da APOM prefere o macho sexualmente ativo quando não há possibilidade de ocorrer contato físico, mas o repele quando ele pode realizar a monta. Resultados do nosso laboratório mostraram que ratas manipuladas apresentam uma redução no número de neurônios da APOM, comparadas às ratas não-manipuladas (Camozzato 2006). Essa redução do número de neurônios da APOM pode afetar processos reprodutivos da fêmea, como o comportamento sexual, pois ratas manipuladas apresentam uma redução do número de lordoses em resposta à monta do macho (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). Mas, a redução da preferência sexual em fêmeas, mostrada nessa tese, parece não ser devida à diminuição de neurônios na APOM, uma vez que a lesão dessa área não afetou o padrão de preferência sexual em ratas (Guarraci & Clark 2006, Paredes *et al.* 1998).

Já em machos, existe uma grande discussão, na literatura, a respeito de qual o papel específico da APOM na reprodução. Para alguns autores a APOM estaria envolvida com aspectos consumatórios do comportamento sexual (Everitt & Stacey 1987, Hansen *et al.* 1982), já para outros, a APOM estaria envolvida com a motivação sexual (Paredes *et al.* 1993, Lloyd & Dixson 1988). Em machos, ainda não foi realizado um experimento de quantificação do número de neurônios da APOM, no entanto, pode-

se supor que uma redução semelhante a das fêmeas pode estar ocorrendo. Essa modificação do número de neurônios na APOM pode ser a causa da alteração na reprodução, tanto em parâmetros consumatórios (Padoin *et al.* 2001), quanto em parâmetros motivacionais, como os mostrados nessa tese pelo teste de preferência sexual.

Capítulo 4

*Efeito da Manipulação Neonatal Sobre a
Regulação da Secreção de GnRH em
Fêmeas*

INTRODUÇÃO

Reprodução em Fêmeas

Grande parte do conhecimento que possuímos, até o presente, sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos, cuja ovulação é espontânea, é baseado em estudos sobre o ciclo estral das ratas (Freeman 1994). Esse ciclo é composto por quatro fases, que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período (Matthews & Kenyon 1984), exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas que estão associadas às alterações comportamentais. Por exemplo, a noite do proestro é o período no qual a fêmea apresenta o *desejo sexual*, ou seja, ela está pronta para o coito (Gonzalez-Flores & Etgen, 2004, Pfaff *et al.* 1994), o proestro dura de 12 a 14 horas e precede o estro. O estro dura de 25 a 27 horas e é durante esse período, mais precisamente durante a manhã do estro, que ocorre a ovulação. Se não há concepção, após o estro existe um período de recuperação denominado de metaestro cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro que dura de 55 a 57 horas na qual se reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (Freeman 1994).

A ovulação é o evento central do ciclo reprodutivo das fêmeas e requer picos de gonadotrofinas e PRL no período pré-ovulatório. A variação das concentrações dos esteróides gonadais atua como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas. O estradiol (um dos esteróides gonadais) apresenta uma baixa concentração plasmática entre o estro e a manhã do metaestro e começa a

aumentar na tarde dessa fase, alcançando os valores mais altos ao redor do meio dia do proestro, caindo no fim da tarde até atingir os valores basais no início da madrugada do estro. Enquanto que a concentração plasmática de progesterona (outro esteróide gonadal) começa a aumentar quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório do LH, atinge o pico juntamente com ele e retorna os valores basais na manhã do estro. Um segundo pico de progesterona inicia ao meio dia do metaestro, mantendo-se na madrugada do diestro e caindo para valores basais no início da manhã (Gomes *et al.* 2005, Freeman 1994, Smith *et al.* 1975, Butcher *et al.* 1974).

Os padrões de secreção de PRL, LH e FSH são similares durante a maior parte do ciclo estral. As suas concentrações permanecem baixas e não mudam até à tarde e início da noite do proestro. A PRL inicia um aumento no fim da manhã do proestro e alcança valores elevados no fim da tarde da mesma fase e retorna aos valores basais no início da manhã do estro. O pico do LH é similar ao da PRL, no entanto, o primeiro aumento do LH é observado na metade da tarde do proestro, chegando a valores de pico logo em seguida, e retorna aos valores basais no fim da tarde da mesma fase. O FSH apresenta um aumento inicial na sua secreção juntamente com o LH, com retorno as concentrações basais na metade da manhã do estro (Freeman 1994, Smith *et al.* 1975, Butcher *et al.* 1974).

A secreção cíclica do LH e do FSH é resultado de mecanismos de retroalimentação positiva ou negativa dos esteróides gonadais sobre o hipotálamo e hipófise, dependendo da fase do ciclo estral. Durante o estro, metaestro e diestro o estradiol exerce uma retroalimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas. Esse período pode ser comprovado pela remoção dos ovários, a qual promove um aumento das concentrações plasmáticas basais de LH (Tapper *et al.* 1972). Na tarde do proestro, o estradiol passa a exercer a retroalimentação positiva, possibilitando que os

picos de gonadotrofinas ocorram. Esse mecanismo de retroalimentação positivo do estradiol pode ser demonstrado pelos picos diários de LH e PRL que ocorrem em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com estradiol (Neill 1972). Porém, ratas OVX tratadas com estradiol e progesterona têm a descarga de LH adiantada e amplificada (Kalra & Kalra 1983).

O mecanismo pelo qual o estradiol estimula a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ainda não está claro. Não há evidências da expressão dos receptores para estradiol do tipo α (Herbison 1998) ou de receptores para progesterona (Fox *et al.* 1990) em neurônios produtores de GnRH. Porém, Hrabovsky *et al.* (2000) detectaram a expressão de RNAm do receptor β de estradiol em neurônios GnRH, como também a ligação de 125 I-estrógeno nesses neurônios. Dessa forma, grande parte do controle do estradiol sobre a atividade dos neurônios GnRH parece ser exercido por via indireta. Diversos neuromediadores fazem parte desse mecanismo indireto de controle dos neurônios GnRH. Alguns desses neuromediadores são estimulatórios para a secreção de GnRH como a NA (Anselmo-Franci *et al.* 1997), neuropeptídeo Y (Leupen *et al.* 1997) angiotensina II (Dornelles & Franci 1998a) e o óxido nítrico (McCann *et al.* 1999, Bonavera *et al.* 1994) e alguns são inibitórios, como a β -endorfina e a interleucina-1 (McCann *et al.* 2003, 1999, Herbison 1998, Kalra 1993).

Noradrenalina e Reprodução

A inervação noradrenérgica do SNC é bastante difusa e se origina em neurônios localizados no tronco cerebral, ela é formada por dois feixes: o feixe noradrenérgico ascendente ventral, que tem origem nos núcleos A1, A2, A5 e A7, e o feixe noradrenérgico ascendente dorsal, que se origina no A6 também denominado LC (Dahlström *et al.* 1964). Dentre outras áreas, o LC faz projeções para a APOM e para o

núcleo supraquiasmático, regiões que estão envolvidas na regulação da secreção cíclica de hormônios da hipófise anterior (Anselmo-Franci *et al.* 1997, Aston-Jones *et al.* 1995, Jones & Moore 1977). Muitas evidências indicam que essa neurotransmissão noradrenérgica em áreas hipotalâmicas é fundamental para a gênese dos picos pré-ovulatórios das gonadotrofinas, portanto, o sistema noradrenérgico é apontado como um dos mediadores do mecanismo de retroalimentação positiva dos esteróides gonadais sobre a liberação das gonadotrofinas (Herbison 1998).

Entre as evidências estão estudos imunocitoquímicos que demonstram que o estradiol e seus receptores não estão colocalizados nos neurônios GnRH (Herbison *et al.* 1995, Shivers *et al.* 1983). No entanto, os neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral, inclusive LC, apresentam RNAm para ambos (α e β) receptores de estrógeno (Shughrue *et al.* 1997), como também apresentam esteróides gonadais em seus neurônios (Heritage *et al.* 1980). Recentemente, Helena *et al.* (2006) demonstraram que os neurônios do LC expressam tanto receptores para estradiol do tipo α quanto receptores para progesterona e que a suas variações acompanham os eventos hormonais durante o ciclo estral, sendo que os neurônios do LC são muito mais sensíveis à variação das concentrações de estradiol do que os neurônios da APOM. Um indicativo de que os neurônios noradrenérgicos são sensíveis ao estradiol é o fato da expressão de *c-fos* (Jennes *et al.* 1992) e o RNAm para tirosina hidroxilase (Liaw *et al.* 1992) variar conforme varia a concentração de estradiol. Somando-se a isso, os neurônios noradrenérgicos enviam projeções para regiões muito próximas aos neurônios GnRH (Gilter & Barraclough 1988) e esses neurônios GnRH contém receptores adrenérgicos (Hosny & Jennes 1998).

Outra evidência é que a ocorrência do pico de LH na tarde do proestro coincide com um aumento da liberação de NA na APOM (Mohankumar *et al.* 1994) e no hipotálamo médio basal (HMB; ThyagaRajan *et al.* 1995). No entanto, lesão eletrolítica

no LC na manhã do proestro, em ratas ciclando regularmente, diminui o conteúdo de NA na APOM e HMB e bloqueia o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas e com isso a ovulação (Anselmo-Franci *et al.* 1999, 1997). Além disso, a inibição da enzima chave para a síntese de NA, a dopamina- β -hidroxilase, também suprime o pico de LH no proestro (Voogt & Carr 1981). Porém, Helena *et al.* (2002) demonstraram que a NA proveniente do LC não participa como modulador da secreção basal de LH durante o estro, metaestro e diestro, mas sim como um mecanismo para indução do pico pré-ovulatório de LH no proestro. Esses dados contribuem para confirmar a ação indireta do estradiol, via sistema noradrenérgico, na indução da secreção de GnRH e conseqüente ovulação.

Óxido Nítrico e Reprodução

O NO é um neurotransmissor gasoso que é produzido pela oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO, em quantidades iguais. Essa reação é catalisada pela enzima NOS (Maines 1988). A NOS apresenta três isoformas distintas, sendo duas constitutivas, a neuronal (n-NOS) e a endotelial (e-NOS) e uma induzida (i-NOS) encontrada em macrófagos. Apenas as isoformas constitutivas são dependentes de cálcio (Förstermann *et al.* 1994). Em ratos, a n-NOS foi detectada no cerebelo, córtex cerebral, amígdala, hipocampo, LC, hipófise anterior e hipotálamo, sendo seus neurônios chamados de NOérgicos (McCann *et al.* 1999, Brann *et al.* 1997, Bhat *et al.* 1995). No hipotálamo, a n-NOS foi detectada em quantidades elevadas no núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraóptico (SON) e órgão vascular da lâmina terminal (OVTL) e em quantidades moderadas no núcleo pré-óptico mediano (mPN), núcleo ventromedial (VMH) e eminência mediana (ME). A APOM e o núcleo arqueado

apresentam pouca quantidade de n-NOS (Baht *et al.* 1995, Vincent & Kimura 1992, Berdt *et al.* 1991).

A vasta distribuição da NOS pelo eixo hipotálamo-hipófise indica o NO como um possível regulador de funções neuroendócrinas, podendo estar envolvido em funções reprodutivas incluindo: modulação da secreção de GnRH, ovulação, síntese de estradiol, comportamento de lordose e ereção (McCann *et al.* 2003, Ferrini *et al.* 2003, Knauf *et al.* 2001, Bhat *et al.* 1995, Grossman *et al.* 1994, Mani *et al.* 1994, Shukovski & Tsafiriri 1994, Moretto *et al.* 1993).

Segundo Knauf *et al.* (2001), a secreção de NO é pulsátil e sua amplitude de secreção varia de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que no proestro a amplitude de secreção de NO é maior que no estro e diestro, estando sincronizado com a secreção de GnRH. A administração intracerebroventricular de L-NMMA (N-mono-metil-L-arginina), um inibidor da atividade da NOS, bloqueia a secreção pulsátil de LH após 20 minutos, e a concentração de LH diminui após 60 minutos. No entanto, o L-NMMA não altera a secreção pulsátil de FSH, sugerindo que sua secreção não é dependente do NO (Rettori *et al.* 1993). Já a administração intracerebroventricular de L-arginina, o substrato para a produção de NO, amplifica o pico de LH induzido por estradiol em ratas OVX (Bonavera *et al.* 1996), mostrando que variações na produção de NO podem influenciar a secreção de LH e, conseqüentemente, a ovulação.

O VMH é um núcleo muito importante para o desencadeamento do reflexo de lordose, que é um dos principais componentes do comportamento sexual realizado pelas fêmeas (Flanagan-Cato *et al.* 2001, Pfaff & Sakuma 1979, Mathews & Edwards 1977). O estradiol age nesse núcleo promovendo um aumento das concentrações de RNAm de NOS em ratas OVX, o que não foi detectado no PVN e SON, indicando que o estradiol modula a expressão da NOS (Dufourny & Skinner 2002, Ceccatelli 1997, Okamura *et*

al. 1994). Injeções de L-NMMA no terceiro ventrículo, em ratas OVX tratadas com estradiol, inibem o efeito facilitador da progesterona sobre a lordose, o que não ocorre com os animais que receberam salina. Já a administração de *sodium nitroprusside* (SNP), um liberador espontâneo de NO, estimula o comportamento de lordose, mesmo na ausência da progesterona, sugerindo que o NO é capaz de induzir comportamento sexual (Mani *et al.* 1994).

No entanto, os neurônios produtores de GnRH da APOM e OVTL não expressam NOS (Herbison *et al.* 1996, Bhat *et al.* 1995, Grossman *et al.* 1994). Porém, a relação anatômica estreita entre as células imunoreativas a n-NOS e precários GnRH sugere que o NO pode participar do controle da atividade dos neurônios GnRH por uma via transsináptica (Knauf *et al.* 2001, Herbison *et al.* 1996, Bhat *et al.* 1995, Bonavera *et al.* 1993). O NO recrutaria neurônios em uma cascata estimuladora, potenciando os sinais excitatórios para os neurônios GnRH ou aumentando a sensibilidade da adeno-hipófise ao GnRH liberado pela ação do NO (Brann *et al.* 1997).

Interação Entre Noradrenalina e Óxido Nítrico na Secreção de GnRH

Tem sido demonstrado que a NA pode modular os neurônios GnRH via controle do sistema NO. Na tarde do proestro, a NA estimula a secreção de GnRH no HMB *in vitro* via mecanismos dependentes de NO (Selvage & Johnston 2004). Conforme a figura 13, o modelo neural proposto por alguns autores para explicar o mecanismo pelo qual a NA atua sobre neurônios GnRH promovendo sua secreção envolveria 3 neurônios (McCann 1999, Rettori *et al.* 1993). O neurônio NA proveniente do LC, o interneurônio NOérgico e o neurônio GnRH. O neurônio noradrenérgico faz sinapse com o interneurônio NOérgico e com o neurônio GnRH adjacente, via receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos. A ativação desses receptores leva a conversão do inositol fosfato a

inositol trifosfato, que ativa a proteinoquinase C, liberando Ca^{++} (Mani *et al.* 1994). No neurônio NOérgico, esse Ca^{++} interage com a calmodulina e ativa NOS, promovendo a oxidação da L-arginina em NO e L-citrulina. O NO se difunde através do neurônio GnRH e ativa a cicloxigenase por interagir com o grupo heme da enzima (McCann 1999, Rettori *et al.* 1993).

No neurônio GnRH, o aumento do Ca^{++} gerado pela ligação da NA com seu receptor ativa a fosfolipase A_2 que produz ácido araquidônico pela hidrólise de fosfolipídio de membrana. O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina E_2 pela atividade da cicloxigenase. A prostaglandina E_2 ativa adenil ciclase causando um aumento na liberação de AMPc, pela atividade da PKA, levando à exocitose dos grânulos secretores de GnRH no sistema porta-hipofisal (McCann 1999, Rettori *et al.* 1993), resultando num aumento da secreção de GnRH pelo terminal sináptico.

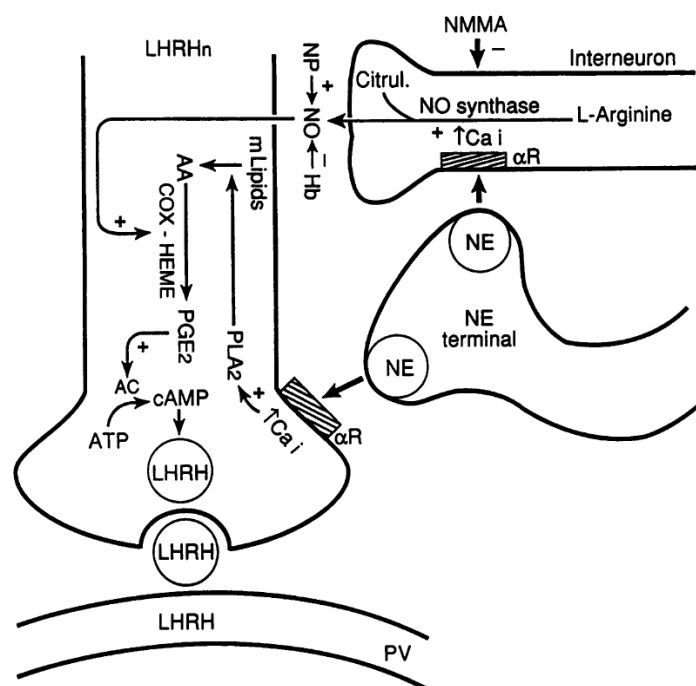


Figura 13. Diagrama esquemático da integração entre o neurônio noradrenérgico, interneurônio NOérgico e o neurônio produtor de GnRH. Abreviaturas: mLipids – fosfolipídio de membrana, AA – ácido araquidônico, COX-HEME – cicloxigenase, AC – adenilato ciclase, NP – nitroprusside, Hb – hemoglobina, citrul – citrulina, Cai – cálcio interno, αR – receptor α 1-adrenérgico, PLA₂ – fosfolipase A_2 , PV – vaso portal, PGE₂ – prostaglandina E_2 (Rettori *et al.* 1993).

Manipulação Neonatal e Reprodução em Fêmeas

Em fêmeas, as alterações causadas pela manipulação neonatal, relacionadas à reprodução, iniciam com a instalação da puberdade, pois ratas manipuladas apresentam um atraso na abertura vaginal quando comparado a ratas não-manipuladas (Gomes 2001, Sieck & Ramaley 1975). Quando adultas, as ratas manipuladas apresentam uma diminuição do comportamento sexual, demonstrado pela redução do quociente de lordose (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). Entretanto, a manipulação neonatal ou a separação maternal não alteram a ritimicidade do ciclo estral das ratas (Rhees *et al.* 2001, Gomes *et al.* 1999), porém, quando em estro as ratas manipuladas apresentam uma drástica redução do número de oócitos (Gomes *et al.* 1999). Além disso, as ratas manipuladas apresentam uma redução da concentração plasmática de progesterona após o coito, progesterona essa que é necessária para a implantação adequada do blastocisto (Gomes *et al.* 2006a).

Resultados obtidos por Gomes *et al.* (2005) demonstram que todas essas alterações promovidas pela manipulação neonatal em fêmeas é acompanhada por alterações endócrinas no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Ratas manipuladas no período neonatal apresentam um aumento do conteúdo de GnRH na APOM no proestro quando comparado às ratas não-manipuladas. Além disso, os picos de LH, FSH, PRL e estradiol da tarde do proestro das ratas manipuladas apresenta-se reduzido. Tanto os ratos machos quanto as fêmeas manipulados no período neonatal apresentam um menor número de neurônios no LC do que ratos não-manipulados (Lucion *et al.* 2003), indicando que a ação estimulatória que o LC exerce sobre os neurônios produtores de GnRH pode estar reduzida, o que condiz com os resultados obtidos por Gomes *et al.* (2005), em especial o que mostra um aumento do conteúdo de GnRH na APOM no

proestro nas ratas manipuladas. Somando-se a essas alterações hormonais, a manipulação neonatal promove uma redução no número de neurônios em áreas envolvidas com a reprodução como APOM, amígdala medial pósterodorsal e no núcleo periventricular anteroventral (Camozzato 2006).

JUSTIFICATIVA

As concentrações plasmáticas dos esteróides gonadais, gonadotrofinas e PRL, presentes durante o ciclo estral, e principalmente na tarde do proestro, são essenciais para uma função reprodutiva normal, qualquer mudança nos processos fisiológicos que as determinam poderia prejudicar a função reprodutiva do indivíduo. Em nosso laboratório tem-se avaliado os efeitos da manipulação neonatal sobre aspectos reprodutivos em fêmeas e demonstrou-se que a manipulação neonatal além de reduzir o comportamento sexual e a ovulação, altera a secreção de todos os hormônios no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em fêmeas (Gomes *et al.* 2006a, 2005, 1999, Padoin *et al.* 2001). O sistema noradrenérgico juntamente com o sistema NOérgico apresentam um papel fundamental na regulação indireta da secreção do GnRH (McCann *et al.* 2003, 1999, Anselmo-Franci *et al.* 1999, 1997, Rettori *et al.* 1993) que vai resultar no pico de LH e conseqüentemente na ovulação. Provavelmente as alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas da rata manipulada deve-se a modificações em sistemas de neurotransmissores que estão envolvidos no mecanismo de regulação indireta da secreção do GnRH.

Objetivo:

Analisar quais os efeitos da manipulação neonatal sobre a produção de NA e NO no hipotálamo e APOM de ratas na tarde do proestro.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo Experimental

Experimento I – Produção de noradrenalina em ratas adultas manipuladas no período neonatal.

Ratas dos grupos não-manipulado e manipulação repetida com pelo menos 3 ciclos estrais regulares foram decapitadas às 16 horas no proestro, os cérebros foram congelados no isopentano em gelo seco e estocados em -70°C. Posteriormente, a APOM e o HMB foram removidos do cérebro pela técnica de *punch* (Palkovits, 1973), homogeneizados e após foram utilizados para quantificação de NA e MHPG por HPLC-ED.

Experimento II – Produção de óxido nítrico em ratas adultas manipuladas no período neonatal.

Ratas dos grupos não-manipulado e manipulação repetida com pelo menos 3 ciclos estrais regulares foram decapitadas às 16 horas no proestro, os cérebros foram congelados no isopentano em gelo seco e estocados em -70°C. Posteriormente, o hipotálamo total foi removido do cérebro pela técnica de *punch* (Palkovits, 1973), homogeneizado e após foi utilizado para quantificação de nitritos e nitratos com a utilização da reação de Griess.

Procedimentos Utilizados

Ciclo Estral

A partir de 80 dias de idade, o ciclo estral foi verificado pelo esfregaço vaginal, que foi coletado diariamente, ao redor das 9 horas da manhã e analisado a fresco em microscópio óptico. Utilizaram-se no experimento somente ratas com 3 ciclos estrais regulares seguidos.

Microdissecção do Tecido Cerebral (*Punch*)

Para retirar os núcleos de interesse para dosagem de NA, MHPG e NO foi utilizado a técnica de *punch* descrita por Palkovits (1973). As coordenadas para localização dos núcleos foram obtidas com o auxílio do atlas para cérebro de ratos Paxinos & Watson (1997). Os cérebros das ratas foram fixados pela parte posterior no criostato e os cortes foram realizados da região anterior para a posterior. A temperatura interna do criostato foi mantida em $-15 \pm -1^{\circ}\text{C}$.

A dosagem de NA e MHPG foi realizada na APOM e no HMB. Para a retirada da APOM se localizou o ponto 0,00 do bregma e se fez um corte de 1000 μm . Dessa fatia foi retirado o *punch* da APOM com o auxílio de uma agulha circular com diâmetro interno de 1,3 mm. As delimitações para a colocação da agulha sobre o corte foram: encostando a agulha no quiasma óptico inferiormente e tendo como linha mediana o terceiro ventrículo. Para a retirada do *punch* do HMB se localizou o ponto -1,32 do bregma e se fez dois cortes consecutivos de 1000 μm . Dessas fatias foram retirados os *punches* do HMB com o auxílio de uma agulha retangular de 2 mm². As delimitações para a colocação da agulha nos cortes foram: encostando na base inferior do cérebro e tendo como linha mediana o terceiro ventrículo.

A dosagem de NO foi realizada no hipotálamo total, para a sua retirada foi localizado o ponto 0,00 do bregma e se fez quatro cortes consecutivos de 1000 μm . Dessas fatias foram retirados os *punches* do hipotálamo total com o auxílio de uma agulha retangular de 2 mm^2 . As delimitações para a colocação da agulha nos cortes foram: encostando na base inferior do cérebro e tendo como linha mediana o terceiro ventrículo.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED)

HPLC-ED foi utilizado para determinar as concentrações de NA e seu metabólito MHPG em amostras da APOM e HMB. Utilizando-se um sonificador os microdissecados da APOM e HMB foram homogeneizados em 150 μL e 400 μL , respectivamente, de solução de ácido perclórico 0,2 M e EDTA 0,1 mM, contendo 90 nM de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA, Aldrich; padrão interno). O homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 12000 g. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm (Millex PVDF, Millipore). No precipitado remanescente foi determinado o conteúdo de proteína pelo método de Bradford (1976). No rato, o MHPG é conjugado a MHPG-sulfato por ação de fenolsulfatotransferases (Flods e Meek, 1974). O MHPG-sulfato não é eletroquimicamente ativo, portanto, os sobrenadantes foram hidrolisados a 95°C por 5 minutos para a obtenção de MHPG livre, como previamente descrito (Lookingland *et al.*, 1991). Posteriormente, 30 μL de cada amostra da APOM e 20 μL de cada amostra do HMH foram injetados no HPLC por um injetor automático (SIL-10Aadvp; Shimadzu). A separação foi realizada em coluna de fase reversa C 18 (Purospher Star, 5 μm , 250 X 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher, 5 μm , 4 X 4 mm; Merck) a 35°C. A fase móvel era constituída de

NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,25 mM, metanol 16 % e pH de 3,5, ajustado com H₃PO₄. O fluxo utilizado foi 0,6 mL/min e o potencial de oxidação, 0,65 V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 *electrochemical flow cell*; Antec Leyden). Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o programa Class-VP (Shimadzu). NA e MHPG foram identificados de acordo com os respectivos tempos de eluição de seus picos e a quantificação foi feita pelo método de padrão interno (DHBA), utilizando-se a área dos picos como referência.

Determinação de Nitritos e Nitratos

Para dosagem de NO_x no hipotálamo total das ratas foi feito um homogeneizado dos microdissecados de duas ratas em tampão fosfato-salina (pH 7,4). A concentração de NO_x no homogeneizado foi medida pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger *et al.* (1999). Alíquotas de 50 µL das amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos (10 µL de NADPH 0,02 mM, 7 µL de Tris 1M pH 7,5, 23 µL de uma mistura de Glicose 6-fosfato 5 mM/Glicose 6-fosfato desidrogenase 10U/mL) e 10 µL de nitrato redutase 1 U/mL por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação, para conversão de nitrato em nitrito. Após foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftiletilendiamina, 2,3mL de ácido ortofosfórico 85% e 97,7mL de água destilada) e a reação foi incubada novamente a temperatura ambiente sob agitação por mais 10 minutos. Posteriormente a absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm no ELISA. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrito de sódio 1 mM.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (EPM), e o nível crítico fixado foi de 5% ($p \leq 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

A comparação entre os grupos para os conteúdos de NA, MHPG e a razão MHPG/NA na APOM e HMB e NOx no hipotálamo total em ratas adultas no proestro foi realizada utilizando o teste *t* de *Student*.

RESULTADOS

Experimento I – Produção de noradrenalina em ratas adultas manipuladas no período neonatal.

A figura 14 mostra o conteúdo de NA e MHPG bem como a razão de MHPG/NA na APOM e HMB de ratas na tarde do proestro que foram manipuladas no período neonatal. Não foi observado diferenças significativas entre as ratas dos grupos não-manipulado e manipulação repetida quanto ao conteúdo de NA (figura 14A) na tarde do proestro tanto no HMB [$t_{(16)}=0,89$; $p=0,39$] quanto na APOM [$t_{(17)}=0,20$; $p=0,84$]. Também não foi observado diferença significativa entre os grupos não-manipulado e manipulação repetida quanto ao conteúdo de MHPG (figura 14B) no HMB [$t_{(16)}=0,28$; $p=0,78$], no entanto, o conteúdo de MHPG da APOM das ratas do grupo manipulação repetida apresenta-se reduzido quando comparado ao grupo não-manipulado, não sendo uma redução estatisticamente diferente [$t_{(17)}=1,94$; $p=0,07$]. Da mesma forma, não foi observada diferença entre os grupos não-manipulado e manipulação repetida quanto a razão MHPG/NA (figura 14C) no HMB [$t_{(16)}=0,20$; $p=0,84$], no entanto, a razão MHPG/NA na APOM das ratas do grupo manipulação repetida apresenta uma tendência à redução comparada ao grupo não-manipulado [$t_{(17)}=1,86$; $p=0,08$].

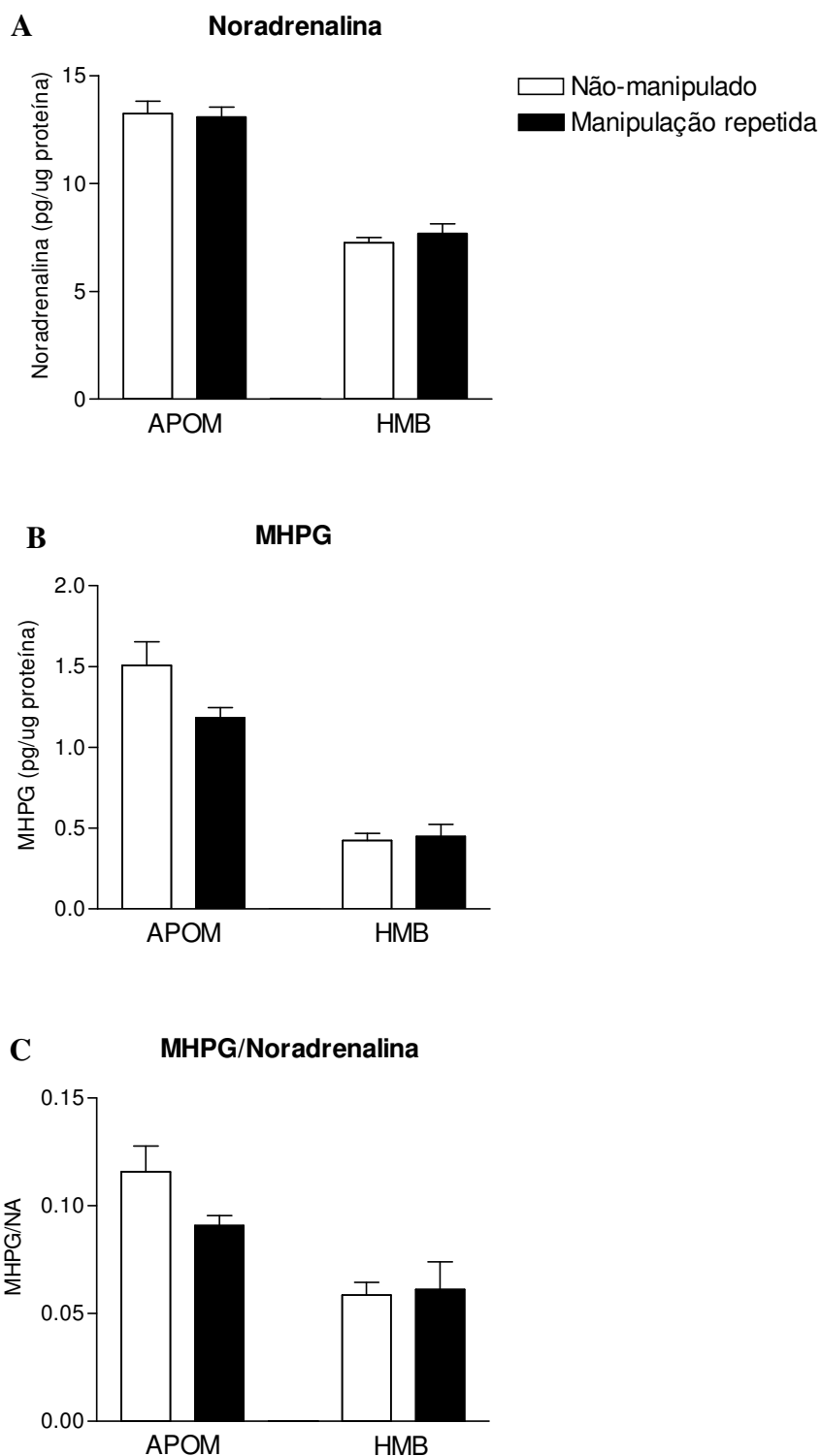


Figura 14. Conteúdo de NA (A) e MHPG (B) e taxa de MHPG/NA (C) na APOM e HMB de ratas na tarde do proestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de Student. Para APOM: grupo não-manipulado $n = 10$, grupo manipulação repetida $n = 9$. Para HMB: grupo não-manipulado $n = 10$, grupo manipulação repetida $n = 8$.

Experimento II – Produção de óxido nítrico em ratas adultas manipuladas no período neonatal.

A figura 15 mostra o conteúdo de óxido nítrico (NO_x) no hipotálamo total na tarde do proestro de ratas manipuladas no período neonatal. As ratas do grupo manipulação repetida apresentam uma redução estatisticamente significante no conteúdo de NO_x no hipotálamo total quando comparadas às ratas do grupo não-manipulado [$t_{(15)}=2,96$; $p<0,01$].

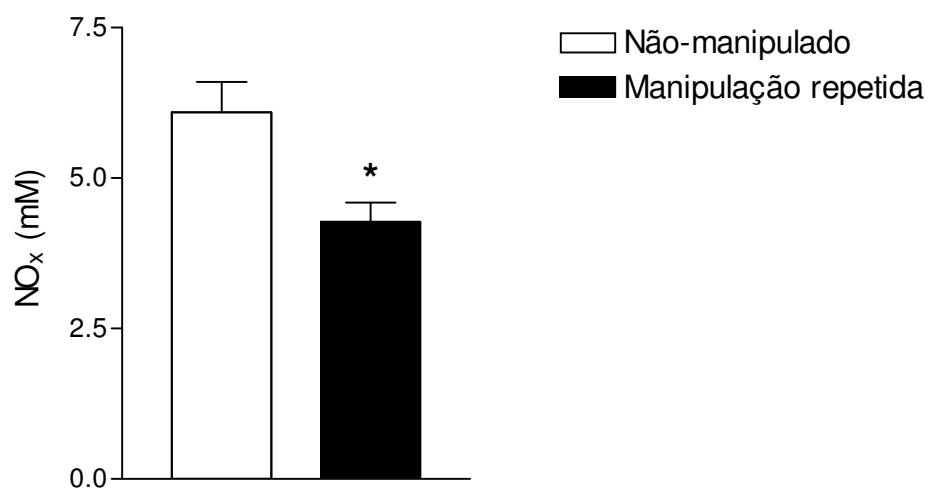


Figura 15. Conteúdo de NO_x no hipotálamo total de ratas na tarde do proestro. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando teste *t* de *Student*. * $p<0,01$ quando comparado ao grupo não-manipulado. Para o grupo não-manipulado $n = 9$ e para o grupo manipulação repetida $n = 8$.

DISCUSSÃO

A motivação sexual é o primeiro passo para o desenvolvimento do comportamento sexual, sendo que o teste de preferência sexual reflete a motivação sexual. Os resultados dessa tese mostraram que a manipulação altera o padrão de preferência sexual em machos e fêmeas, induzindo a um não reconhecimento do parceiro sexual, sendo as fêmeas mais afetadas que os machos. Além da motivação sexual, dados do nosso laboratório mostraram que a manipulação neonatal pode afetar outros processos reprodutivos, pois tanto machos quanto fêmeas manipulados no período neonatal apresentam uma redução do comportamento sexual (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001). A manipulação neonatal também afeta a produção de gametas, pois em fêmeas ocorre uma drástica redução na ovulação (Gomes *et al.* 2005, 1999) e em machos a produção de espermatozoides está comprometida (Mazaro & Lamano-Carvalho 2006). Além disso, a manipulação neonatal promove uma redução na concentração plasmática de gonadotrofinas e estradiol na tarde do proestro.

Está bem estabelecido que, em ratas, a indução da ovulação e a liberação de gonadotrofinas e PRL no período pré-ovulatório depende do mecanismo de retroalimentação positiva exercido pelos esteróides gonadais (Freeman 1994). A NA proveniente do LC liberada na APOM e HMB age como um mediador das ações estimulatórias do estradiol (Anselmo-Franci *et al.* 1997, Herbison 1998). A participação da NA tem sido demonstrada por lesão do LC na manhã do proestro que atua diminuindo o conteúdo dessa na APOM, bloqueando o pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação (Anselmo-Franci *et al.* 1997). A administração de

antagonistas do receptor α -adrenérgico também impede a ocorrência do pico de LH (Herbison 1998).

Ratas manipuladas no período neonatal apresentam uma redução da concentração plasmática de estradiol na tarde do proestro comparadas às ratas não-manipuladas (Gomes *et al.* 2005), o que poderia estar reduzindo a ação estimulatória do estradiol sobre os neurônios do LC. Além disso, a manipulação neonatal reduz o número de neurônios do LC (Lucion *et al.* 2003). Assim, nossa hipótese era que a redução da concentração de estradiol na tarde do proestro associado à diminuição do número de neurônios no LC poderia induzir uma diminuição da produção de NA pelos neurônios do LC. Isso poderia explicar as alterações reprodutivas nas ratas manipuladas, em especial o aumento do conteúdo de GnRH na APOM na tarde do proestro nas ratas manipuladas (Gomes *et al.* 2005). No entanto, os resultados apresentados nessa tese mostraram que o conteúdo de NA na APOM e no HMB às 16 horas da tarde no proestro não está alterada nas ratas manipuladas. Porém, houve uma redução não significativa no conteúdo de MHPG como também uma redução não significativa na razão MHPG/NA nas ratas manipuladas comparado a ratas não-manipuladas, indicando que o sistema noradrenérgico das ratas manipuladas pode estar alterado. Dessa forma, é necessário fazer uma avaliação mais detalhada desse sistema, uma vez que os resultados apresentados nessa tese mostram uma dosagem de NA e MHPG apenas num horário na tarde do proestro.

Há dados na literatura demonstrando que a manipulação neonatal é capaz de alterar a neurotransmissão noradrenérgica. Segundo Liu *et al.* (2000a), a manipulação neonatal aumenta a expressão do autoreceptor α_2 -adrenérgicos inibitórios no LC e no núcleo do trato solitário em machos. Sabe-se também que essa intervenção no período neonatal reduz a afinidade dos receptores β -adrenérgicos no córtex, cerebelo e

hipocampo em ratos com 1 mês de idade (Baamonde *et al.* 1999). Porém, essa alteração não se mantém após os 60 dias de idade (Baamonde *et al.* 1999, Hilakivi-Clarke *et al.* 1991). Há evidências que a manipulação neonatal altera a eficácia da sinalização noradrenérgica no córtex, cerebelo e hipocampo, pois os ratos manipulados apresentam uma redução no acúmulo de AMPc em resposta à estimulação dos neurônios noradrenérgicos (Baamonde *et al.* 2002). Todas essas alterações no sistema noradrenérgico estão de acordo com Liu *et al.* (2000a), que diz que eventos no início da vida do indivíduo podem influenciar a diferenciação dos neurônios noradrenérgicos centrais, diminuindo suas respostas quando adulto.

A NA age nos neurônios noradrenérgicos através dos receptores α 1-adrenérgicos promovendo a ativação da NOS, levando a um aumento da produção de NO, que se difunde até o neurônio GnRH, promovendo a liberação de GnRH (Selvage & Johnston 2004, McCann *et al.* 2003, 1999, Rettori *et al.* 1993). Resultados apresentados nessa tese mostraram que a produção de NO nas ratas manipuladas no período neonatal está reduzido na tarde do proestro comparado às ratas não-manipuladas. Essa redução é uma provável causa do aumento do conteúdo de GnRH na APOM das ratas manipuladas (Gomes *et al.* 2005). O NO, no controle da secreção de GnRH, pode ser estimulado por vários outros neuromoduladores além da NA, como a ocitocina (Chiodera *et al.* 2003, Rettori *et al.* 1997), serotonina (Gouveia & Franci 2004), leptina (Watanobe & Schiöth 2001) e neuropeptídeo Y (Bonavera *et al.* 1996). A regulação da secreção de GnRH pelo NO é um sistema complexo que depende de vários fatores, assim qualquer um daqueles neuromoduladores, que pode estar sendo alterado pela manipulação neonatal, pode promover redução na produção de NO.

Também não se pode descartar a possibilidade de outros sistemas de neurotransmissores estarem sendo modificados pela manipulação neonatal. Um destes

sistemas é o angiotensinérgico central. De fato, a angiotensina II atua na APOM promovendo a liberação de GnRH (Dornelles & Franci 1998a, Franci *et al.* 1990). Gomes *et al.* (2006b) mostraram que a manipulação neonatal reduz a densidade de receptores para angiotensina II na APOM em ratas na tarde do proestro. Portanto, essa redução pode contribuir para as alterações reprodutivas promovidas pela manipulação neonatal. Entretanto, é necessário ressaltar que os efeitos da angiotensina II na APOM sobre a secreção de LH são mediados pelos receptores α -adrenérgicos (Dornelles & Franci 1998b), indicando que o sistema noradrenérgico é fundamental para a ação do sistema angiotensinérgico central.

Uma alternativa para explicar a redução da produção de NO na tarde do proestro induzida pela manipulação neonatal, mostrada nessa tese, é uma provável redução da expressão da NOS. O estradiol controla a expressão da NOS, em especial no VMH (Dufourny & Skinner 2002, Ceccatelli 1997, Okamura *et al.* 1994), núcleo muito importante para a realização do comportamento sexual em fêmeas (Flanagan-Cato *et al.* 2001, Pfaff & Sakuma 1979, Mathews & Edwards 1977). Sendo assim, a redução da concentração plasmática de estradiol na tarde do proestro nas ratas manipuladas (Gomes *et al.* 2005), mesmo momento em que está ocorrendo a redução na produção de NO, pode ser determinante para induzir uma expressão reduzida de NOS. Essa provável redução da expressão da NOS pode influenciar a redução do comportamento sexual em ratas manipuladas no período neonatal (Gomes *et al.* 2006a, Padoin *et al.* 2001), pois para Mani *et al.* (1994) o NO participa da regulação da secreção de GnRH que tem um papel fundamental na mediação do comportamento sexual em fêmeas.

Capítulo 5

Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

A manipulação neonatal repetida interfere com o aprendizado olfatório dos filhotes, impedindo o reconhecimento do odor maternal. Esse efeito da manipulação neonatal é dependente de sexo, pois apenas as fêmeas foram afetadas. Assim, a influência da manipulação neonatal sobre o aprendizado olfatório não explica totalmente os efeitos de longa duração da manipulação, porque só ocorre com as fêmeas.

A via NA/CREB, fundamental para o aprendizado olfatório, foi afetada pela manipulação neonatal em fêmeas, sendo a provável causa da ausência do reconhecimento do odor maternal.

A produção de NO no BO de fêmeas aos 7 dias após o nascimento não foi alterada pela manipulação repetida, não sendo, portanto, a causa da ausência do reconhecimento do odor maternal.

A manipulação neonatal repetida reduz a motivação sexual tanto em machos quanto em fêmeas, evidenciado pelo teste de preferência sexual, no qual os animais do grupo manipulação repetida demonstram claramente a ausência de preferência pelo parceiro sexual.

O efeito da manipulação neonatal sobre a ausência de motivação sexual, é dependente de sexo. Em machos, esse efeito é facilmente reversível, pois uma única sessão de interação social, como a experiência sexual, foi capaz de reverter esse efeito,

quando a escolha é entre uma fêmea receptiva e uma fêmea não-receptiva. Já em fêmeas, a experiência sexual não alterou a ausência de motivação sexual das ratas do grupo manipulação repetida em nenhum teste realizado.

Tanto na preferência pelo odor maternal quanto na preferência sexual, os efeitos da manipulação neonatal só foram observados em animais do grupo manipulação repetida, demonstrado assim, que a repetição do estímulo de manipulação neonatal é necessária para induzir seus efeitos.

O conteúdo de NA e MHPG na APOM e HMB das ratas do grupo manipulação repetida não está alterado às 16 horas no proestro comparado as ratas do grupo não-manipulado, no entanto, novos estudos serão necessários para se avaliar com mais detalhes a participação do sistema noradrenérgico na regulação da secreção de GnRH das ratas manipuladas.

O conteúdo de NO no hipotálamo das ratas do grupo manipulação repetida está reduzido na tarde do proestro, podendo ser uma das prováveis causas do aumento do conteúdo de GnRH na APOM da rata manipulada no período neonatal, resultando na redução do pico de LH na tarde do proestro e, conseqüentemente, na redução da ovulação, pois essa diminuição do conteúdo de NO pode reduzir seus efeitos estimulatórios sobre os neurônios GnRH.

Capítulo 6

Perspectivas

Complementando resultados apresentados nessa tese seria importante verificar a participação da via noradrenalina/CREB no aprendizado olfatório em filhotes machos manipulados no período neonatal, uma vez que os resultados quanto à preferência pelo odor maternal foram diferentes entre machos e fêmeas.

Dando continuidade ao estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre o aprendizado olfatório seria pertinente uma abordagem que estudasse mais detalhadamente o sistema noradrenérgico do filhote manipulado, desse modo, inicialmente duas questões deve ser esclarecidas:

- 1) *Quais os efeitos da manipulação neonatal sobre a densidade de receptores $\beta 1$ - e $\alpha 1$ - adrenérgicos no bulbo olfatório em ratos machos e fêmeas?*
- 2) *Quais os efeitos da manipulação neonatal sobre o conteúdo de tirosina hidroxilase total e fosforilada na serina 40 no bulbo olfatório?*

Uma outra questão a ser esclarecida, referente ao aprendizado olfatório e manipulação neonatal é se essa dificuldade no aprendizado olfatório do animal manipulado é específica para o odor maternal ou se ela é generalizada, impedindo o animal de aprender a reconhecer outros odores, desse modo dois experimentos foram propostos:

- 1) *Quais os efeitos da manipulação neonatal sobre a capacidade que o filhote tem de aprender a ter preferência por um novo odor, pareando esse odor com a manipulação neonatal?*
- 2) *Quais os efeitos da manipulação neonatal sobre a capacidade que o filhote tem de aprender a ter preferência por um novo odor, pareado esse odor com um estímulo tátil (pincel)?*

Dando continuidade ao estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre a percepção dos odores do parceiro sexual seria pertinente uma abordagem que estudasse a ativação de áreas do SNC que estão envolvidas com a percepção de odores, em especial com a percepção de ferormônios, ou seja, áreas que fazem parte do sistema olfatório acessório como a amígdala medial e a área pré-óptica medial.

1) Quais os efeitos da manipulação neonatal sobre a expressão de c-FOS no bulbo olfatório, amígdala medial e área pré-óptica medial após a exposição ao odor do parceiro sexual?

Quanto aos efeitos da manipulação sobre o sistema NOérgico no controle da secreção de GnRH nas ratas manipuladas no período neonatal seria pertinente uma abordagem que estudasse a expressão na NOS no hipotálamo ventromedial e na área pré-óptica medial.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

1. Anand KJS, Scalzo FM. Can adverse neonatal experience alter brain development and subsequent behavior? *Biology of the Neonate*, 77: 69-82, 2000.
2. Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research*, 767: 289-296, 1997.
3. Anselmo-Franci JA, Rocha-Barros VM, Franci CR, McCann SM. Locus coeruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Brain Research*, 833: 86-92, 1999.
4. Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G (Editor), *The rat nervous system*, Academic Press: San Diego, 183-213, 1995.
5. Auger AP, Hexter DP, McCarty MM. Sex difference in the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in neonate rat brain. *Brain Research*, 890: 110-117, 2001.
6. Avitsur R, Yirmiya R. The partner preference paradigm: a method to study sexual motivation and performance of female rats. *Brain Research Protocol*, 3: 320-325, 1999.
7. Baamonde C, Lumbreras MA, Martínez-Cué C, Vallina IF, Flórez J, Dierssen M. Postnatal handling induces long-term modifications in central β -noradrenergic signaling in rats. *Stress*, 5: 137-146, 2002.
8. Baamonde C, Lumbreras MA, Martínez-Cué C, Vallina IF, García-Calatayud S, Flórez J, Dierssen M. Short-term effects of postnatal manipulation on central β -adrenergic transmission. *Stress*, 3: 147-162, 1999.
9. Baht GK, Mahesh VB, Lanar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW. Histochemical localization of nitric oxide neurons in hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-nethyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology*, 62: 187-197, 1995.
10. Baratti CM, Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65: 197-201, 1996.
11. Bateson P. Early experience and sexual preferences. In: Hutchison JB (Editor), *Biological determinants of sexual behavior*, Wiley: Chichester, 29-53, 1978.
12. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430: 419-421, 2004.

13. Baumbach HD, Sieck MH. Temporal effects of discrete lesions in the olfactory and limbic systems on open-field behavior and dyadic encounters in male hooded rats. *Physiology & Behavior*, 18: 617-637, 1977.
14. Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutsmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90: 9191-9194, 1993.
15. Bohn MC. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience*, 5: 2003-2012, 1980.
16. Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP. L-arginina/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology*, 137: 1956-1961, 1996.
17. Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges. *Brain Research*, 660: 175-179, 1994.
18. Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing-hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology*, 133: 2481-2487, 1993.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
20. Brann, DW, Baht GK, Lanar CA, Mahesh VB. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 65: 385-395, 1997.
21. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TA, Snyder DH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7: 615-624, 1991.
22. Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 18: 2903-2909, 2003.
23. Brennan PA, Keverne EB. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology*, 51: 457-481, 1997.
24. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94: 704-708, 1974.
25. Cameron NM, Champagne FA, Parent C, Fish EW, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. The programming of individual differences in defensive responses and

- reproductive strategies in the rat though variations in maternal care. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 29: 843-865, 2005.
26. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Ardenghi P, Paratcha G, Stein MV, Izquierdo I, Medina JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Molecular Brain Research*, 76: 36-46, 2000.
 27. Camozzato TSC. Alterações morfológicas na área pré-óptica medial, núcleo periventricular anteroventricular e amígdala medial postero-dorsal induzidas pela manipulação neonatal. *Dissertação de Mestrado (Fisiologia)*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
 28. Carlson M, Earls F. Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania. *Annual New York Academy of Sciences*, 807: 419-428, 1997.
 29. Ceccatelli S. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. *Brain Research Bulletin*, 44: 533-538, 1997.
 30. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79: 359-371, 2003.
 31. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response 1. *Annual Review of Physiology*, 67: 259-284, 2005.
 32. Chiodera P, Volpi R, Manfredi G, Bortesi ML, Capretti L, Magotti MG, Saccanijotti G, Coiro V. Effects of oxytocin on nitric oxide activity controlling gonadotropin secretion in humans. *European Journal of Clinical Investigation*, 33: 402-405, 2003.
 33. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders - Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267: 1244-1252, 1992.
 34. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Annals of Internal Medicine*, 129: 229-240, 1998.
 35. Clark AS, Kelton MC, Guarraci FA, Clyons EQ. Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Hormones and Behavior*, 45: 314-323, 2004.
 36. Dahlström A, Fuxe K, Olson I, Ungerstedt U. Ascending systems of catecholamine neurons from the lower brain stem. *Acta Physiologica Scandinavica*, 62: 485-486, 1964.

37. Denenberg VH. Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effects in infancy? *Developmental Psychobiology*, 34: 1-3, 1999.
38. Denenberg VH. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation. *Psychological Review*, 71: 335-351, 1964.
39. Dent GW, Smith MA, Levine S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology*, 141: 1593-1598, 2000.
40. Dent GW, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Developmental Brain Research*, 127: 23-30, 2001.
41. Don J, Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 115-124, 2002.
42. Dornelles RCM, Franci CR. Action of AT1 subtype Angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides*, 32: 51-55, 1998a.
43. Dornelles RCM, Franci CR. Alpha- but not beta-adrenergic receptors mediate the effects of angiotensin II in the medial preoptic area on gonadotropin and prolactin secretion. *European Journal of Endocrinology*, 138: 583-586, 1998b.
44. Dufourny L, Skinner DC. Influence of estradiol in NADPH diaphorase/neuronal nitric oxide synthase activity and colocalization with progesterone or type II glucocorticoid receptors in ovine hypothalamus. *Biology of Reproduction*, 67: 829-836, 2002.
45. Edwards DA, Einhorn LC. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiology & Behavior*, 37: 329-335, 1986.
46. Edwards DA, Pfeifle JK. Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiology & Behavior*, 30: 437-443, 1983.
47. Edwards DA, Griffis KT, Tardivel C. Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner-preference in male rats. *Physiology & Behavior*, 48: 447-450, 1990.
48. Edwards DA, Walter B, Liang P. Hypothalamic and olfactory control of sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiology & Behavior*, 60: 1347-1354, 1996.
49. Erkin MS, Geller E, Yuwiler A. Effects of neonatal hydrocortisone treatment on pituitary and adrenocortical responses to stress in young rats. *Neuroendocrinology*, 29: 191-199, 1979.

50. Everitt BJ, Stacey P. Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II Effects of preoptic area lesions, castration, and testosterone. *Journal of Comparative Physiology*, 101: 407-419, 1987.
51. Fabricius E. Interspecific mate choice following cross-fostering in a mixed colony of Greylag geese (*Aanser anser*) and Canada geese (*Branta canadensis*): a study on developmental and persistence of species preferences. *Ethology*, 88: 287-296, 1991.
52. Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K. Infantile (handling) stimulation and behavior in Young roman high- and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 50: 563-565, 1991.
53. Ferrini MG, Magee TR, Vernet D, Rajfer J, González-Cadavid NF. Penile neuronal nitric oxide synthase and its regulatory proteins are present in hypothalamic and spinal cord regions involved in the control of penile erection. *Journal of Comparative Neurology*, 458: 46-60, 2003.
54. Field T. Early interventions for infants of depressed mothers. *Pediatrics*, 102: 1305-1310, 1998.
55. Fillion TJ, Blass EM. Infantile experience with sucking odors determines adult sexual behavior in male rats. *Science*, 231: 729-731, 1986.
56. Fin C, Cunha C, Bromberg E, Schmitz PK, Bianchin M, Medina JH, Izquierdo I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63: 113-115, 1995.
57. Flanagan-Cato LM, Calizo LH, Daniels D. The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Hormones and Behavior*, 40: 178-182, 2001.
58. Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 673-685, 1999.
59. Flodes A, Meek JL. Occurrence and localization of brain phenolsulfotransferase. *Journal of Neurochemistry*, 23: 303-307, 1974.
60. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric-oxide synthase isozymes – characterization, purification, molecular-cloning, and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131, 1994.
61. Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*, 51: 276-283, 1990.

62. Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 899-901, 1990.
63. Francis DD, Diorio J, Laplante P, Weaver S, Seckl JR, Meaney MJ. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. *Annual New York Academy of Sciences*, 745: 136-152, 1994.
64. Francis DD, Young LJ, Meaney MJ, Insel TR. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. *Journal of Neuroendocrinology*, 14: 349-353, 2002.
65. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E & Neill J (Editores), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 613-647, 1994.
66. Gilter MS, Barraclough CA. Identification of the hypothalamic site through which locus coeruleus axons decussate to reach and stimulate contralateral LH-RH neurons. *Brain Research*, 447: 205-214, 1988.
67. Gomes CM. Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. *Dissertação de Mestrado (Neurociências)*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
68. Gomes CM, Donadio MVF, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto GL. Neonatal handling induces alteration in progesterone secretion after sexual behavior but not in angiotensin II receptor density in the medial amygdala: implication for reproductive success. *Life Science*, 78: 2867-2871, 2006a.
69. Gomes CM, Donadio MVF, Franskoviaki I, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto GL. Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. *Brain Research*, 1067: 177-180, 2006b.
70. Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 1239-1242, 1999.
71. Gomes CM, Rainecki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology*, 184: 435-445, 2005.

72. González-Flores O, Etgen AM. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Hormones and Behavior*, 45: 50-57, 2004.
73. Gouveia EM, Franci CR. Involvement of serotonin 5HT₁ and 5HT₂ receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. *Brain Research Bulletin*, 63: 243-251, 2004.
74. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, 301: 49-61, 1999.
75. Grino M, Young WS, Burgunder JM. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in the rat. *Endocrinology*, 124: 60-68, 1989.
76. Grossman AB, Rossmannith WG, Kabigting EB, Cadd G, Clifton D, Steiner RA. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Journal of Endocrinology*, 140: R5-R8, 1994.
77. Guarraci FA, Clark AS. Ibotenic acid lesions in the medial preoptic area disrupt the expression of partner preference in sexually receptive female rats. *Brain Research*, 1076: 163-170, 2006.
78. Gunnar MR, Gonzalez CA, Goodlin BL, Levine S. Behavioral and pituitary-adrenal responses during a prolonged separation period in infant rhesus monkeys. *Psychoendocrinology*, 6: 64-75, 1981.
79. Guzowski JF, McGaugh JL. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 2693-2698, 1997.
80. Hansen S, Köhler CH, Goldstein M, Steinbusch HV. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in male rat. *Brain Research*, 239: 213-232, 1982.
81. Harley CW, Darby-King A, McCann J, McLean JH. β 1-adrenoceptor or α 1-adrenoceptor activation initiates early preference learning in rat pups: support for the mitral cell/cAMP model of odor preference learning. *Learning & Memory*, 13: 8-13, 2006.
82. Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25: 1-35, 2000.

83. Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. Persistent changes in corticotropin-releasing factor system due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology Bulletin*, 33: 185-192, 1997.
84. Helena CVV, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Research*, 955: 245-252, 2002.
85. Helena CVV, Poletini MO, Sanvitto GL, Hayashi S, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Changes in α -estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 188: 155-165, 2006.
86. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews*, 19: 302-330, 1998.
87. Herbison AE, Horvath TL, Naftolin F, Leranth C. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology*, 61: 1-10, 1995.
88. Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC. Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 8: 73-82, 1996.
89. Heritage AS, Stumpf WE, Sar M, Grant LD. Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. *Science*, 207: 1377-1379, 1980.
90. Hess JL, Denenberg VH, Zarrow MX, Pfeifer WD. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. *Physiology & Behavior*, 4: 109-111, 1969.
91. Hilakivi-Clarke LA, Turkka J, Lister RG, Linnoila M. Effects of early postnatal handling on brain β -adrenoceptors and behavior in tests related to stress. *Brain Research*, 542: 286-292, 1991.
92. Holy TE. Wake up and smell conspecific! *Trends in Neurosciences*, 26: 463-465, 2003.
93. Hosny S, Jennes L. Identification of alpha 1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurons of the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 10: 687-692, 1998.
94. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and 125 I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-

- releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*, 141: 3506-3509, 2000.
95. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236, 1995.
 96. Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: 129-136, 2001.
 97. Jennes L, Jennes ME, Purvis C, Nees M. *c-fos* expression in noradrenergic A₂ neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Research*, 586: 171-175, 1992.
 98. Jones BE, Moore RY. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. Autoradiographic study. *Brain Research*, 127: 289-296, 1977.
 99. Kalra SP. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Reviews*, 14: 507-538, 1993.
 100. Kalra SP, Kalra PS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Reviews*, 4: 311-351, 1983.
 101. Kato A, Sakuma Y. Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behavior. *Brain Research*, 862: 90-102, 2000.
 102. Kaufman J. Depressive disorders in maltreated children. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 30: 257-265, 1991.
 103. Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. Effects of early experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biological Psychiatry*, 48: 778-790, 2000.
 104. Kasamatsu T, Pettigrew JD, Ary M. Restoration of visual cortical plasticity by local microperfusion of norepinephrine. *The Journal of Comparative Neurology*, 185: 163-182, 1979.
 105. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, Ohkura S. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*, 388: 670-674, 1997.
 106. Kendrick KM, Haupt MA, Hinton MR, Broad KD, Skinner JD. Sex differences in the influence of mothers on the sociosexual preferences of their offspring. *Hormones and Behavior*, 40: 322-338, 2001.

107. Kendrick KM, Hinton MR, Atkins K, Haupt MA, Skinner JD. Mothers determine sexual preferences. *Nature*, 395: 229-230, 1998.
108. Keverne EB. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & Behavior*, 83: 177-187, 2004.
109. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D. Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology*, 142: 2343-2350, 2001.
110. Kondo Y, Sachs BD. Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiology & Behavior*, 76: 443-447, 2002.
111. Kondo Y, Sakuma Y. The medial amygdala controls the coital access of female rats: a possible involvement of emotional responsiveness. *Japanese Journal of Physiology*, 55: 345-353, 2005.
112. Kraener GW, Ebert MH, Schmit DE, McKinney WT. A longitudinal study of the effects of different social conditions on cerebrospinal fluid norepinephrine and amine biogenic metabolites in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 2: 175-189, 1989.
113. Kuhn CM, Schanberg SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16: 261-270, 1998.
114. Lamprecht R. CREB: a message to remember. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 554-563, 1999.
115. Langdon PE, Harley CW, McLean JH. Increased β adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. *Developmental Brain Research*, 102: 291-293, 1997.
116. Leon M. Catecholaminergic contributions to early learning. *Advances in Pharmacology*, 42: 961-964, 1998.
117. Leon M. Dietary control of maternal pheromone in the lactating rat. *Physiology & Behavior*, 14: 311-319, 1975.
118. Leon M. Maternal pheromone. *Physiology & Behavior*, 13: 441-453, 1974.
119. Leon M. Neuroethology of olfactory preference development. *Journal of Neurobiology*, 23: 1557-1573, 1992.
120. Leupen SM, Besecke LM, Levine JE. Neuropeptide Y Y1-receptor stimulation is required for physiological amplification of preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*, 138: 2735-2739, 1997.

121. Levine S. Developmental determinates of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30: 939-946, 2005.
122. Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73: 255-260, 2001.
123. Levine S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*, 135: 795-799, 1962.
124. Levine S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research*, 4: 557-564, 2002.
125. Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746: 275-293, 1994.
126. Levine S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697: 61-69, 1993.
127. Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior*, 2: 55-59, 1967.
128. Lévy F, Keller M, Poindron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior*, 46: 284-302, 2004.
129. Liaw JJ, He JR, Hartman RD, Barraclough CA. Changes in tyrosine hydroxylase mRNA levels in medullary A1 and A2 neurons and locus coeruleus following castration and estrogen replacement in rats. *Molecular Brain Research*, 13: 231-238, 1992.
130. Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12: 5-12, 2000a.
131. Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, 3: 799-806, 2000b.
132. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis DD, Freeman A, Sharma S, Peardon D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277: 1659-1662, 1997.
133. Lloyd SA, Dixson AF. Effects of hypothalamic lesions upon the sexual and social behavior of male common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain*

- Research*, 463: 317-329, 1988.
134. Lookingland KJ, Ireland LM, Gunnet JW, Manzanares J, Tian Y, Moore KE. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations on discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Research*, 559: 82-88, 1991.
 135. López HH, Olster DH, Ettenberg A. Sexual motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Hormones and Behavior*, 36: 176-185, 1999a.
 136. López JF, Akil H, Watson SJ. Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry*, 46: 1461-1471, 1999b.
 137. Lorenz KZ. Companions as factors in the bird's environment. In: Lorenz KZ (Editor), *Studies in animal and human behaviour*, Harvard University Press: Cambridge, vol. 1, 1970. (Republicação de: Lorenz KZ. Der kumpan in der umvelt des vögels. *Journal of Ornithology*, 83: 137-213, 1935).
 138. Lucion AB, Pereira FM, Winkelmann EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience*, 117: 894-903, 2003.
 139. Madruga CS, Xavier LL, Achaval M, Sanvitto GL, Lucion AB. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural Brain Research*, 166: 241-246, 2006.
 140. Maines MD. Heme oxygenase – Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB Journal*, 2: 2557-2568, 1988.
 141. Mani SK, Allen JMC, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 6468-6472, 1994.
 142. Martin CA, Cake MH, Holbrook NJ. Relationship between fetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. *Acta Endocrinology*. 84: 167-176, 1977.
 143. Mathews D, Edwards DA. Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiology & Behavior*, 19: 319-326, 1977.
 144. Matthews MK, Kenyon R. Four-versus five-day estrous cycle in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology & Behavior*, 33: 65-67, 1984.
 145. Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Prolonged deleterious effects of neonatal handling on reproductive parameters of pubertal male rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 18: 497-500, 2006.

146. McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 381-390, 2003.
147. McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. The role of nitric oxide in reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32:1367-1379, 1999
148. McLean JH, Darby-King A, Harley CW. Potentiation and prolongation of long-term odor memory in neonate rats using a phosphodiesterase inhibitor. *Neuroscience*, 135: 329-334, 2005.
149. McLean JH, Harley CW. Olfactory learning in the rat pup: a model that may permit visualization of a mammalian memory trace. *NeuroReport*, 15: 1691-1697, 2004.
150. McLean JH, Harley CW, Darby-King A, Yuan Q. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training. *Learning & Memory*, 6: 608-618, 1999.
151. McLean JH, Shipley MT. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 304: 467-477, 1991.
152. Meaney MJ, Aitken DH, Berkel CV, Bhatnagar S, Saplosky RM. Effects of neonatal handling on age-related impairments associated with hippocampus. *Science*, 239: 766-768, 1988.
153. Meaney MJ, Bhatnagar S, Larocque S, McCormick C, Shanks M, Sharama S, Smythe J, Viau V, Plotsky P. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697: 70-85, 1993.
154. Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bolus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 11: 925-933, 1999.
155. Mohankumar PS, ThyagaRajan S, Quadri SK. Correlations of catecholamine release in the medial preoptic area with proestrous surges of luteinizing hormone and prolactin: effects of aging. *Endocrinology*, 135: 119-126, 1994.
156. Monti-Bloch L, Jennings-White C, Berliner DL. The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 673-686, 1994.
157. Moore CL. Maternal behavior in rats is affected by hormonal condition of pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96: 123-129, 1982.

158. Moore CL, Jordan L, Wong L. Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. *Physiology & Behavior*, 60: 1361-1367, 1996.
159. Moore CL, Morelli GA. Mother rats interact differently with male and female offspring. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93: 677-684, 1979.
160. Mora OA, Cabrera MM. The pheromonal restoration of cyclic activity in young estrogenized persistent estrus female rats in a vomeronasal effect. *Life Science*, 60: 493-498, 1997.
161. Mora OA, Cabrera MM, Sánchez-Criado JE. Hormonal pattern of the pheromonal restoration of cyclic activity in ageing irregularly cycling and persistent-estrus female rats. *Biology of Reproduction*, 51: 920-925, 1994.
162. Moretto M, López FJ, Negro-Vilar A. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 133: 2399-2402, 1993.
163. Moriceau S, Sullivan RM. Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, 47: 230-242, 2005.
164. Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *Journal of Neurophysiology*, 58: 510-524, 1987.
165. Neil JD. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology*, 90: 1154-1159, 1972.
166. Noda Y, Yamada K, Nabeshima T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 83: 153-158, 1997.
167. Okamura H, Yolosuka M, McEwen BS, Hayashi S. Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effects of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology*, 135: 1705-1708, 1994.
168. Okere CO, Kaba H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory memory in mice. *European Journal of Neuroscience*, 12: 4552-4556, 2000.
169. Okere CO, Kaba H, Higuchi T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*, 71: 349-354, 1996.
170. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience*, 115: 1332-1340, 2001.
171. Palkovits M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Research*, 50: 449-450, 1973.

172. Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effects of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*, 79: 109-118, 2004.
173. Papaioannou A, Gerozissis K, Prokopiou A, Bolaris S, Stylianopoulou F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and vulnerability to depressive behavior. *Behavioural Brain Research*, 129: 131-139, 2002.
174. Paredes RG. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scandinavian Journal of Psychology*, 44: 203-212, 2003.
175. Paredes RG, Highland L, Karam P. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Research*, 618: 271-276, 1993.
176. Paredes RG, Tzschentke T, Nakach N. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Research*, 813: 1-8, 1998.
177. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1997.
178. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167, 1985.
179. Pfaff DW, Sakuma Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Physiology*, 288: 203-210, 1979.
180. Pfaff DW, Schwartz-Giblin S, McCarthy MM, Kow LM. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: Knobil E & Neill JD (Editors), *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, 107-220, 1994.
181. Rangel S, Leon M. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Developmental Brain Research*, 85: 187-191, 1995.
182. Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM. Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 2741-2744, 1997.
183. Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90: 10130-10134, 1993.

184. Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal developmental on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research*, 123: 1-10, 2001.
185. Roemro PR, Beltramino CA, Carrer HF. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiology & Behavior*, 47: 685-690, 1990.
186. Samama B, Boehm N. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71: 219-231, 1999.
187. Samama B, Boehm N. Ontogenesis of NADPH-diaphorase activity in the olfactory bulb of the rat. *Developmental Brain Research*, 96: 192-203, 1996.
188. Samama B, Chateau D, Boehm N. Expression of NADPH-diaphorase in the rat forebrain during development. *Neuroscience Letters*, 184: 204-207, 1995.
189. Sánchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM. Neural encoding of olfactory recognition memory. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 547-558, 2005.
190. Sapolsky RM. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746: 294-307, 1994.
191. Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*, 11: 65-76, 1986.
192. Schmidt M, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Müller MB, Holsboer F, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology*, 146: 1458-1464, 2005.
193. Scobey MJ, Bertera S, Somers JP, Watkins SC, Zeleznik AJ, Walker WH. Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology*, 142: 948-954, 2001.
194. Selvage DJ, Johnston CA. Interaction between norepinephrine, oxytocin, and nitric oxide in the stimulation of gonadotropin-releasing hormone release from proestrous rat basal hypothalamus explants. *Journal of Neuroendocrinology*, 16: 819-824, 2004.
195. Severino GS, Fossati IAM, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of female. *Physiology & Behavior*, 81: 489-498, 2004.

196. Shipley MT, McLean JH, Ennis M. Olfactory system. In: Paxinos G (Editor), *The rat nervous system*, Academic Press: San Diego, 899-926, 1995.
197. Shivers BO, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH immunoreactive neurons. *Nature*, 304: 345-347, 1983.
198. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 388: 507-525, 1997.
199. Shukovski L, Tsafiriri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology*, 135: 2287-2290, 1994.
200. Sieck G, Ramaley JA. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiology & Behavior*, 15: 487-489, 1975.
201. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annual Reviews in Neuroscience*, 21: 127-148, 1998.
202. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels association with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96: 219-226, 1975.
203. Stanton ME, Gutierrez YR, Levine S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. *Behavioral Neuroscience*, 102: 692-700, 1988.
204. Stockhorst U, Pietrowsky R. Olfactory perception, communication, and to nose-to-brain pathway. *Physiology & Behavior*, 83: 3-11, 2004.
205. Struthers RS, Vale WW, Arias C, Sawchenko PE, Montminy MR. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature*, 350: 622-624, 1991.
206. Suchecki D, Mazaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology*, 57: 204-212, 1993.
207. Suchecki D, Nelson DY, Van Oers HJJ, Levine S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 169-182, 1995.
208. Sullivan RM. Developing a sense of safety. The neurobiology of neonatal attachment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008: 122-131, 2003.

209. Sullivan RM, McGaugh JL, Leon M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Developmental Brain Research*, 60: 219-228, 1991.
210. Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic β -receptor or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonate rats. *Behavioral Neuroscience*, 114: 957-962, 2000.
211. Sullivan RM, Wilson DA. Molecular biology of early olfactory memory. *Learning & Memory*, 10: 1-4, 2003.
212. Sullivan RM, Wilson DA. The locus coeruleus, norepinephrine, and memory in newborns. *Brain Research Bulletin*, 35: 467-472, 1994.
213. Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Research*, 643: 306-309, 1994.
214. Sullivan RM, Wilson DA, Leon M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *Journal of Neuroscience*, 9: 3998-4006, 1989.
215. Takemura M, Wakisaka S, Iwase K, Yabuta NH, Nakagawa S, Chen K, Bae YC, Yoshida A, Shigenaga Y. NADPH-diaphorase in the developing rat: lower brainstem and cervical spinal cord, with special reference to the trigemino-solitary complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 365: 511-525, 1996.
216. Tapper CM, Naftolin F, Brown-Grant K. Influence of the reproductive state at the time of operation on the early response to ovariectomy in the rat. *Journal of Endocrinology*, 53: 47-57, 1972.
217. Ten Cate C. On sex differences in imprinting. *Animal Behavior*, 33: 1310-1317, 1985.
218. ThyagaRajan S, Mohankumar PS, Quadri SK. Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging. *Brain Research*, 689: 122-128, 1995.
219. Van Oers HJJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effects on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *Journal of Neuroscience*, 18: 10171-10179, 1998.
220. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46: 755-784, 1992.

221. Voogt JL, Carr LA. Inhibition of LH and prolactin release in the cycling rats following inhibition of dopamine-beta-hydroxylase. *Brain Research*, 209: 411-419, 1981.
222. Vos DR. The role of sexual imprinting for sex recognition in zebra finches: a difference between males and females. *Animal Behavior*, 50: 645-653, 1995.
223. Walker CD, Perrin M, Vale W, River C. Ontogeny of the stress response in the rat: Role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*, 118: 1445-1451, 1986.
224. Walker SJ, Vrana KE. Pituitary corticotrophin function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats. *Neuroendocrinology*, 57: 1003-1010, 1993.
225. Ward IL. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*, 175: 82-84, 1972.
226. Watanobe H, Schiöth HB. Nitric oxide mediates leptin-induced preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in rats. *Brain Research*, 923: 193-197, 2001.
227. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7: 847-854, 2004.
228. Whitten WK, Champlin AK. The role of olfaction in mammalian reproduction. In: Field J, Magoun HW, Hall VE (Editores), *Handbook of Physiology – Endocrinology II*, Waverly Press: Baltimore, 109-123, 1959.
229. Wilson DA, Leon M. Noradrenergic modulation of olfactory bulb excitability in the postnatal rat. *Developmental Brain Research*, 42: 69-75, 1988.
230. Winkelmann-Duarte EC. Alterações morfológicas do sistema nervoso central induzidas pela manipulação neonatal. *Tese de Doutorado (Fisiologia)*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
231. Woo CC, Leon M. Distribution and development of beta-adrenergic receptors in the rat olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 352: 1-10, 1995a.
232. Woo CC, Leon M. Early olfactory enrichment and deprivation both decrease β -adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 360: 634-642, 1995b.
233. Woo CC, Wilson DA, Sullivan RM, Leon M. Early locus coeruleus lesions increase the density of β -adrenergic receptors in the main olfactory bulb of rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14: 913-919, 1996.

234. Wood RI. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*, 32: 40-45, 1997.
235. Xiao K, Kondo Y, Sakuma Y. Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat. *Hormones and Behavior*, 46: 356-361, 2004.
236. Yamaguchi T, Inamura K, Kashiwayanagi M. Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory bulb of the female rat. *Brain Research*, 876: 211-214, 2000.
237. Yan XX, Garey JL, Jen LS. Development of NADPH-diaphorase activity in the rat neocortex. *Developmental Brain Research*, 79: 29-38, 1994.
238. Yang LY, Clemens LG. MPOA lesions affect female pacing of copulation in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114: 1191-1202, 2000.
239. Yuan Q, Harley CW, Bruce JC, Darby-King A, McLean JH. Isoproterenol increase CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depletion olfactory bulbs in rat pups only at dose that produce odor preference learning. *Learning & Memory*, 7: 413-421, 2000.
240. Yuan Q, Harley CW, Darby-King A, Neve RL, McLean JH. Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. *Journal of Neuroscience*, 23: 4760-4765, 2003.

Anexos

Anexo 1

Os resultados referentes ao aprendizado olfatório em fêmeas e preferência sexual nas fases do ciclo estral, apresentados nessa tese, estão em um artigo que foi submetido para publicação na revista *Neuroscience*.

----- Original Message -----

From: "Neuroscience, Editorial" <neuroscience@journal-office.com>

To: <alucion@ufrgs.br>

Sent: Tuesday, June 13, 2006 10:49 AM

Subject: [SPAM] Submission Confirmation

Dear Dr. Lucion,

Your submission entitled "Effects of neonatal handling on the discrimination of maternal odor cues and the noradrenergic and pCREB levels in the olfactory bulb of female rats" has been received for consideration in Neuroscience.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Editorial Manager (<http://nsc.edmgr.com/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

David G. Amaral, Chief Editor
Ole Petter Ottersen, Associate Editor
Neuroscience

Neuroscience, Editorial Office
Trisha Stucker
Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
FAX: 619-699-6855
E-mail: neuroscience@journal-office.com

Effects of neonatal handling on the discrimination of maternal odor cues and the noradrenergic and pCREB levels in the olfactory bulb of female rats

Charlis Raineke,^a Maiara Lenise Lutz,^a Luiz Felipe Teer de Vasconcellos,^a Raphael Escorsim Szawka,^b Gilberto Luiz Sanvitto,^a Iván Izquierdo,^c Lia Rejane Muller Bevilaqua,^d Martín Cammarota,^c and Aldo Bolten Lucion^{a*}

^aLaboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bDepartamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^cCentro de Memória, Instituto de Pesquisa Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^dCentro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

***Corresponding author**

Aldo Bolten Lucion

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento

Rua Sarmiento Leite, 500,

Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil

e-mail: alucion@ufrgs.br

Phone: +55 51-3316-3359

Fax: +55 51-3316-3656

Key words: stress, olfactory learning, noradrenaline, long-lasting effects

Section Editor: Behavioral Neuroscience

Dr. G.J. Quirk

Ponce School of Medicine

Department of Physiology

Dr. Ana Marchand Perez Street

Urb. Industrial Reparada, Ponce, 00731, Puerto Rico.

Abbreviations: cAMP, cyclic AMP; CREB, cAMP response element-binding protein; LC, locus coeruleus; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol; NA, noradrenaline; NH, nonhandled; OB, olfactory bulb; pCREB, cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation; PND, postnatal day; RH 7, repeated handling day 7; RH 8, repeated handling day 8; SH 7, single handling day 7; SH 8, single handling day 8; TTBS, Tween-Tris buffer saline.

Abstract

Early-life environmental stimulation induces long-lasting changes upon several behavioral and neuroendocrine systems. Infant rats learn the odor of the mother and develop a preference for the familiar environment. The molecular basis of olfactory learning is associated with increased noradrenaline and cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation in the olfactory bulb. The present study aimed to analyze the effects of neonatal handling on the maternal odor preference test, noradrenaline levels and CREB phosphorylation in the olfactory bulb of rat pups. Repeatedly handled females on the 7th postnatal day (PND) did not show preference for maternal odor compared with single and non-handled groups. The apparently non-aversive handling procedure negatively affected olfactory learning, reducing maternal odor preference. The decreased noradrenaline levels and the increased MHPG/noradrenaline ratio in the olfactory bulb indicated an increased activity of noradrenergic system, which may have altered mechanism of olfactory learning. We conclude that repeated handling affected the mechanisms of olfactory learning, which reduced maternal odor preference. The alteration of olfactory learning may be the sequela of the neonatal handling that could explain the long-lasting behavioral and endocrine changes.

Key words: olfactory learning, partner preference, olfactory bulb, early-life stimulation

Neonatal handling is an experimental procedure that involves brief maternal separation and tactile stimulation. This disruption of the mother-pup relationship induces profound long-lasting changes upon several behavioral and neuroendocrine systems (Meerlo et al., 1999; Levine, 2005). In adult rats, early postnatal handling reduces emotional reactivity, expressed as increased exploratory activity in novel environments, which is interpreted as decreased fearfulness (Meerlo et al., 1999; Padoin et al., 2001; Severino et al., 2004). Neonatal handling also permanently alters hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to stressful stimuli, reducing corticosterone response to a variety of stressors (Levine 1967; Plotsky and Meaney, 1993; Liu et al., 2000a). Moreover, adult rats that were handled during the neonatal period show decreased sexual behavior and fertility of male and female rats (Gomes et al., 1999, 2005; Padoin et al., 2001; Mazaro and Lamano-Carvalho, 2006). A stable mother-pup interaction seems critical for normal growth and behavioral development, even in non-altricial species (Bateson et al., 2004; Denenberg, 1999; Fleming et al., 1999; Anand and Scalzo, 2000; Hennessy, 2003; Cameron et al., 2005). However, the molecular mechanisms underlying the effects of environmental stimulation during the neonatal period have not been unraveled.

In order to analyze causes of the long-lasting changes induced by early-life environmental stimulation, it is crucial to determine the mechanisms within the pup that are susceptible and thus altered by the stimulation. The identification of the mother is critical for the survival of the altricial pups. Infant rats rapidly learn the odor characteristics of their mother and the nest and develop a preference for familiar odors (Sullivan et al., 1989; Leon, 1992; Leon, 1998; McLean and Harley, 2004). The molecular basis of olfactory learning involves the activation of mitral neurons in the pup's olfactory bulb (OB). Concurrently, tactile stimulation (licking) activates the locus coeruleus (LC) (Nakamura et al., 1987) and increases noradrenaline (NA) levels in the

OB of the pup (Rangel and Leon, 1995; Sullivan and Wilson, 2003). The NA binding with β -adrenoreceptors in the OB (Sullivan et al., 1989, 1991; Langdon et al., 1997) increases cAMP that induces phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) (McLean et al., 1999; Yuan et al., 2000; Sullivan and Wilson, 2003), proposed as a universal “memory molecule” (Silva et al., 1998; Lamprecht, 1999), and produces a preference for maternal odor.

The objective of the present study was to analyze the effects of neonatal handling on the maternal odor preference test, NA content and CREB phosphorylation in the OB. We aimed to test the hypothesis that neonatal handling changes the behavioral expression of the maternal olfactory learning and its mechanisms in the OB of female rat pups. We also intended to show that neonatal handling induces long-lasting effects on behaviors, especially those that involve social bonds, such as sexual preferences.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Pregnant female Wistar rats were brought from the colony of the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) to the animal room in our laboratory.

Approximately 7 days before delivery, the females were housed individually, and the presence of pups was checked twice a day. The day of the birth was considered day 0, and on PND 1, the number of pups was culled to 8 per dam by randomly removing some of them with minimal contact with remaining pups and the dam. The animals in each experimental group were not siblings (each subjected from a different litter). All

rats were maintained on a 12 h light-dark cycle (lights on at 6 a.m.), the room temperature was $22 \pm 1^\circ\text{C}$, and water and food (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) were available at all times. Experiments were performed in accordance with the National Institute of Health (NIH) and Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) guidelines.

Neonatal handling

First the litter and the mother in their home cage were removed to a quiet room next to the animal facility, with the same light period and temperature. Then, the mother was placed in another cage, and the experimenter gently handled all pups at the same time using both hands, covered with fine latex gloves, for 1 min. After handling, all pups were taken to the nest at the same time and then the mother was placed back in the home cage. The pups were handled during the light period of the daily photoperiod cycle at a distance of about 1 m from the dam, and the total time of the mother-infant separation was approximately 1 min and 30 sec (Gomes et al., 1999, 2005; Padoin et al., 2001; Severino et al., 2004). In all groups, the home cage bedding was not changed until the tests on PND 7 or 8 according to the group; after that, cages were changed twice a week.

Maternal odor preference test

In the maternal odor preference test, 5 groups of animals were studied: nonhandled (NH, pups were not manipulated either by the researchers or by the caretakers during

the first 10 postnatal days); repeated handling tested on day 7 (RH7, the pups were daily handled for 1 min from PND 1 to PND 7); repeated handling tested on day 8 (RH8, the pups were daily handled for 1 min from PND 1 to PND 7); single handling tested on day 7 (SH7, the pups were handled once for 1 min on PND 7); single handling tested on day 8 (SH8, the pups were handled once for 1 min on PND 7). The existence of a possible aversive cue produced by the mother of the handled pups was tested using 2 groups: NH and RH7.

The test consisted of a two-odor choice between the areas with the nest or fresh bedding. A Plexiglas box (34 cm long x 24 cm high x 40 cm wide) divided in a half by 2 cm wide neutral zone, which ran the length of the box, was used. In each area, 300 mL of bedding (fresh, nonhandled or handled) was placed in the corner. In the nonhandled group, test was performed on PND 7. In the single handling and repeated handling groups, it was performed on PND 7, 15 min after the handling procedure, or on PND 8, 24 hours after the handling procedure, using different litters for each day. First, the mother was placed in another cage in the same room of the test. Immediately after that, one female pup was placed in the 2-cm neutral zone at the end of the box facing the opposite the target beddings. In a 1-min trail test the amount of time the pup spent over each of the two areas was recorded. The pup was considered to be in one area when it turned its head or the whole body to that side of the box. Animals were tested for 5 trials with an interval of 2 min during which the pup was taken back to the home cage and placed in a corner separate from the litter. In each test, beddings were switched between the sides of the box. Following each test period, the test box was washed with 70% ethanol to remove trace odors. The video recordings were later analyzed with Noldus Observer software (Noldus Information Technology, Netherlands). The total time (s) in each area was obtained by the sum of the 5 trial tests.

Partner preference test

In order to test the partner preference in adulthood, a measurement of sexual motivation (Avitsur and Yirmiya, 1999), the same females tested for maternal odor preference (NH, SH7, SH8, RH7 and RH8) were used. However, in the RH7 and RH8 groups, the daily handling procedure continued until day 10. In the RH8 group, pups on the 8th day were handled after the maternal odor preference test. Single handling and nonhandled groups were left undisturbed until PND 10. The 15-min test consisted of a two-odor choice between a sexually active male and a castrated one. For all groups, vaginal smears were taken daily after 85 days of age and only those rats showing at least 3 regular 4-day estrous cycles were used. Each female was tested on the night of the proestrus (sexually receptive) and afterwards on the night of diestrus (sexually unreceptive). A Plexiglas box (90 cm long x 40 cm high x 60 cm wide), divided into 3 equal size compartments, was used. Each lateral compartment had a sliding door (20 x 15 cm) with holes facing the middle compartment that permitted olfactory and visual interaction. During the beginning of the dark phase of the daily photoperiod, under dim red light, females were placed in the middle compartment and 15 min later, a sexually active male and a castrated male (stimulus animals) were placed in each of the lateral compartments. The total amount of time (s) that the female spent sniffing each of the two lateral areas was recorded for 15 min. The video recordings were analyzed with Noldus Observer software (Noldus Information Technology, Netherlands).

High performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED)

The levels of NA and MHPG were analyzed using 3 groups: NH, SH7 and RH7. Single handling and repeated handling pups were rapidly decapitated on PND 7, 15 min after the handling procedure. The nonhandled pups were decapitated, on the PND 7, immediately after removing from the home cage. After decapitation both olfactory bulbs were removed and immediately frozen in a container with isopentane in dry ice and stored at -70°C. Using a Microultrasonic cell disrupter, olfactory bulbs were homogenized in 400µL of a solution containing 0.2M perchloric acid, 0.1mM EDTA and 0.15µM 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, internal standard; Aldrich, USA). The homogenates were centrifuged for 20 min at 1200g and the supernatant was filtered through a 0.22µm filter. In the remaining pellet, protein content was determined by the Bradford method (1976). In the rat, MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol, a NA metabolite) is conjugated to MHPG-sulfate by phenolsulfotransferase (Folds and Meek, 1974). Since MHPG-sulfate is not electrochemically active, free MHPG was deconjugated by heating for 5 min at 94°C before performing sample analysis by HPLC-ED as previously described (Lookingland et al., 1991). Thirty microliters of each sample were injected by an auto injector (SIL-10Aadvp; Shimadzu, Japan). Separation was performed on a 250 x 4.6mm reversed-phase C18 column (Shim-pack VP-ODS, 5µm; Shimadzu, Japan), preceded by a 10 x 4.6mm C18 guard column (Shim-pack GVP-ODS, 5µm; Shimadzu, Japan). The mobile phase, prepared with Milli-Q water, consisted of 100mM sodium dihydrogen phosphate monohydrate, 10mM sodium chloride, 0.1mM EDTA, 0.28mM sodium 1-octanesulfonic acid and 20% methanol. pH was adjusted to 3.5 with phosphoric acid. The flow rate was set at 0.8mL/min, pumped by a dual piston pump (LC-10Aadvp; Shimadzu, Japan). The detector potential was 0.65 V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-

03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Netherlands). Chromatography dates were plotted using Class-VP software (Shimadzu, Japan). NA and MHPG were identified on the basis of their peak retention times. Quantification was performed by the internal standard method (DHBA as internal standard) based on the area under the peak.

Western blots

The levels of CREB and pCREB were analyzed using 3 groups: NH, SH7 and RH7. The OBs were obtained as described for the HPLC-ED analysis. They were homogenized using 500 μ L of homogenization buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1mM sodium orthovanadate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM NaF and 1mM PMSF). Protein content was determined using the method described by Bradford (1976). Equivalent amounts of protein (30 μ g for each sample) were loaded into a lane. Proteins were separated on the basis of gel mobility using SDS-PAGE, after proteins were electrotransferred to PVDF membrane. Membranes were incubated in Tween-Tris buffer saline (TTBS) (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween 20) containing 5% albumin for 2 hours at room temperature to block non-specific binding. This was followed by incubation overnight at 4°C in the presence of primary antibodies that recognize the following antigens: pCREB at Ser-133 (pCREB) (1:1000, Upstate Biotechnology) or CREB (1:4000, Santa Cruz Biotechnology). The blots were washed in TTBS, and then incubated for 2 hours with the secondary antibody, goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase, at a 1:20000 dilution in TTBS. Membranes were then washed in TTBS. Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (ECL Western blotting analysis system, Amersham). Immunoreactivity was quantified using densitometric analysis.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm S.E.M. The amount of time the pups spent outside of the neutral zone were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA; groups and area) followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons or by Student's t-test as required. CREB, pCREB, NA and MHPG levels and MHPH/NA ratio in the OB were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. Results of the partner preference test were analyzed by three-way ANOVA (groups, estrous cycle phase and side of the testing box) followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. In all cases, differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Neonatal handling and maternal odor preference

RH7 pups did not show preference (time in the area) for their own bedding compared with the fresh sawdust (Fig. 1). When tested 24 hrs later (RH8), with no previous immediate handling, the lack of preference was still present. On the other hand, the SH7 and the SH8 pups showed a marked preference for the nest area compared with the fresh area, such as the NH group.

Figure 2 shows that the sawdust in the cage of repeated handled pups does not seem to contain aversive stimuli, since NH pups on the 7th day preferred bedding from

a RH7 group instead of a fresh one. On the other hand, RH7 pups showed no preference for bedding of NH pups compared with a fresh one.

Neonatal handling and partner preference

Figure 3 shows that RH7 females on the proestrus night did not prefer (time sniffing) the side of the testing box with the sexually active male compared with the castrated one. The same effect was observed with females in diestrus (sexually unreceptive period). As expected, SH7 and NH females showed a clear preference for the sexually active male on the proestrus, but not on the diestrus night. The results (data not shown) for RH8 and SH8 were not different from the ones of the RH7 and SH7 groups, respectively. A positive correlation was shown between the time that pups spent over the nest area with the duration of sniffing the sexually active male in adulthood (Pearson correlation, $r = 0.32$, $p < 0.04$).

Neonatal handling and NA and MHPG levels in the OB of pups

RH7 pups showed reduced NA levels (Fig. 4a) and increased MHPG/NA ratio (Fig. 4c) in the OB compared with NH and SH7. SH7 did not change NA levels and MHPG/NA ratio in the OB compared with NH group. MHPG levels were increased in RH7 and SH7 groups compared with NH (Fig. 4b).

Neonatal handling and CREB and pCREB levels in the OB of pups

RH7 pups showed no significant effect changes in pCREB levels compared with NH and SH7. However, SH7 pups show increased pCREB levels in the OB compared with NH (Fig. 5). Repeated or single neonatal handling did not alter total CREB levels in the OB

DISCUSSION

Repeatedly handled female rat pups showed no preference for the odor of the own nest or the nest of nonhandled pups compared with fresh sawdust. Single handling did not interfere with the preference for the familiar odor, showing that repetition of the stimulation by handling was necessary to induce the lack of preference for the maternal odor. Moreover, repeated handling decreased NA levels and increased the MHPG/NA ratio in the OB compared with the nonhandling and single handling groups, indicating an increased activity of noradrenergic system. Repeated handling did not significantly alter pCREB level compared with nonhandled nor with the single handling group, showing an intermediate value. In the repeated handling pups, the increased activity of the noradrenergic system in the OB, inferred by the decreased NA content and increased MHPG/NA ratio, was not followed by an increase in CREB phosphorylation.

The increased noradrenergic activity induced by the repetition of handling may have altered the maternal olfactory learning in the pups. Perhaps handling has turned the OB refractory to tactile stimulation. Single handling increased pCREB, while repetition of the procedure did not significantly increased CREB phosphorylation, indicating a reduced responsiveness of this essential molecular substrate for olfactory learning. Since the natural olfactory learning mechanism involves licking/grooming by the mother (Leon, 1992), the additional tactile stimulation provided by the repeated

handling might have negatively interfered with the natural olfactory learning.

Alternatively, we may suppose that handling provided a repeated tactile stimulation paired with different odors than the mother, and this might have interfered with the natural maternal olfactory learning. Nevertheless, we conclude that the handling stimulation affected the olfactory learning mechanism, which, as a result, reduced maternal odor preference.

Concerning the mechanism by which the repeated handling interfered with the olfactory learning, we suggest that it was by an overstimulation of the β -adrenoceptors in the OB. Previous studies (Sullivan et al., 1989, 1991; Roth and Sullivan, 2005) have shown that rat pups will acquire a preference for a neutral odor when paired with maternal licking and grooming behaviors, experimental tactile stimulation (stroking), or isoproterenol (β -adrenoreceptors agonist) injections. However, olfactory learning exhibits an inverted U-curve when pairing the odor with isoproterenol injections, with both a lower (1 mg/kg) and a higher dose (4 mg/kg) being ineffective relative to a moderate dose (2 mg/kg) that is optimal for learning. The noradrenergic pathway from the LC to the OB exerts a critical stimulatory effect on the olfactory learning (Sullivan et al., 1989, 1991; Langdon et al., 1997; McLean et al., 2005). The noradrenergic input to OB increases cAMP leading to CREB phosphorylation. This implicates CREB as a mediator of early olfactory learning (McLean et al., 1999). Similarly to the NA activity, CREB phosphorylation in response to stimulation also follows an inverted U-curve profile (Yuan et al., 2000). These results support the hypothesis of an optimal window for pCREB level in initiating the development of odor memory (Yuan et al., 2003). Moreover, they indicate that the relationship between noradrenergic activity and CREB phosphorylation is not straightforward; overstimulation of the LC noradrenergic pathway prevents CREB phosphorylation and olfactory learning (Yuan et al., 2000;

McLean and Harley, 2004; McLean et al., 2005). In the present study, besides the experimental stimulation by handling, pups were probably more licked and groomed by the mothers when they returned to the home cage, as observed in our laboratory in previous studies (unpublished data) and showed by Liu et al. (1997).

The duration of CREB phosphorylation critically influences downstream gene expression (Bito et al., 1996). This overactivation of CREB might lead to increased repressor activity (Silva et al., 1998). On the other hand, the overexpression of total CREB can exert deleterious effects on early odor learning (Yuan et al., 2003). However, our results with the repeated or single handling procedures do not show changes in **total** CREB levels in the OB. Nevertheless, here we show that repeated handling during the neonatal period changes molecular mechanisms of olfactory learning that may be induced by the tactile overstimulation of the LC noradrenergic system (Sullivan et al., 1989, 1991; Nakamura et al., 1987; Langdon et al., 1997; McLean et al., 2005), preventing CREB phosphorylation and preference for maternal odor (Yuan et al., 2000; McLean and Harley, 2004; McLean et al., 2005).

On the other hand, the mother-pup bonding has been related to behavioral changes in adulthood. Reciprocal mother-pup behaviors increase the probability that the young will survive and, beyond survival, will mate and successfully rear their own offspring (Fleming et al., 1999; Anand and Scalzo, 2000; Insel and Yuang, 2001). In a wide range of species, poorer attachment between mother and pup alters defensive responses to threat and reproductive strategies later in adulthood (Cameron et al., 2005). Changes in the expression of a single gene can alter partner preference (Lim et al., 2004). On the other hand, a given genotype can give rise to different phenotypes depending on the environmental conditions (Bateson et al., 2004; Weaver et al., 2004; Ladd et al., 2005). In male rats, the effects of early olfactory experience on sexual

behavior were investigated by applying citral odor to some dams throughout the development. Offspring of these dams would mate more rapidly with a female in estrus bearing the citral scent than with unscented control (Fillion and Blass, 1986). To Moriceau and Sullivan (2005), early attachment-related odors appear to retain value into adulthood, although the role of the odor in modifying behavior changes from infancy (attachment to the mother) to adulthood (reproduction). Indeed, our results show that maternal odor preference is positively correlated with the preference for a sexual partner in adulthood.

In summary, the apparently non-aversive handling procedure negatively affected olfactory learning reducing maternal odor preference. Although the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is hyporesponsive during the period of the neonatal handling, the central noradrenergic system increases its activity in response to the repeated handling. Probably, the overt stimulation increases noradrenergic activity in the OB more than an optimal level, preventing the induction CREB phosphorylation and thus preference for a familiar environment. The alteration of the olfactory learning mechanism may be the sequela of the neonatal handling that could explain the long-lasting behavioral and endocrine changes.

Acknowledgments - The authors would like to thank Maria Angela S. dos Santos for technical assistance. CNPq, FAPESP and CAPES supported this research.

REFERENCES

- Anand KJS, Scalzo FM (2000) Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate* 77:69-82.
- Avitsur R, Yirmiya R (1999) The partner preference paradigm: a method to study sexual motivation and performance of female rats. *Brain Res Protoc* 3:320-325.
- Bateson P (1978) Early experience and sexual preference. In: *Biological determinants of sexual behavior* (Hutchison JB, ed), pp29-53. Chichester: Wiley.
- Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE (2004) Developmental plasticity and human health. *Nature* 430:419-421.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-1214.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cameron NM, Champagne FA, Parent C, Fish EW, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ (2005) The programming of individual differences in defensive responses and

reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev* 29:843-865.

Denenberg VH (1999) Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Dev Psychobiol* 34:1-3.

Fillion TJ, Blass EM (1986) Infantile experience with suckling odors determines adult sexual behavior in male rats. *Science* 231:729-731.

Fleming AS, O`Day DH, Kraemer GW (1999) Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev* 23:673-685.

Flodes A, Meek JL (1974) Occurrence and localization of brain phenolsulfotransferase. *J Neurochem* 23:303-307.

Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB (1999) Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res* 32:1239-1242.

Gomes CM, Rainecki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB (2005) Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 184:435-445.

Gunnar MR, Gonzalez CA, Goodlin BL, Levine S (1981) Behavioral and pituitary-adrenal responses during a prolonged separation period in infant rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 6:64-75.

Hennessy MB (2003) Enduring maternal influences in a precocial rodent. *Dev. Psychobiol.* 42:225-236.

Insel TR, Young LJ (2001) The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci* 2:129-136

Kendrick KM, Hinton MR, Atkins K, Haupt MA, Skinner JD (1998) Mothers determine sexual preferences. *Nature* 395:229-230.

Kimura F, Nakamura S (1987) Postnatal development of α -adrenoreceptor-mediated autoinhibition in the locus coeruleus. *Dev Brain Res* 35:21-26.

Kraemer GW, Ebert MH, Schmit DE, McKinney WT (1989) A longitudinal study of the effect of different social rearing conditions on cerebrospinal fluid norepinephrine and biogenic amine metabolites in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2:175-189.

Ladd CO, Thirivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM (2005) Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 30:520-533.

Lamprecht R (1999) CREB: a message to remember. *Cell Mol Life Sci* 55:554-563.

Langdon PE, Harley CW, McLean JH (1997) Increased β adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. *Dev Brain Res* 102:291-293.

Leon M (1998) Catecholaminergic contributions to early learning. *Adv Pharmacol* 42:961-964.

Leon M (1992) Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol* 23:1557-1573.

Levine S (2005) Developmental determinates of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30:939-946.

Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH (1967) Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 2:55-59.

Lim MM, Wang Z, Olazábal DE, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ (2004) Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429:754-757.

Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (2000a) Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 12:5-12.

Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000b) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3:799-806.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.

Lookingland KJ, Ireland LM, Gunnet JW, Manzanares J, Tian Y, Moore KE (1991) 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations on discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Res* 559:82-88.

Lorenz KZ (1970) Companions as factors in the bird's environment. In: *Studies in animal and human behaviour* (Lorenz KZ, ed), vol 1. Cambridge: Harvard Univ Press (Reprinted from *J Ornithol*, 1935, 83:137-213).

Lucion AB, Pereira FM, Winkelman EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA (2003) Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav Neurosci* 117:894-903.

Mazaro R, Lamano-Carvalho TL (2006) Prolonged deleterious effects of neonatal handling on reproductive parameters of pubertal male rats. *Reprod Fertil Dev* 18:497-500.

McLean JH, Darby-King A, Harley CW (2005) Potentiation and prolongation of long-term odor memory in neonate rats using a phosphodiesterase inhibitor. *Neuroscience* 135:329-334.

McLean JH, Harley CW (2004) Olfactory learning in the rat pup: a model that may permit visualization of a mammalian memory trace. *Neuroreport* 15:1691-1697.

McLean JH, Harley CW, Darby-King A, Yuan Q (1999) pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training. *Learn Mem* 6:608-618.

McLean JH, Shipley MT (1991) Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *J Comp Neurol* 304:467-477.

Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM (1999) The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 11:925-933.

Moore CL, Jordan L, Wong L (1996) Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. *Physiol Behav* 60:1361-1367.

Moriceau S, Sullivan RM (2005) Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol* 47:230-242.

Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T (1987) Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *J Neurophysiol* 58:510-524.

Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB (2001) Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 115:1332-1340.

Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol Brain Res* 18:195-200.

Rangel S, Leon M (1995) Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Dev Brain Res* 85:187-191.

Roth TL, Sullivan RM (2005) Memory of early maltreatment: neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry* 57:823-831.

Severino GS, Fossati IAM, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB (2004) Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various age and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav* 81:489-498.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.

Smythe JW, Rowe WE, Meaney MJ (1994) Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in the selected brain regions: relationship to the handling effect in glucocorticoid receptor expression. *Dev Brain Res* 80:183-189.

Sullivan RM, McGaugh JL, Leon M (1991) Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Dev Brain Res* 60:219-228.

Sullivan RM, Wilson DA (2003) Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem* 10:1-4.

Sullivan RM, Wilson DA (1994) The locus coeruleus, norepinephrine, and memory in newborns. *Brain Res Bull* 35:467-472.

Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA (1994) Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res* 643:306-309.

Sullivan RM, Wilson DA, Leon M (1989) Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci* 9:3998-4006.

Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 7:847-854.

Wilson DA, Leon M (1988) Noradrenergic modulation of olfactory bulb excitability in the postnatal rat. *Dev Brain Res* 42:69-75.

Woo CC, Leon M (1995a) Distribution and development of beta-adrenergic receptors in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 352:1-10.

Woo CC, Leon M (1995b) Early olfactory enrichment and deprivation both decrease β -adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 360:634-642.

Woo CC, Wilson DA, Sullivan RM, Leon M (1996) Early locus coeruleus lesions increase the density of β -adrenergic receptors in the main olfactory bulb of rats. *Int J Dev Neurosci* 14:913-919.

Yuan Q, Harley CW, Bruce JC, Darby-King A, McLean JH (2000) Isoproterenol increases CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depleted olfactory bulbs in rat pups only at doses that produce odor preference learning. *Learn Mem* 7:413-421.

Yuan Q, Harley CW, Darby-King A, Neve RL, McLean JH (2003) Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. *J Neurosci* 23:4760-4765.

Figure Legends

Fig. 1. Mean \pm SEM time spent over nest and fresh bedding area in the maternal odor preference test of single and repeated handling groups (nonhandled: NH; single handling day 7: SH 7, and day 8: SH 8; repeated handling day 7: RH 7 and day 8: RH 8). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. * $p < 0.0001$ significant difference from nest bedding area of same group ($n = 12 - 15$).

Fig. 2. Mean \pm SEM time spent outside neutral zone in the odor preference test of nonhandled (NH) and repeated handling day 7 (RH 7) groups. Data were analyzed using the Student *t*-test. * $p < 0.002$ significant difference between fresh and handled bedding area for nonhandled pups. In all groups $n = 8$.

Fig. 3. Mean \pm SEM duration of sniffing a sexually active or a castrated male in the partner preference test of single and repeated handling groups (nonhandled: NH; single handling day 7: SH 7 and repeated handling day 7: RH 7). Data were analyzed using three-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test, * $p < 0.0001$ significant difference from sexually active males of same group ($n = 12 - 15$).

Fig. 4. Mean \pm SEM of NA (a), MHPG (b) levels and MHPG/NA ratio (c) in the OB of repeated and single handling groups (nonhandled: NH; single handling day 7: SH 7, and repeated handling day 7: RH 7). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. * $p < 0.04$ significant difference from nonhandled group for NA and * $p < 0.01$ significant difference from nonhandled group for MHPG and MHPG/NA ratio. In all groups $n = 6 - 7$.

Fig. 5. Representative western blots showing CREB and pCREB levels in the OB of single (SH 7) and repeated handling (RH 7) pups (**a**). Mean \pm SEM percentage of optical density of CREB and pCREB in the OB of single and repeated handling groups with respect to nonhandled (**b**). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. * $p < 0.03$ significant difference from nonhandled group. For CREB $n = 3$ for all groups; for pCREB $n = 5$ for all groups.

Figure 1

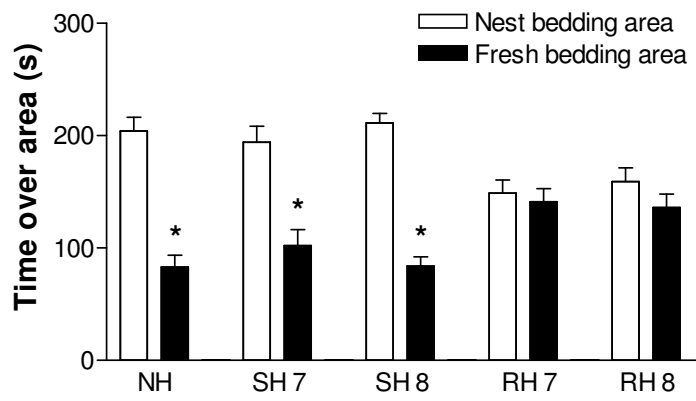


Figure 2

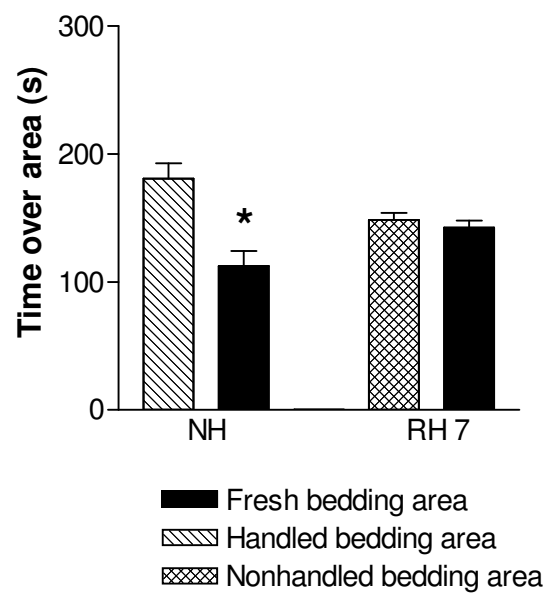


Figure 3

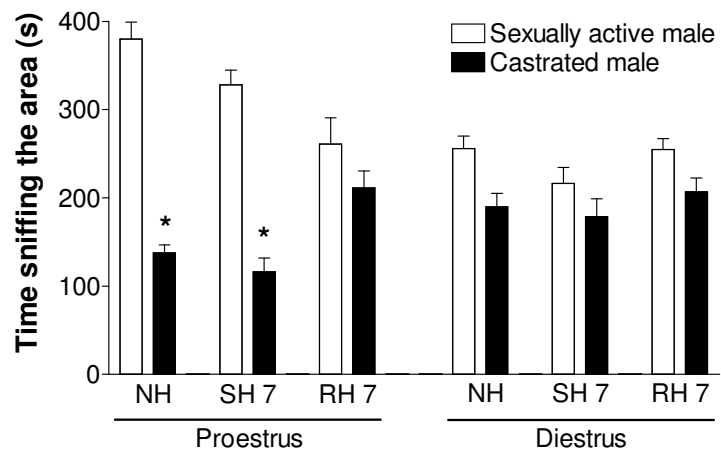


Figure 4

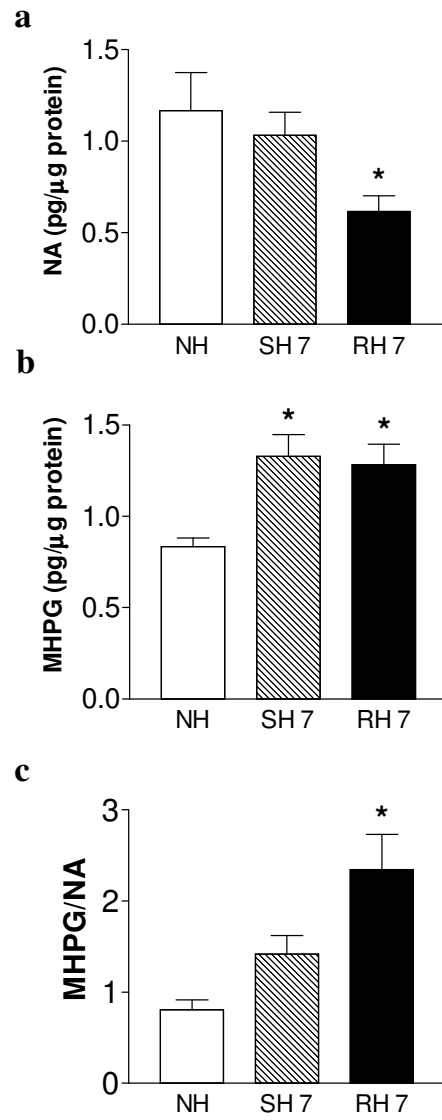
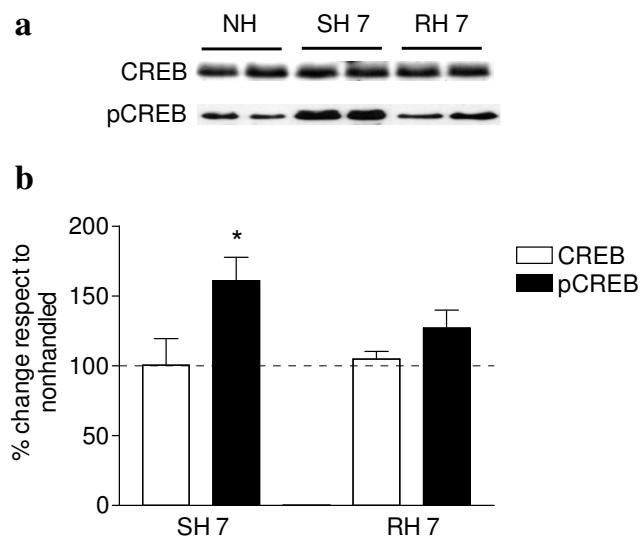


Figure 5



Anexo 2

Durante o doutorado foram realizados experimentos que não fazem parte dessa tese, no entanto, estão presentes no artigo publicado, em 2005, na revista *Journal of Endocrinology*.

Anexo 3

Durante o doutorado foi realizado um experimento, cujos resultados não fazem parte dessa tese, que tem como objetivo explicar a drástica redução no número de óvulos nas ratas manipuladas no período neonatal. Sabe-se que o pico de FSH na madrugada do estro é fundamental para o recrutamento dos oócitos para a ovulação no próximo ciclo. Assim, julgou-se pertinente verificar se a manipulação neonatal pode estar interferindo com a secreção de FSH na madrugada do estro, sendo, portanto, o responsável pela redução da ovulação nas ratas manipuladas.

Protocolo Experimental

Ratas manipuladas e não-manipuladas com 3 ciclos estrais regulares seguidos, tiveram a veia jugular externa canulada na noite do proestro. Amostras de 600 μ L de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas de hora em hora, iniciando às 24 horas (horário das coletas: 24:00, 1:00, 2:00, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 horas), perfazendo um total de 8 coletas. O sangue foi centrifugado e estocado para posterior dosagem de FSH por radioimunoensaio. Após as coletas, na manhã do estro, as ratas foram decapitadas para realização da contagem do número de óvulos.

Resultados

A manipulação neonatal induziu um aumento da secreção de FSH na madrugada do estro quando comparado às ratas não-manipuladas, verificado tanto no perfil de secreção quanto na área abaixo da curva (Figura 1). Confirmando resultados prévios (Gomes *et al.* 2005, 1999), ratas manipuladas no período neonatal apresentam uma redução do número de óvulos comparada às ratas não-manipuladas (Figura 2).

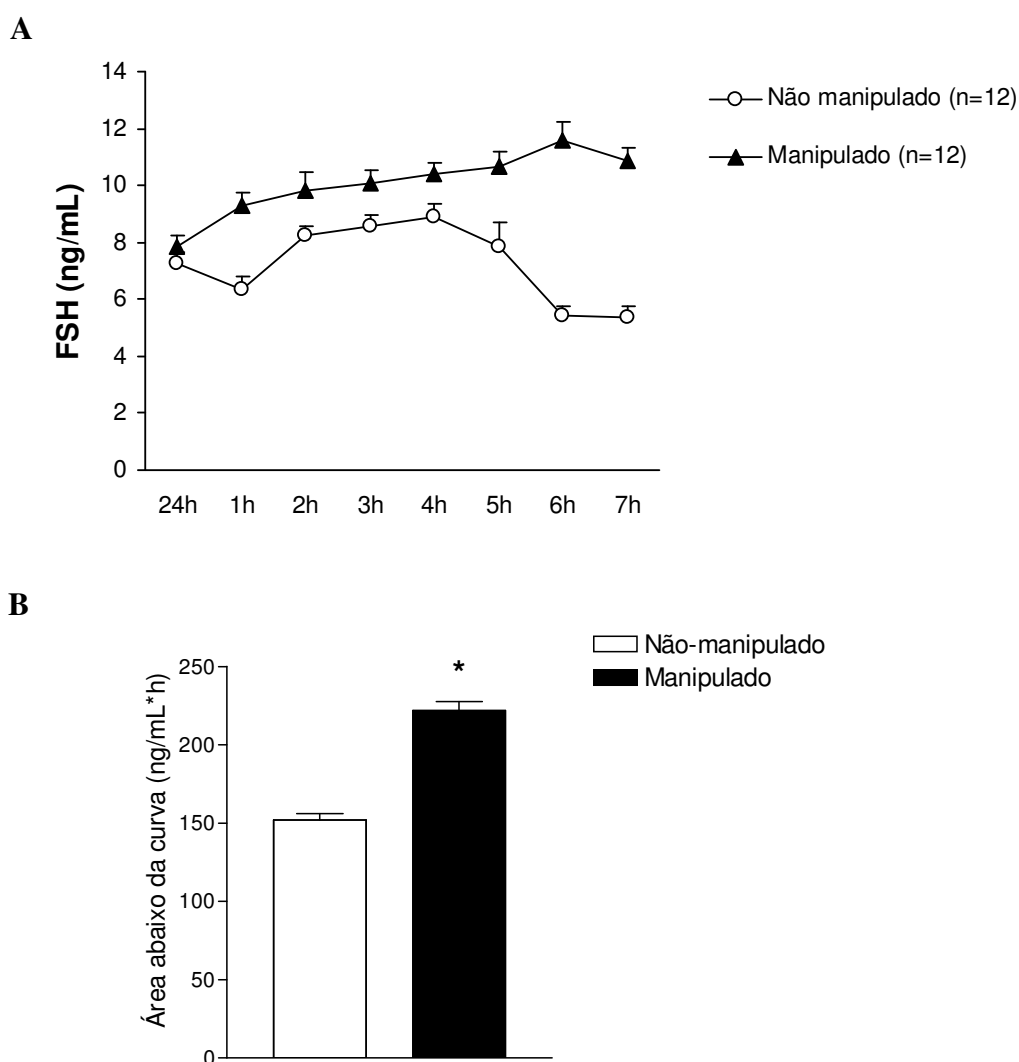


Figura 1. Em **A**, perfil de secreção de FSH na madrugada do estro. Em **B**, média das áreas abaixo da curva das concentrações plasmáticas de FSH na madrugada do estro. n=12 para os dois grupos.

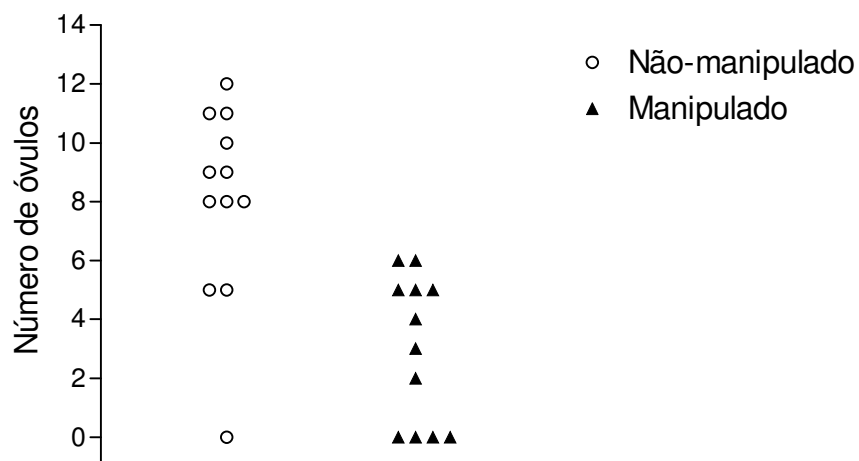


Figura 2. Distribuição das ratas não-manipuladas e manipuladas de acordo com o número de óvulos na manhã do estro ($p < 0,002$; Teste U de *Mann-Whitney*). Cada símbolo representa uma rata.