

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A PROLIFERAÇÃO
CELULAR NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA MEDIAL, NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO, HIPOCAMPO E *LOCUS COERULEUS*.

CAMILA BATISTA PADILHA

PORTO ALEGRE – 2007

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

EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A PROLIFERAÇÃO
CELULAR NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA MEDIAL, NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO, HIPOCAMPO E *LOCUS COERULEUS*.

Aluna: Camila Batista Padilha

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências, da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para a obtenção
do Título de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre – Março de 2007.

Aos meus pais.

O que me tranqüiliza é que tudo o que existe, existe com uma precisão absoluta. O que for do tamanho de uma cabeça de alfinete não transborda nem uma fração de milímetro além do tamanho de uma cabeça de alfinete. Tudo o que existe é de uma grande exatidão. Pena é que a maior parte do que existe com essa exatidão nos é tecnicamente invisível. O bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. Nós terminamos adivinhando, confusos, a perfeição.

Clarice Lispector, in A Perfeição

Agradecimentos:

Ao professor Dr. Aldo Bolten Lucion, pela orientação, paciência, confiança e exemplo de professor e pesquisador a ser seguido.

A amiga e professora da FFFCMPA, Dra. Elisa Winkelmann-Duarte pela paciência em me ensinar várias das técnicas utilizadas neste trabalho, pelo tempo já escasso despendido e pela colaboração e apoio.

A professora da FFCMPA, Dra. Marilda da Cruz Fernandes, pelos conselhos, pelo material cedido para os pilotos do experimento e pelo espaço utilizado em seu laboratório.

Aos alunos da FFFCMPA, Ricardo Santin e Suélen Merlo, pela colaboração na imunoistoquímica nos finais de semana e apoio.

Aos meus pais e minha irmã, que estiveram presentes mesmo à distância, apoiando, incentivando e, portanto, possibilitando à realização deste trabalho. Vocês foram meu porto seguro durante todos os passos para chegar até aqui.

Aos amigos próximos ou distantes, mas sempre presentes: Cinthia, Eli, Fabi, Ana, Cris, Paulinha, Val, Lígia, Ana Raquel, Carol, Lidiane, Marcelo.

Aos colegas do laboratório, Ana Lúcia Ceconello, Ana Raquel Karkow, Anelise Todeschini, Cármen Gomes, Caroline Perinazzo, Charlis Raineiki, Fabiana Leopoldo, Gabriela Severino, Lígia Centenaro, Marcelo Souza, Márcia Azevedo, Natália Uriarte, Rosana Frey, Rosane Ribeiro, Tatiane Camozzato, pelo coleguismo, colaboração e amizade.

As técnicas, do nosso laboratório Ângela, e do laboratório de patologia da FFFCMPA, Terezinha e Rose, pelo auxílio e conhecimento.

Aos professores deste Programa de Pós-Graduação, que dividiram conosco o seu conhecimento durante as disciplinas.

Às professoras Dra. Maristela Jorge Padoin e Dra. Wania Partata, pela oportunidade do estágio didático e pelo que me ensinaram durante o mesmo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro na maior parte deste período.

À todos que de alguma maneira possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | I |
| Lista de Figuras..... | II |
| Resumo | III |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Homeostase e Estresse | 1 |
| 1.2. Período Hiporresponsivo ao Estresse..... | 2 |
| 1.3. Estimulação Neonatal..... | 3 |
| 1.4. Manipulação Neonatal e Respostas ao Estresse..... | 3 |
| 1.5. Manipulação Neonatal e Comportamento Sexual..... | 5 |
| 1.6. Manipulação Neonatal e Morfologia do Encéfalo..... | 6 |
| 1.6.1. Área Pré-Óptica Medial..... | 7 |
| 1.6.2. Núcleo Paraventricular do hipotálamo..... | 8 |
| 1.6.3. Formação Hipocampal..... | 10 |
| 1.6.4. <i>Locus Coeruleus</i> | 11 |
| 1.7. Neurogênese e Proliferação Celular..... | 13 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 16 |
| | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1. Animais..... | 17 |
| 3.2. Grupos experimentais..... | 17 |
| 3.3. Injeções de BrdU..... | 18 |
| 3.4. Procedimento Cirúrgico..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Procedimentos Histológicos..... | 18 |
| 3.6. Imunoistoquímica..... | 19 |
| 3.7. Análise Estatística..... | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 21 |
| 4.1. Peso Corporal..... | 21 |
| 4.2. Número de células BrdU-positivas na Área Pré-óptica Medial em ratos Wistar fêmeas de 11 dias..... | 22 |
| 4.3. Número de células BrdU-positivas no Núcleo Paraventricular do hipotálamo em ratos Wistar fêmeas de 11 dias..... | 23 |
| 4.4. Número de células BrdU-positivas na região CA1 da Formação Hipocampal em ratos Wistar fêmeas de 11 dias..... | 24 |
| 4.5. Número de células BrdU-positivas no <i>Locus Coeruleus</i> em ratos Wistar fêmeas de 11 dias..... | 26 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 29 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 32 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |

ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

AVP: Arginina-Vasopressina

AVPV: Núcleo Periventricular Anteroventral

BNDF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CA1: Corno de Ammon 1

CA2: Corno de Ammon 2

CA3: Corno de Ammon 3

CCK: Colecistocinina

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina

DAB: Diaminobenzidina

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EPM: Erro Padrão da Média

GD: Giro Denteado

GnRH: Hormônio liberados das gonadotrofinas

GR: Receptores Glicocorticóides

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPG: Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

LC: *Locus Coeruleus*

LH: Hormônio Luteinizante

LHRH: Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante

M: Manipulados

MePD: Amígdala Medial Pôstero-Dorsal

MPOA: Área Pré-Óptica Medial

NA: Noradrenalina

NM: Não-Manipulados

OX: Ocitocina

PBS: Solução Tampão Fosfato

PVN: Núcleo Paraventricular

PVNm: Núcleo Paraventricular divisão magnocelular

PVNp: Núcleo Paraventricular divisão parvocelular

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

SDN-POA: Núcleo sexualmente dimórfico da Área Pré-Óptica Medial

SNC: Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização da Área Pré-Óptica Medial (Paxinos & Watson, 1997).
- Figura 2** – Localização do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (Paxinos & Watson, 1997).
- Figura 3** – Localização da Formação Hipocampal (Paxinos & Watson, 1997).
- Figura 4** – Localização do *Locus Coeruleus* (Paxinos & Watson, 1997).
- Figura 5** - A estrutura halopirímidica do BrdU.
- Figura 6** – Peso corporal (em gramas) no 8º, 10º e 11º dia pós-natal de filhotes Wistar fêmeas que receberam injeções intraperitoneais de BrdU, não-manipulados ou manipulados, no período neonatal.
- Figura 7** – Número de células BrdU positivas (média \pm EPM) na Área Pré-Óptica Medial em um intervalo de 8 cortes de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal.
- Figura 8** – Número de células BrdU positivas (média \pm EPM) no núcleo Paraventricular do Hipotálamo em um intervalo de 8 cortes, de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal.
- Figura 9** – Número de células BrdU positivas (média \pm EPM) na região CA1 da formação hipocampal em um intervalo de 8 cortes de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal.
- Figura 10** – Número de células BrdU positivas em um intervalo de seis cortes (média \pm EPM) no *Locus Coeruleus* de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal.

RESUMO

A manipulação neonatal ocasiona alterações comportamentais frente a situações estressantes, mostrando animais hiporresponsivos ao estresse, exibindo uma menor reatividade emocional, uma menor taxa de defecação e maior exploração que os não-manipulados quando colocados em um ambiente novo, mesmo que este inclua seu predador natural, como no caso do campo aberto com predador (Levine *et al.*, 1967; Padoin *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004). A manipulação neonatal prejudica ainda a função reprodutiva dos animais na idade adulta, seja na exibição do comportamento sexual em machos e em fêmeas, ou na redução ou bloqueio da ovulação e exibição de ciclos anovulatórios pelas fêmeas (Gomes *et al.*, 1999). Outro efeito bastante marcante é observado na morfologia do encéfalo destes animais, dando suporte neural às alterações comportamentais e neuroendócrinas observadas nestes animais.

O presente trabalho teve por objetivo verificar se a redução do número de neurônios em animais de 11 e 90 dias, constatada na área pré-óptica medial, no *locus coeruleus* e no núcleo paraventricular do hipotálamo dos animais manipulados quando comparados aos não-manipulados, deve-se a uma redução da proliferação celular nestes núcleos aos 11 dias de idade, e se o aumento do número de neurônios na região CA1 da formação hipocampal observado nos animais manipulados quando comparados aos não-manipulados, se deve ao aumento da proliferação celular no animais manipulados também aos 11 dias de idade, logo após o término da manipulação neonatal.

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas do biotério central da UFRGS, sendo os filhotes divididos em dois grupos: Não-Manipulados e Manipulados, dos quais utilizamos os filhotes fêmeas. Para o estudo das regiões de interesse o encéfalo dos animais foi retirado após perfusão, incluído em parafina, fatiado em um micrótomo, submetido a imunistoquímica para o BrdU, sendo o número de células contado com auxílio de um microscópio óptico.

Os resultados do presente trabalho indicaram, através do uso do BrdU como marcador de proliferação celular, que a mesma encontra-se de fato alterada nas fêmeas manipuladas, sendo menor na área pré-óptica medial, núcleo paraventricular e *locus coeruleus* e maior na região CA1 da formação hipocampal. O registro de um menor número de células nestas estruturas não extingue a possibilidade de morte celular ocorrendo de forma concomitante a esta diminuição da proliferação celular observada neste trabalho.

De maneira mais geral, a principal conclusão deste trabalho é a de que a manipulação neonatal, leva a alterações de longo prazo na morfologia do encéfalo destes filhotes, as quais são mantidas mesmo durante a idade adulta, mas que se iniciam durante a infância, nestes primeiros 10 dias de vida em que o animal recebe o estímulo da manipulação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Homeostase e Estresse

A homeostase é definida como um estado de equilíbrio dinâmico e complexo, necessário para a manutenção da vida. Este equilíbrio é constantemente ameaçado por fatores intrínsecos e extrínsecos como, por exemplo, os estressores. Assim, o estresse pode ser definido como um estado de desequilíbrio da homeostase (Chrousos & Gold, 1992). Os organismos, quando expostos a situações de ameaça e perigo como estressores, respondem com uma série de respostas adaptativas, que se opõem a estes estímulos estressores na tentativa de manter a homeostase (Chrousos & Gold, 1992).

O pesquisador Hans Selye foi um dos pioneiros nos estudos abordando a fisiologia e patofisiologia envolvidas no estresse, definindo o estresse como uma resposta não específica do organismo frente a um estímulo (definido como estressor). Em seus estudos foram enfatizadas as respostas integradas de múltiplos sistemas de um organismo. Mesmo que todos os órgãos sejam afetados quando um organismo rompe seu estado de homeostasia, existem aqueles que são os primeiros a sofrerem as alterações funcionais, tais como os sistemas neuroendócrino, cardiovascular, imune e gastrointestinal (Selye, 1976).

Quando um organismo é submetido a uma situação de estresse, há uma resposta clássica, a resposta do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), que se inicia através dos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, os quais sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), os quais atuam na hipófise anterior, promovendo a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sanguínea sistêmica, e este por sua vez estimula a secreção de glicocorticóides (corticosterona nos ratos e cortisol nos humanos) pelo córtex da glândula adrenal (Francis *et al.*, 1996; Tsigos & Chrousos, 2002).

O estresse induz ainda a ativação do sistema autônomo simpático, promovendo a descarga periférica de noradrenalina (NA), importante para que o organismo seja capaz de prover substratos energéticos durante o estresse, o que por sua vez é importante para a resposta clássica de luta-ou-fuga (Kopin, 1995). O estresse também induz a secreção de NA em todo o encéfalo, sendo que grande parte desta noradrenalina central secretada em resposta ao estresse origina-se no *locus coeruleus*, que é extremamente sensível à maioria dos estímulos estressantes (Melia & Duman, 1991; Tsigos & Chrousos, 2002).

1.2. Período Hiporresponsivo ao Estresse

Em roedores, as duas primeiras semanas de vida representam um período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que, nesta fase ainda ocorrem processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte de células neste sistema (Mistretta & Bradley, 1978, Schmidt *et al.*, 2002). Desta forma a manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento dos roedores é essencial para um desenvolvimento normal do sistema nervoso.

A administração de glicocorticóides interfere no crescimento e diferenciação promovendo alterações permanentes neste indivíduo (Levine, 2001). Altas concentrações de glicocorticóides causam diminuição da mitose, mielinização, neuromorfogênese (Bohn, 1980) e alterações comportamentais e neuroquímicas no adulto (González *et al.*, 1990).

Entretanto, apesar das respostas estereotipadas do estresse na idade adulta, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal do roedor, quando um estímulo estressante é aplicado ao animal, observa-se um pequeno ou nenhum aumento da secreção de ACTH e corticosterona (Walker *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2002). Por esta razão este período é chamado de Período Hiporresponsivo ao Estresse (Guillet *et al.*, 1980; Sapolsky & Meaney, 1986; Suchecki *et al.*, 1993; Levine, 1994), um período no qual o eixo HPA está hiporresponsivo. Este período também é caracterizado por concentrações plasmáticas basais de corticosterona e ACTH muito baixas (Walker *et al.*, 1986; Grino *et al.*, 1989; Levine, 1994).

1.3. Manipulação Neonatal

O ambiente que envolve o animal no período neonatal, assim como a relação mãe-filhote neste período, podem influenciar na promoção de efeitos estáveis e de longo prazo no comportamento e no sistema neuroendócrino deste animal (Levine *et al.*, 1967; Francis *et al.*, 1999; Meerlo *et al.*, 1999).

Em roedores, a estimulação dos filhotes através da manipulação humana, no modelo experimental denominado manipulação neonatal ou *neonatal handling*, vem sendo utilizada para examinar os mecanismos pelos quais variações do ambiente durante o período neonatal poderiam afetar o desenvolvimento de sistemas neurais durante este período (Anand *et al.*, 1999; Abraham & Kovacs, 2000; Anand & Scalzo, 2000; Zhang *et al.*, 2002), dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis, persistentes ao longo da vida do animal (Levine, 1962; Denenberg, 1964; Caldji *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2000). Nestes animais, a estimulação neonatal consiste tipicamente na manipulação dos filhotes por um ou alguns minutos, em geral, durante as duas primeiras semanas de vida, no período dito hiporresponsivo ao estresse.

1.4. Manipulação Neonatal e Respostas ao Estresse

A manipulação neonatal ocasiona alterações comportamentais bastante evidentes frente a situações estressantes, mostrando que esses animais são hiporresponsivos ao estresse, uma vez que os animais manipulados exibem uma menor reatividade emocional, tem uma menor taxa de defecação e exploram mais que os não-manipulados quando colocados em um ambiente novo ou em um novo paradigma experimental, mesmo que este inclua seu predador natural, como no caso do campo aberto com predador (Levine *et al.*, 1967; Meerlo *et al.*, 1999, Padoin *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004).

A manipulação neonatal altera de forma permanente a resposta do eixo HPA frente a estímulos estressantes. Quando adultos, os animais manipulados no período neonatal sintetizam e secretam menores quantidades de hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), ACTH e corticosterona (o principal glicocorticóide dos ratos) em

resposta a uma gama de estressores, além de exibir um retorno aos níveis basais destes hormônios mais rápido, após o término do estímulo (Levine *et al.*, 1967; Plotsky & Meaney, 1993; Liu *et al.*, 2000).

Os glicocorticóides atuam em vários locais do SNC, com atividade inibitória, através de uma retroalimentação negativa sobre a síntese de fatores-liberadores hipotalâmicos para ACTH, em especial o CRH e o hormônio arginina-vasopressina. Os animais manipulados no período neonatal apresentam uma maior sensibilidade a esta retroalimentação negativa exercida pelos glicocorticóides se comparados a animais não-manipulados e portanto, uma diminuição da expressão de RNAm de CRH e AVP hipotalâmicos (Plotsky & Meaney, 1993).

O efeito da manipulação neonatal na sensibilidade a retroalimentação é mediado por um aumento na expressão de receptores para glicocorticóides (GR) na formação hipocampal destes animais, uma região intimamente envolvida com a regulação desta retroalimentação negativa (Liu *et al.*, 1997). Assim, o aumento da expressão de receptores glicocorticóides é uma característica central do efeito da manipulação neonatal sobre a responsividade do eixo HPA ao estresse, resultando em um aumento da retroalimentação negativa da síntese de CRH e AVP e diminuição da liberação de ACTH, com conseqüente liberação diminuída de corticosteróides, normalmente liberados durante uma situação de estresse.

Outro efeito da manipulação neonatal sobre a secreção hormonal frente a um estressor pode ser observado com relação a prolactina, um hormônio protéico com vários efeitos biológicos, atuando na reprodução, na homeostase, no sistema imune, sendo que sua secreção é afetada por estímulos ambientais e um estímulo estressante é capaz de aumentar esta secreção. Porém, quando expostas a um paradigma de estresse por vapor saturado de éter, fêmeas adultas manipuladas no período neonatal, na fase diestro do ciclo estral, apresentam uma secreção de prolactina significativamente menor do que fêmeas não-manipuladas, sendo que o mesmo é observado nos machos adultos manipulados no período neonatal se comparados aos machos não-manipulados (Severino *et al.*, 2004).

1.5. Manipulação Neonatal e Comportamento Sexual

A manipulação neonatal prejudica ainda a função reprodutiva dos animais na idade adulta, na exibição do comportamento sexual em machos e em fêmeas (Padoin *et al.*, 2001), e na redução ou bloqueio da ovulação e exibição de ciclos anovulatórios pelas fêmeas (Gomes *et al.*, 1999), o que indica que os esteróides ovarianos produzidos durante o período pré-ovulatório provavelmente não estariam sendo efetivos no exercício de seus efeitos periféricos, sugerindo que a manipulação neonatal afetaria substratos neurais que modulam também o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), além do eixo HPA. O sistema central noradrenérgico, com o *locus coeruleus* como núcleo de importância central, é possivelmente um dos sistemas neurais afetados pela manipulação neonatal, parecendo não responder adequadamente ao estrógeno periférico, levando a uma disfunção na secreção do LH, o que poderia explicar a ocorrência de ciclos anovulatórios e menor taxa de exibição de comportamento sexual nas fêmeas manipuladas no período neonatal.

Sendo que a perpetuação da espécie e a procriação são processos complexos, nos quais eventos fisiológicos e comportamentais devem ocorrer de modo sincrônico para que haja a produção e liberação de gametas, torna-se necessário à presença de mecanismos neurais e endócrinos íntegros participando deste fenômeno. Se tais mecanismos estiverem alterados, possivelmente aqueles comportamentos relacionados com a preservação da espécie estarão comprometidos, sendo este um dos efeitos prejudiciais da manipulação neonatal.

O CRH tem sido proposto como um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse e pela manipulação neonatal através de uma ação direta nos núcleos do hipotálamo, inibindo a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) (Caraty *et al.*, 1997). O GnRH é um peptídeo imprescindível ao controle da secreção de gonadotrofinas, principalmente o LH e, portanto, para a função gonadal nas fêmeas.

Já o estradiol e a progesterona plasmáticos basais não diferem entre fêmeas manipuladas e não-manipuladas, assim como a concentração de testosterona plasmática basal dos machos manipulados não é estatisticamente diferente da dos machos não-manipulados (Severino *et al.*, 2004). Entretanto, após o comportamento sexual, as fêmeas manipuladas exibem uma menor concentração plasmática de progesterona, se comparadas as fêmeas não-manipuladas no mesmo período (Gomes *et al.*, 2006a),

sendo que nesta circunstância uma alta concentração plasmática de progesterona seria essencial para o sucesso reprodutivo, uma vez que este hormônio é necessário para a implantação e manutenção do blastocisto na parede uterina durante a gestação (Adler *et al.*, 1970).

1.6. Manipulação Neonatal e Morfologia do Encéfalo

Outros efeitos bastante marcantes da manipulação neonatal são observados na morfologia do encéfalo destes animais, dando suporte neural às alterações comportamentais e neuroendócrinas observadas nestes animais. A manipulação neonatal induz a uma redução permanente em torno de 35% do número das células nervosas do *locus coeruleus* em ratos de 11, 26, 35 e 90 dias de idade, tanto em machos quanto em fêmeas (Lucion *et al.*, 2003). Considerando o efeito plástico que a manipulação neonatal induz no *locus coeruleus* através da redução do número de células deste núcleo noradrenérgico, poderia se supor que outras estruturas centrais de controle da ovulação também estariam sendo afetadas por aquela intervenção de estresse no início da vida.

Além disso, também se observa uma redução no número de neurônios na região parvocelular dos núcleos paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, da área pré-óptica medial e núcleo periventricular anteroventral também do hipotálamo, e um aumento na densidade de neurônios na região CA1 da formação hipocampal (lado esquerdo). No entanto, os experimentos não revelaram efeitos da manipulação neonatal sobre os neurônios e células gliais da amígdala, exceto da subdivisão ou subnúcleo da amígdala medial pósterodorsal (MePD) (Winkelmann-Duarte, 2004, Camozzato, 2006).

Com base nestes trabalhos anteriores de nosso laboratório, realizados para esclarecer as alterações morfológicas no encéfalo, envolvidas com a manipulação neonatal, escolhemos os núcleos do encéfalo que seriam estudados neste trabalho, para verificar a proliferação celular nos animais manipulados, utilizando a técnica da imunoistoquímica para o BrdU, um análogo da base nitrogenada timina, já descrito como um bom marcador de proliferação celular e neurogênese em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso.

1.6.1. Área pré-óptica medial (MPOA)

A área pré-óptica medial é uma estrutura chave para o controle da reprodução nos roedores machos e fêmeas. Essa área inclui os núcleos mediano, medial, ventromedial e periventricular além de uma zona indiferenciável, sendo uma região bastante complexa, tanto funcional, quanto anatomicamente (Kiss *et al.*, 2003). Esta área é composta por neurônios que secretam hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) (Barry *et al.*, 1985; Merchenthaler *et al.*, 1989), e estes neurônios, por sua vez, possuem receptores andrógenos e estrógenos (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue & Merchenthaler, 2001).

A área pré-óptica medial tem um papel importante no controle neural da reprodução, em ambos os sexos, no controle da secreção das gonadotrofinas pela hipófise (Freeman, 1994) e, portanto, no comportamento sexual (Meisel & Schas, 1994).

Nos roedores, uma das regiões sexualmente dimórficas mais proeminentes em volume é a região central da área pré-óptica medial, freqüentemente chamada de núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica medial (SDN-POA), o qual é significativamente maior nos machos que nas fêmeas (Bloch & Gorski, 1988; Dohler *et al.*, 1984). Esta diferença depende ainda, e pode ser manipulada por, esteróides gonadais durante o período crítico de desenvolvimento do encéfalo. A coloração de *Nissl* (Gorski *et al.*, 1978) e a imunohistoquímica anti-calbidina (um marcador específico para SDN-POA) (Sickel & McCarthy, 2000), revelam que a SND-POA é repleta de neurônios, que dão oportunidade para ações de neuropeptídeos, como a somatostatina.

O desenvolvimento do dimorfismo sexual nesta região sexualmente dimórfica da MPOA vem sendo atribuído a uma maior incidência de apoptose nas fêmeas se comparadas aos machos, na região central da área pré-óptica medial, nos dias 8 a 10 de vida do animal; a testosterona e o estrógeno previnem a apoptose durante este período (Davis *et al.*, 1996).

Nos animais manipulados, além de uma diminuição do número de neurônios na MPOA, observa-se uma menor densidade de receptores para Ang II nesta área (Gomes *et al.*, 2006b), um fato que pode explicar o maior conteúdo de LHRH na MPOA e a redução do pico de LH na tarde do proestro e, conseqüentemente, os ciclos estrais anovulatórios observados em fêmeas manipuladas no período neonatal (Gomes *et al.*, 1999). Uma vez que a Ang II estimula a liberação de LHRH da MPOA (Dornelles &

Franci, 1998), a menor densidade de receptores para Ang II na MPOA poderia diminuir a ação excitatória da Ang em neurônios LHRH da MPOA.

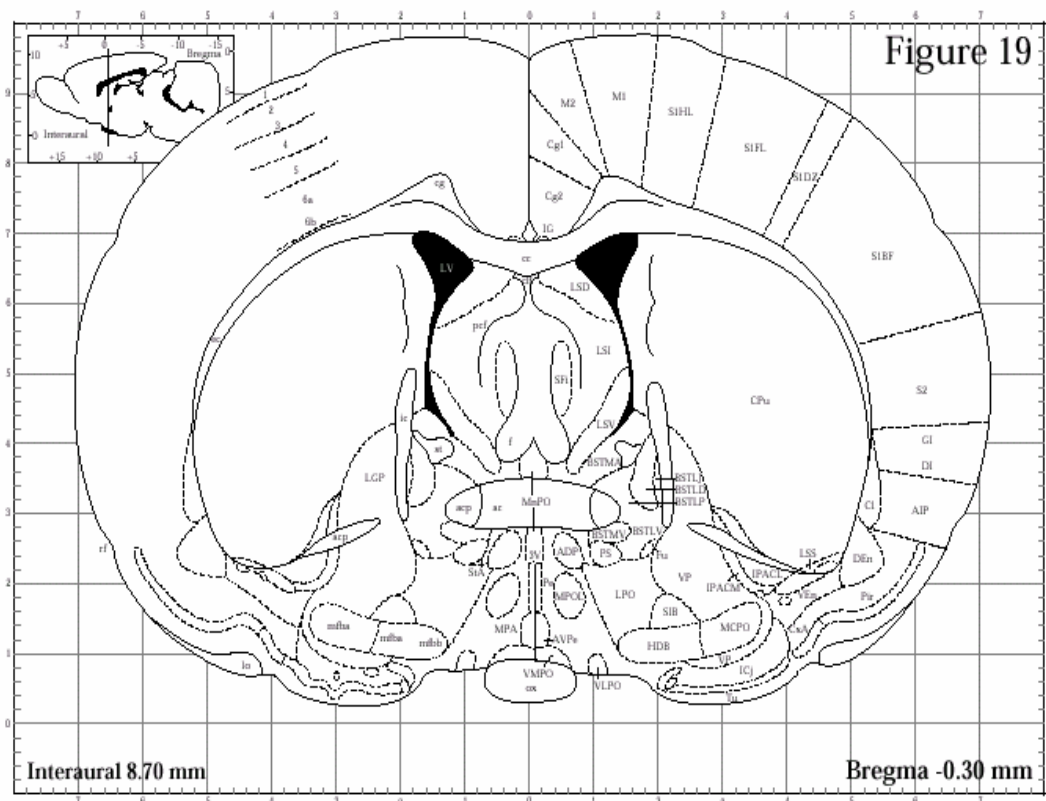


Figura 1 – Localização da Área Pré-Óptica Medial (Paxinos & Watson, 1997).

1.6.2. Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)

O núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo tem um papel muito importante na coordenação de respostas a estressores (Rivier *et al.*, 1982). As informações sensoriais relacionadas ao estresse convergem para a secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) de neurônios localizados no PVN para iniciar uma cascata de efeitos neuroendócrinos. O CRH estimula por sua vez a liberação de ACTH da hipófise e conseqüente liberação de corticosterona pelo córtex da glândula adrenal ativando desta forma o eixo HPA, originando uma resposta clássica ao estresse (Herman *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 2002).

O PVN localiza-se lateralmente ao III ventrículo e divide-se de forma clássica em uma região magnocelular (PVNm) e uma parvocelular (PVNp). Estas regiões são subdivididas em três magnocelulares (anterior, medial e posterior) e 5 parvocelulares

(anterior, medial lateral, dorsal e periventricular). Neurônios magnocelulares estão diretamente relacionados com a liberação dos peptídeos ocitocina (OX) e vasopressina (AVP) da neurohipófise dentro da circulação sistêmica, comandando desta forma a lactação, o parto, controle da pressão arterial e o balanço eletrolítico do organismo. Estes peptídeos magnocelulares liberados na circulação porta-hipofisária podem ser liberados frente a estímulos estressantes e parecem modular a secreção de ACTH em determinadas circunstâncias (Plotsky *et al.*, 1985), porém a integração dos efeitos destes peptídeos com a atividade do eixo HPA durante o estresse ainda precisam ser esclarecidas.

Neurônios do componente dorsolateral da parte medial do PVNp projetam-se para a eminência media e liberam CRH; estes neurônios compreendem o efeito endócrino para a liberação de ACTH. Neurônios da região dorsal do PVNp, da parte ventral do componente medial do PVNp e o componente lateral do PVNp projetam-se para o tronco encefálico e circuitos autonômicos da medula espinhal e parecem integrar o fluxo do sistema nervoso simpático e parassimpático (Sawchenko & Swanson, 1981; Whitnall, 1993). Estas regiões do PVNp podem também regular a ativação do eixo HPA indiretamente via modulação do tônus cardiovascular e diretamente via inervação para o próprio córtex da adrenal (Jasper & Engeland, 1997). Assim, enquanto os neurônios CRH agem como mediadores primários na secreção de ACTH, as populações de neurônios considerados pré-autônomos e também os neurônios magnocelulares contribuem na integração do PVN como moduladores das respostas do estresse (Herman *et al.*, 2002).

Com o procedimento da manipulação neonatal, além de uma diminuição do número de neurônios no núcleo paraventricular, também observa-se uma menor densidade de receptores para angiotensina II (Ang II) neste núcleo (Gomes *et al.*, 2006b). Uma vez que a angiotensina central ativa o eixo HPA, estimulando a secreção de CRH na resposta ao estresse (Saavedra *et al.*, 2004), essa densidade de receptores diminuída pode ser um dos fatores que ocasionam respostas diminuídas comportamentais e do eixo HPA frente a situações estressantes nos animais manipulados no período neonatal.

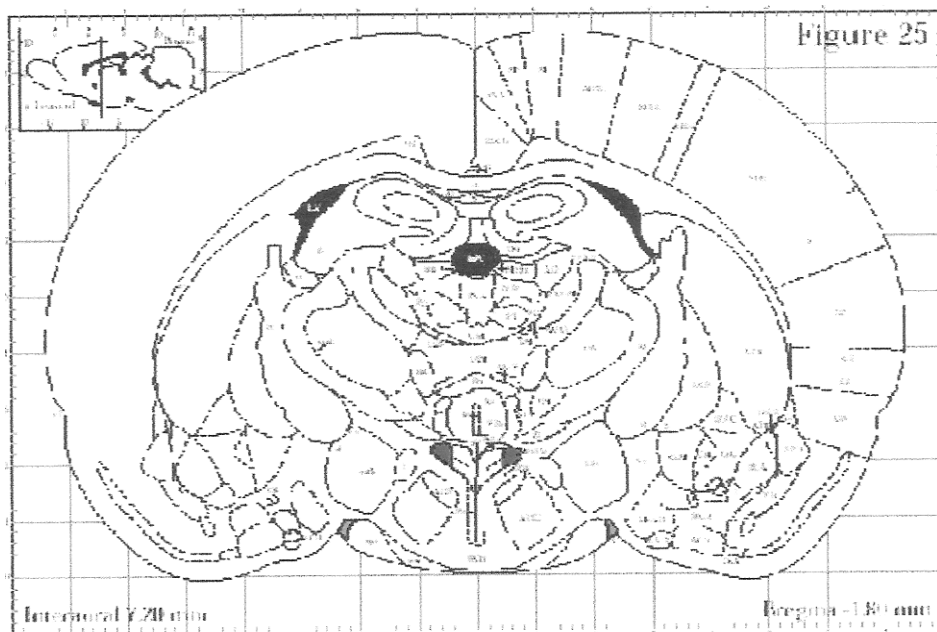


Figura 2 – Localização do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (Paxinos & Watson, 1997).

1.6.3. Formação Hipocampal

A formação hipocampal ou hipocampo é uma estrutura do sistema nervoso central, localizada no lobo temporal de cada hemisfério encefálico, que está diretamente relacionada a funções de aprendizagem e memória, participando também da neurocircuitaria do estresse (Roosendal *et al.*, 2003). Em termos citoarquitetônicos, o hipocampo é formado por dois grandes grupamentos de células que são divididos em duas camadas celulares principais: as células granulares, que formam o giro denteado, e a camada de células piramidais CA1, CA2 e CA3 do próprio hipocampo (Swanson *et al.*, 1987).

A diminuição do número de receptores para glicocorticóides no hipocampo, comprovadamente induzida pela manipulação neonatal, mostra que este núcleo do sistema nervoso central pode ser afetado por estímulos externos que alteram o estado de homeostasia do organismo (Meaney *et al.*, 1993). Várias substâncias podem ser liberadas pelo sistema nervoso em decorrência de um estímulo de estresse. Entre elas estão os glicocorticóides, secretados pela glândula supra-renal e que, por sua vez, depois de serem liberados na circulação sistêmica e penetrarem na barreira hemato-encefálica, agem nos receptores do hipocampo (Pavlidis & McEwen, 1999). O hipocampo é um

dos maiores mediadores do mecanismo de retroalimentação negativa sobre o eixo HPA, também participa em processos cognitivos e comportamentais modulados por corticosteróides.

Receptores do tipo I (mineralocorticóides) e do tipo II (glicocorticóides) são expressos nas células piramidais dos Cornos de Ammon (CA1, CA2 e CA3) e nas células granulosas do giro denteado (GD). A ativação desses receptores medeia uma variedade de efeitos, tais como regulação da arborização e do comprimento dos dendritos nas células piramidais do CA e a reposição de neurônios no GD (McEwen *et al.*, 2002). Os glicocorticóides podem levar os neurônios a ficarem morfologicamente não-responsivos a estímulos, inibindo a arborização dendrítica, uma vez que suprimem a resposta de aumento de atividade promovida pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Campbell & MacQueen, 2004).

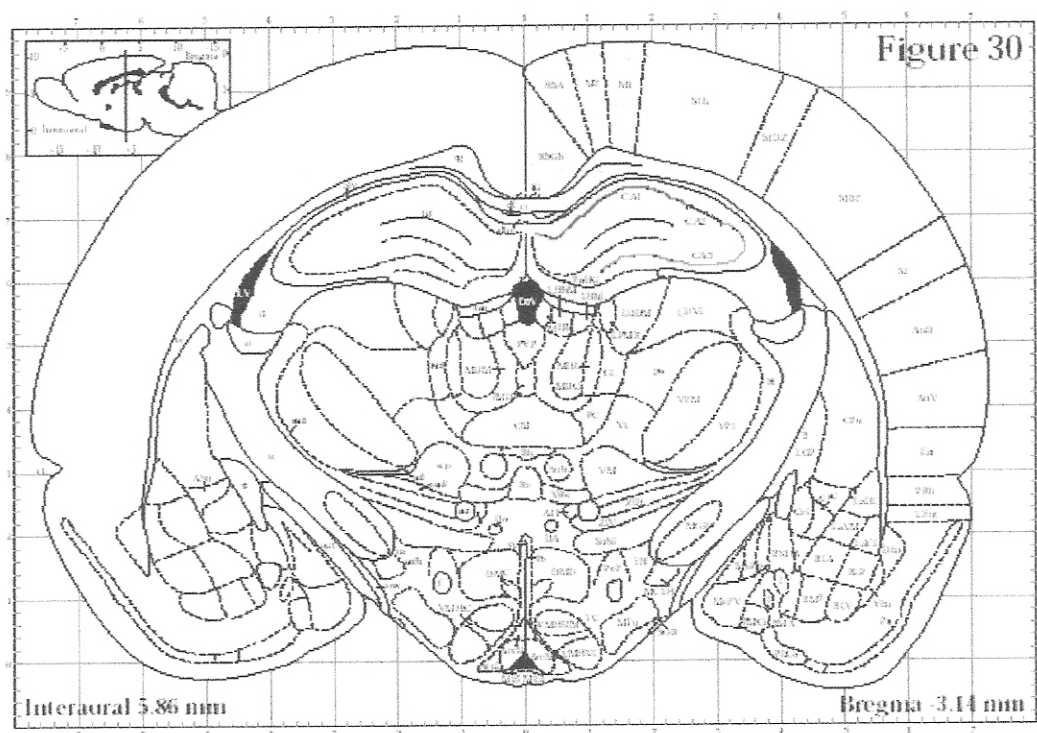


Figura 3 – Localização da Formação Hipocampal (Paxinos & Watson, 1997).

1.6.4. *Locus Coeruleus*

O *locus coeruleus* (LC), também conhecido como núcleo A6, localiza-se no tegmento dorsolateral da ponte, no tronco encefálico, bilateralmente ao IV ventrículo, e

tem o principal grupamento de neurônios noradrenérgicos do SNC. Este núcleo tem uma ação ampla e difusa em várias estruturas do sistema nervoso. Nos ratos, todo o *locus coeruleus* possui em torno de 1500 neurônios (Aston-Jones *et al.*, 1995; Foote *et al.*, 1983).

Os estudos da morfologia celular do *locus coeruleus* identificaram neurônios fusiformes médios, que projetam-se principalmente para o córtex cerebral e para a formação hipocampal e neurônios grandes multipolares que enviam projeções para a medula espinal e para os núcleos hipotalâmicos (Aston-Jones *et al.*, 1995; Cunningham & Sawchenko, 1998; Loughlin *et al.*, 1986). A atividade deste núcleo é marcadamente sincronizada, produzindo uma liberação coordenada do neurotransmissor noradrenalina (NA) no SNC.

Além de ser ativado por estímulos estressantes (Kaufman *et al.*, 2000; Pacák & Palkovits, 2001; Van Bockstaele *et al.*, 2001), o *locus coeruleus* participa do controle da secreção do hormônio luteinizante (LH), sendo assim um importante modulador do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Uma estimulação elétrica no *locus coeruleus* potencializa a liberação de LH induzida pela estimulação da área pré-óptica medial (Gitler & Barraclough, 1987). Também demonstrou-se que uma lesão eletrolítica do LC diminui o conteúdo de NA no hipotálamo basal medial e bloqueia a liberação pulsátil de LH em ratas ovariectomizadas, o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, assim como o pico induzido por esteróides nestas ratas ovariectomizadas (Anselmo-Franci *et al.*, 1997; Anselmo-Franci *et al.*, 1999; Franci & Antunes-Rodrigues, 1985; Helena, *et al.*, 2002). Estes bloqueios de picos hormonais são acompanhados por um aumento no conteúdo de hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) na área pré-óptica medial, sugerindo que o LHRH não é liberado de forma normal no período de pico de gonadotrofinas nos animais lesionados (Helena *et al.*, 2002).

O *locus coeruleus* tem sua morfologia alterada nos animais manipulados no período neonatal, os quais possuem um menor número de neurônios, assim como um menor volume do núcleo, quando comparados a animais não-manipulados no mesmo período, uma alteração bastante marcante tanto em fêmeas, quanto em machos (Lucion, *et al.*, 2003).

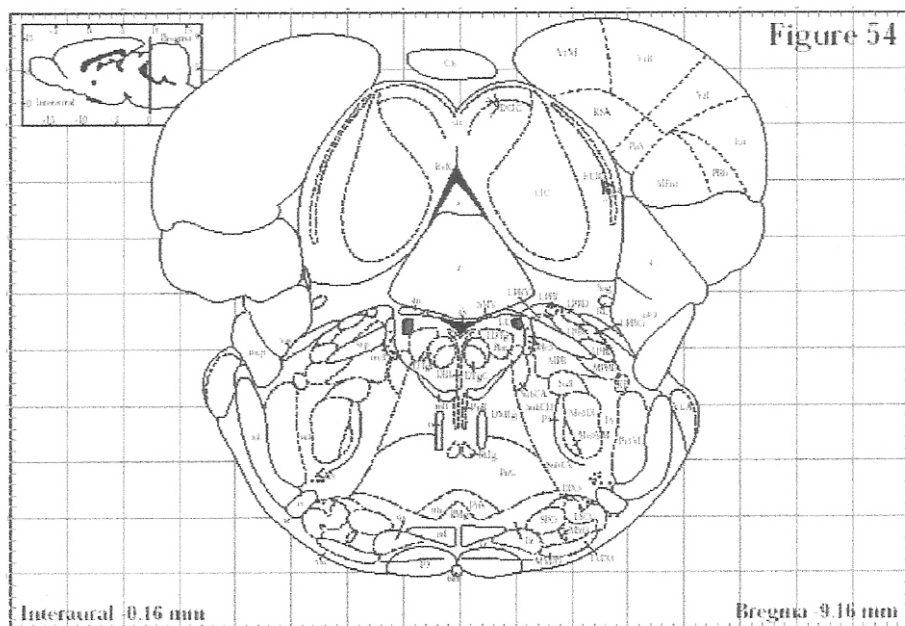


Figura 4 – Localização do *Locus Coeruleus* (Paxinos & Watson, 1997).

1.7. Neurogênese e proliferação celular

A neurogênese ocorre normalmente somente em áreas limitadas do encéfalo de mamíferos adultos como o hipocampo (Altman & Das, 1965; Taupin, 2007) e o bulbo olfatório (Altman, 1969; Luskin, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1993, Taupin, 2007) mas as funções desses novos neurônios e os mecanismos que controlam seu nascimento ainda precisam ser mais estudados. Uma ferramenta importante para o estudo da neurogênese e da proliferação celular, foi a introdução de análogo sintético da base nitrogenada timina, o BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina). Como a timina, o BrdU é incorporado ao DNA das células durante a fase S da mitose, marcando as células em proliferação, assim como a sua progênie. Esta marcação pode ser visualizada com técnicas imunocitoquímicas e não requer necessariamente o uso de autoradiografia.

O BrdU é uma halopirimidina, como mostra a figura 1, originalmente utilizada como um agente antineoplásico e antiviral (Freese *et al.*, 1994), sendo utilizado alternativamente para determinar o índice de proliferação em tumores (Struikmans *et al.*, 1997). A marcação por BrdU vem sendo bastante utilizada para estudar a neurogênese adulta *in situ*. Entretanto, seu uso tem certas limitações, uma vez que ele é tóxico e mutagênico, induzindo uma série de efeitos colaterais.

Além disso, o BrdU é um marcador direto da síntese de DNA e não da proliferação celular no encéfalo de animais adultos, podendo ser incorporado durante outros processos celulares que envolvem síntese de DNA, como reparo celular, morte celular, duplicação gênica ou mesmo uma divisão celular incompleta, portanto o uso do BrdU como marcador da neurogênese em animais adultos está sujeito a falhas (Taupin, 2007).

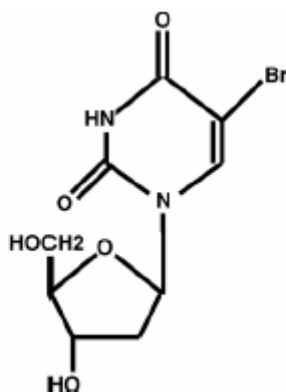


Figura 5 – A estrutura halopirimidica do BrdU.

Experimentos já apontaram que o ambiente em que o animal está inserido, não só no período neonatal, mas também na idade adulta, influencia diretamente o surgimento destes novos neurônios, comprovando que animais que vivem em ambientes mais ricos, como gaiolas com rodas de corrida e outros animais, tem uma taxa de neurogênese significativamente maior que aqueles que vivem em gaiolas comuns (Kempermann *et al.*, 1997). Outros experimentos demonstraram que as experiências no período neonatal, como a estimulação dos filhotes e a separação materna, afetam a regulação da neurogênese no hipocampo, mais especificamente ocasionando uma diminuição na proliferação celular e uma produção de neurônios imaturos no giro denteado, em animais adultos que foram separados das mães no período neonatal (Mirescu *et al.*, 2004).

Porém, na literatura há poucos trabalhos que correlacionem a estimulação tátil dos filhotes com a proliferação celular ou mesmo com a neurogênese em seu encéfalo quando adulto ou mesmo durante seu desenvolvimento. Uma vez que a manipulação neonatal é um procedimento de estimulação dos filhotes num período de diferenciação e proliferação celular do sistema nervoso central, com este trabalho tivemos como

objetivo testar a hipótese de que a diminuição do número de células em alguns núcleos do encéfalo nos animais manipulados no período neonatal, constatada em experimentos prévios do nosso laboratório (Lucion *et al.*, 2003; Winkelmann-Duarte, 2004), é devida a uma redução da neurogênese e da proliferação celular, ou se o aumento do número celular na formação hipocampal tem relação ao aumento destas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo principal verificar se a redução do número de neurônios observada em animais de 11 e 90 dias, constatada na área pré-óptica medial, no *locus coeruleus* e no núcleo paraventricular do hipotálamo dos animais manipulados quando comparados aos não-manipulados, deve-se a uma redução da proliferação celular nestes núcleos aos 11 dias de idade, e se o aumento do número de neurônios na região CA1 da formação hipocampal observado nos animais manipulados quando comparados aos não-manipulados, se deve ao aumento da proliferação celular nos animais manipulados também aos 11 dias de idade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste experimento foram utilizadas ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério central da UFRGS, que foram levadas para o biotério laboratorial cerca de uma semana antes do parto, onde foram colocadas em caixas individuais e observadas diariamente para determinar o dia do nascimento dos filhotes. No dia do nascimento (dia 0) o número de filhotes foi padronizado em 8 por ninhada, através da remoção aleatória para se ter o mínimo de contato possível com os mesmos e suas mães. No dia seguinte (dia 01) iniciamos o procedimento da manipulação neonatal, que foi efetuado por 10 dias.

Todos os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 6:00 as 18:00), com temperatura ambiente de 22 ± 1 °C e com água e comida *ad libitum* (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brasil).

3.2. Grupos Experimentais

Ratas Wistar fêmeas foram estudadas aos 11 dias de idade, logo após o término do procedimento de manipulação neonatal. Os animais foram divididos em dois grupos:

Não-manipuladas (n = 6): animais que não receberam nenhum estímulo durante o período neonatal, nem mesmo limpeza de suas caixas moradia (do nascimento até os 11 dias de idade).

Manipuladas (n = 7): animais que foram manipulados durante os dez primeiros dias de vida pós-natal, sendo que o dia do nascimento foi considerado como dia zero. Antes da realização da manipulação, a caixa com os filhotes e a mãe foi retirada do biotério e levada a uma sala anexa a este. Primeiro, a mãe era colocada em uma caixa próxima da caixa moradia e o experimentador manipula todos os filhotes juntos, usando as mãos

cobertas por luvas de látex, durante um minuto, marcado com ajuda de um cronômetro, por um período de 10 dias e em horários aleatórios durante o fotoperíodo claro, evitando um padrão temporal fixo da estimulação. O tempo total entre a separação da mãe e a devolução dela aos filhotes levou em torno de dois minutos. Após os filhotes serem devolvidos ao ninho e a mãe devolvida a caixa moradia, esta foi levada novamente ao biotério. O procedimento de manipulação neonatal está de acordo com modelos clássicos sobre estimulação por manipulação (Denenberg *et al*, 1964).

3.3. Injeções de BrdU

No 8^o e no 10^o dia pós-natal, um filhote fêmea de cada ninhada foi pesado, identificado com caneta cirúrgica (Codman – Johnson's) e recebeu injeções intraperitoniais de BrdU (5-Bromo-2'-deoxiuridina), 1mL/100g de peso corporal (*Amersham Biosciences*), para efetuar a marcação celular a ser observada posteriormente na imunohistoquímica.

3.4. Procedimento cirúrgico

No 11^o dia de vida os animais foram novamente pesados, anestesiados profundamente com tiopental (0,1ml/100g de peso corporal) e perfundidos primeiramente com uma solução salina composta de água destilada, sais e tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, contendo heparina, para limpar o tecido e evitar a formação de coágulos durante a perfusão, e posteriormente pela solução fixadora composta de paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4. O encéfalo foi então removido cuidadosamente da caixa craniana e levado para a pós-fixação por 8 horas, na mesma solução de paraformaldeído 4% utilizada durante a perfusão.

3.5. Procedimentos histológicos

Depois de pós-fixados os encéfalos foram lavados por 30 minutos em água destilada e desidratados em banhos de 45 minutos em álcool (nas concentrações de

50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), em seguida passaram por três banhos de 45 minutos cada um em xilol e 2 banhos de 45 minutos cada um em resina (*Histosec - Merck*) na estufa a cerca de 55°C, onde eram incluídos em um terceiro banho na sua posição final, sendo retirados da estufa.

Os encéfalos foram então fatiados em secções coronais de 5 µm com auxílio de um micrótomo, um banho-maria com água destilada a cerca de 45 °C e um atlas do encéfalo do rato (Paxinos & Watson, 1997), de modo a nos possibilitar o estudo das seguintes áreas: *locus coeruleus*, área pré-óptica medial, núcleo paraventricular do hipotálamo e região CA1 da formação hipocampal.

Os cortes foram coletados em lâminas previamente tratadas com organo-silano, de modo a facilitar sua fixação, e mantidos em estufa, a cerca de 37 °C, até o momento de iniciar a imunohistoquímica.

Para a imunohistoquímica não foram utilizados todos os cortes coletados, para o *locus coeruleus*, que fica no tegmento da ponte, foram feitos 2 jogos de 6 lâminas com 3 cortes por animal e destas 2 lâminas foram submetidas a imunohistoquímica para o BrdU. Já para o restante dos núcleos foram feitos 5 jogos de 4 lâminas com 3 cortes cada, sendo que entre cada jogo foi feito um intervalo de 80 µm, desprezando os cortes deste intervalo, e submetíamos a imunohistoquímica uma lâmina de cada jogo. O restante das lâminas foi corado com cresil-violeta e coberto com lamínula, sendo armazenado em um laminário para análise posterior.

Depois disso foi executada a imunohistoquímica para o BrdU, detalhada a seguir, e a estimativa do número de células marcadas foi realizada por dois experimentadores, de maneira imparcial, utilizando-se de toda a extensão dos núcleos estudados, devido ao número relativamente baixo de células marcadas, com auxílio de um atlas do encéfalo do rato (Paxinos & Watson, 1997) e um microscópio óptico com visualização na objetiva de 40X.

3.6. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi executada em lâminas histológicas previamente tratadas com organo-silano, de modo a facilitar a fixação do tecido na lâmina durante o processo da imunohistoquímica, em cortes de 5 µm de espessura, seguindo o seguinte protocolo:

As lâminas eram levadas à estufa a 60 °C por 20 minutos, lavadas em xilol em 3 banhos de 5 minutos seguidos de banhos de álcool em concentração decrescente. A recuperação antigênica foi feita com EDTA a 98 °C no banho-maria por 30 minutos e depois de resfriadas as lâminas eram lavadas em PBS com triton e a peroxidase endógena inativada com H₂O₂ a 1,5% em dois banhos de 10 minutos (na câmara escura), se fazendo uma nova lavagem em água destilada e em PBS com triton. Os cortes recebiam então o anticorpo primário (1:100) 2 horas em temperatura ambiente e *overnight* a 4°C, sendo em seguida lavados e incubados com o anticorpo secundário (1,5:100) por uma hora a 37°C. Como revelador utilizamos DAB (diaminobenzidina) 0,05% por 5 minutos e a contracoloração foi feita com hematoxilina. Em seguida foram feitos banhos de álcool em concentrações crescentes, seguidos de banhos de xilol, sendo que as lâminas foram cuidadosamente cobertas por lamínulas, fixadas por entelam sobre os cortes.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística empregada para comparar e analisar as amostras foi um teste t de *Student* para medidas não-pareadas, comparando o lado direito de cada núcleo dos animais não-manipulados com o lado direito de cada núcleo dos animais manipulados e o lado esquerdo de cada núcleo dos animais não-manipulados com o lado esquerdo de cada núcleo dos animais manipulados.

Para as medidas de peso corporal, também foi utilizado um teste t de *Student*, comparando o peso dos animais não-manipulados e manipulados em cada uma das idades em que foram submetidos a pesagem (8°, 10° e 11° dia pós-natal).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Peso Corporal

Com relação ao peso corporal dos filhotes durante o experimento (média em gramas \pm erro padrão da média - EPM), não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os animais não-manipulados e manipulados em nenhuma das idades em que foram submetidos à pesagem, no 8º dia pós-natal, data da primeira injeção intraperitoneal de BrdU, (não-manipulados: $15,20 \pm 0,71$ e manipulados: $15,58 \pm 1,21$), no 10º dia pós-natal, data da segunda injeção intraperitoneal de BrdU, (não-manipulados: $18,90 \pm 0,62$ e manipulados: $19,68 \pm 1,08$) e no 11º dia pós-natal, data da cirurgia de perfusão e posterior retirada dos encéfalos (não-manipulados: $20,54 \pm 1,28$ e manipulados: $21,10 \pm 1,10$).

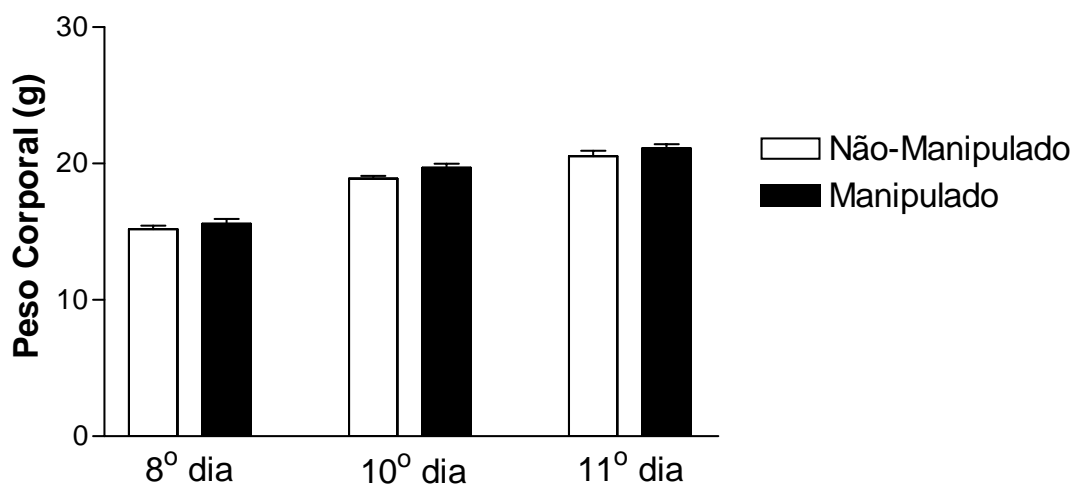


Figura 6 – Peso corporal (em gramas) no 8º, 10º e 11º dia pós-natal de filhotes Wistar fêmeas que receberam injeções intraperitoneais de BrdU, não-manipulados ou manipulados, no período neonatal.

4.2. Número de células BrdU-positivas na Área Pré-Óptica Medial em filhotes Wistar fêmeas de 11 dias

Na área pré-óptica medial, uma estrutura do SNC chave para a regulação neuroendócrina da reprodução, pela regulação da liberação de gonadotrofinas tanto em machos quanto em fêmeas, e da regulação do comportamento reprodutivo como um todo, observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do número de células em proliferação (BrdU-positivas) entre os animais não-manipulados tanto do lado direito do encéfalo ($783,40 \pm 41,70$), quanto do lado esquerdo ($771,30 \pm 34,64$) e os manipulados (lado direito: $337,50 \pm 14,97$ e lado esquerdo: $331,90 \pm 15,11$). Esta diminuição corresponde a cerca de 56% em ambos os lados do encéfalo, quando comparados os animais manipulados no período neonatal aos animais não-manipulados no mesmo período (Figura 4).

Este resultado ajuda a justificar o menor número de neurônios observado neste núcleo tanto aos 11 como aos 90 dias de idade nos animais manipulados, se comparados a animais não-manipulados no período neonatal (Winkelmann-Duarte, 2004), e também pode justificar o prejuízo ao comportamento sexual observado tanto nos machos, quanto nas fêmeas que foram manipulados no período neonatal (Gomes *et al.*, 1999; Padoin *et al.*, 2001).

É interessante ressaltar a importância do bom funcionamento da área pré-óptica medial para a exibição de um comportamento sexual normal nos machos e nas fêmeas, uma vez que esta área possui os neurônios que se projetam para a eminência mediana, culminando com a liberação de LHRH, essencial para o pico pré-ovulatório de LH nas fêmeas. Sendo que a diminuição do número de neurônios aos 11 e aos 90 dias nas fêmeas manipuladas, assim como a menor taxa de proliferação celular aos 11 dias de idade, poderia explicar as alterações reprodutivas a longo-prazo que ocorrem nas fêmeas manipuladas no período neonatal, como a ocorrência de ciclos estrais anovulatórios (Gomes *et al.*, 1999).

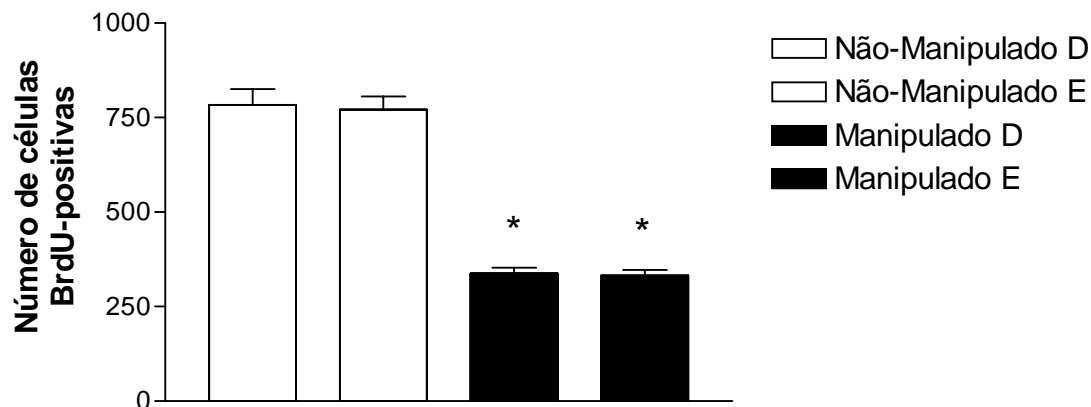


Figura 7 – Número de células BrdU positivas (média \pm EPM) na Área Pré-Óptica Medial em um intervalo de 8 cortes de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal (D=Direito e E=Esquerdo).

4.3. Número de células BrdU-positivas no núcleo Paraventricular do Hipotálamo em filhotes Wistar fêmeas de 11 dias

No núcleo paraventricular do hipotálamo, observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), sendo que ocorre um menor número de células BrdU-positivas nos animais manipulados no período neonatal tanto do lado direito ($137,30 \pm 8,28$) quanto do lado esquerdo ($133,90 \pm 11,21$) do encéfalo, se comparados aos animais não-manipulados (lado direito: $197,00 \pm 18,43$ e lado esquerdo: $203,40 \pm 20,05$) (Figura 5). Esta diferença corresponde a cerca de 30% de redução do lado direito e 34% de redução do lado esquerdo do encéfalo.

Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, observou-se um menor número de neurônios aos 11 e aos 90 dias, em fêmeas manipuladas no período neonatal no componente parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo, esta redução da proliferação celular encontrada com o uso do BrdU poderia explicar, ao menos em parte, esta redução significativa do número de células neste núcleo já aos 11 dias de idade, logo após o término da manipulação neonatal, apesar de ter analisado o núcleo de uma maneira geral, sem distinção entre a região parvocelular e magnocelular do núcleo paraventricular.

Levando-se em consideração a importância do núcleo paraventricular na mediação de respostas a estressores, respostas estas que se encontram diminuídas nos animais manipulados, pode-se associar o menor número de neurônios na idade adulta, um resultado direto da menor proliferação celular no período neonatal, a uma menor secreção de CRH por parte do PVN e, portanto, uma menor secreção de ACTH e glicocorticóides. Para confirmar esta hipótese, seria necessário verificar o conteúdo de CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo de animais manipulados.

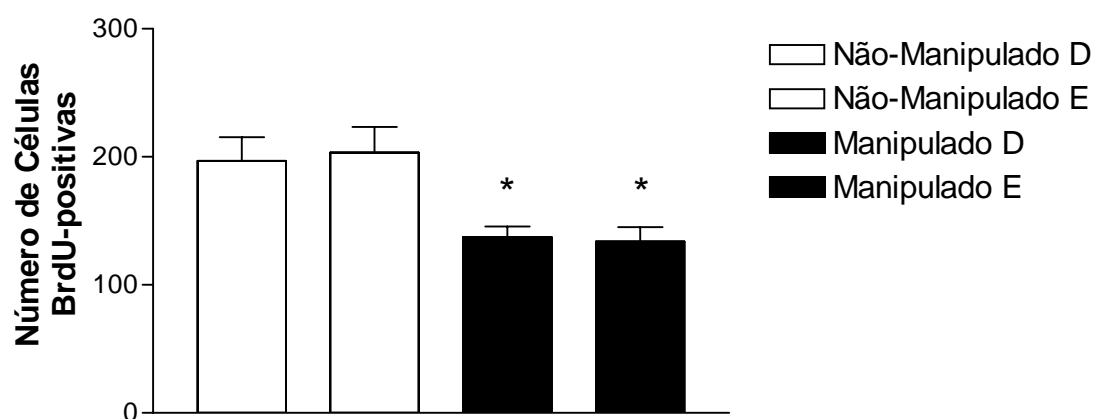


Figura 8 – Número de células BrdU positivas (média ± EPM) no núcleo Paraventricular do Hipotálamo em um intervalo de 8 cortes, de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal (D= Direito e E= Esquerdo).

4.4. Número de células BrdU-positivas na região CA1 da formação hipocampal em filhotes Wistar fêmeas de 11 dias

Na região CA1 da formação hipocampal dos animais manipulados no período neonatal observamos um número significativamente maior de células BrdU-positivas ($p < 0,0001$), ou seja, em proliferação, tanto do lado direito do encéfalo (não-manipulados: $112,60 \pm 11,08$ e manipulados: $192,40 \pm 5,98$), como do lado esquerdo (não manipulados: $124,10 \pm 4,32$ e manipulados: $194,50 \pm 6,99$) (Figura 6).

Este resultado está de acordo com dados prévios de nosso laboratório (Winkelmann-Duarte, 2004), que demonstravam um aumento no número de neurônios nos animais manipulados nesta região da formação hipocampal tanto aos 11 e como aos 90 dias de idade, indicando que este tem relação direta com um aumento da proliferação celular no período neonatal em estudo.

O resultado indica ainda que o aumento no número de células da região CA1 do hipocampo dos animais manipulados tem início ainda na infância, logo após o término da manipulação neonatal, e que isso pode estar relacionado ao aumento do número de receptores para glicocorticóides no hipocampo, demonstrado em trabalhos prévios (Meaney *et al.*, 1993). O hipocampo é um dos principais mediadores do mecanismo de retroalimentação negativa sobre o eixo HPA, também participa em processos cognitivos e comportamentais modulados por corticosteróides. Nos animais manipulados este mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA é mais sensível.

Receptores do tipo I (mineralocorticóides) e do tipo II (glicocorticóides) são expressos nas células piramidais dos Cornos de Ammon (CA1, CA2 e CA3) e nas células granulosas do giro denteado (GD). A ativação desses receptores medeia uma variedade de efeitos, tais como regulação da arborização e do comprimento dos dendritos nas células piramidais do CA e a reposição de neurônios no GD (McEwen *et al.*, 2002). Os glicocorticóides podem levar os neurônios a ficarem morfológicamente não-responsivos a estímulos, inibindo a arborização dendrítica, uma vez que suprimem a resposta de aumento de atividade promovida pelo fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Campbell & MacQueen, 2004).

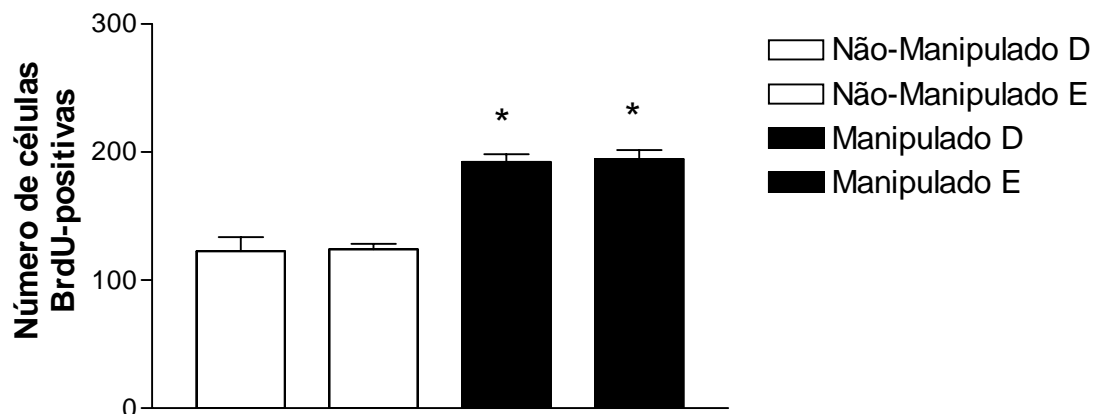


Figura 9 – Número de células BrdU positivas (média \pm EPM) na região CA1 da formação hipocampal em um intervalo de 8 cortes de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal (D= Direito e E= Esquerdo).

4.5. Número de células BrdU-positivas no *Locus Coeruleus* em filhotes Wistar fêmeas de 11 dias

No principal núcleo noradrenérgico do SNC, o *locus coeruleus*, observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0005$ e $0,001$, do lado direito e do lado esquerdo, respectivamente), com um menor número de células em proliferação, evidenciadas pela presença de BrdU, nos animais manipulados, tanto do lado direito ($30,60 \pm 17,99$), quanto do lado esquerdo ($32,00 \pm 19,48$) do encéfalo, quando comparados aos animais não-manipulados no mesmo período (lado direito: $88,80 \pm 14,27$ e lado esquerdo: $88,20 \pm 17,64$) (Figura 7). Em termos percentuais esta redução no número de células em proliferação observada nas fêmeas manipuladas no período neonatal é de cerca de 65% do lado direito do encéfalo e de cerca de 63% do lado esquerdo do encéfalo.

Esta diferença significativa acaba por confirmar que o menor número de neurônios observados nos animais manipulados se comparados aos não-manipulados, tanto aos 11 como aos 90 dias de idade, mostrado em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Lucion, *et al.*, 2003), tem relação direta com uma menor proliferação

celular no 11º dia de vida do animal, logo após o término do procedimento da manipulação neonatal. Um resultado que não exclui a possibilidade de uma maior taxa de morte celular por apoptose concomitantemente nos animais manipulados neste mesmo período de vida.

Além disso, este resultado é particularmente interessante se for levado em consideração o fato de que o *locus coeruleus* é um núcleo está em franco processo de proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular mesmo após o nascimento no roedor, no período neonatal (Pinos *et al.*, 2001).

Também é importante considerar que o LC está intimamente relacionado com o pico pré-ovulatório de LH, tendo uma grande importância na modulação do eixo HPG, o qual encontra-se alterado nas fêmeas manipuladas no período neonatal. Sabendo-se que lesões neste núcleo diminuem o conteúdo de NA no hipotálamo basal, bloqueiam a liberação pulsátil de LH, o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas e aumentam o conteúdo de LHRH na área pré-óptica medial (sugerindo que este não é liberado), podemos associar o menor número de neurônios que é observado nos filhotes de 11 dias e nos animais de 90 dias, assim como a menor proliferação celular observada aos 11 dias de idade nos animais manipulados, com uma possível alteração dos mecanismos envolvidos nos eventos relacionados a uma ovulação bem sucedida, o que é observado nas fêmeas manipuladas no período neonatal. Assim, com um menor número de neurônios exercendo suas atividades, as vias finais estariam sendo prejudicadas, dificultando a ovulação, induzindo ciclos estrais anovulatórios e a exibição de um comportamento sexual normal.

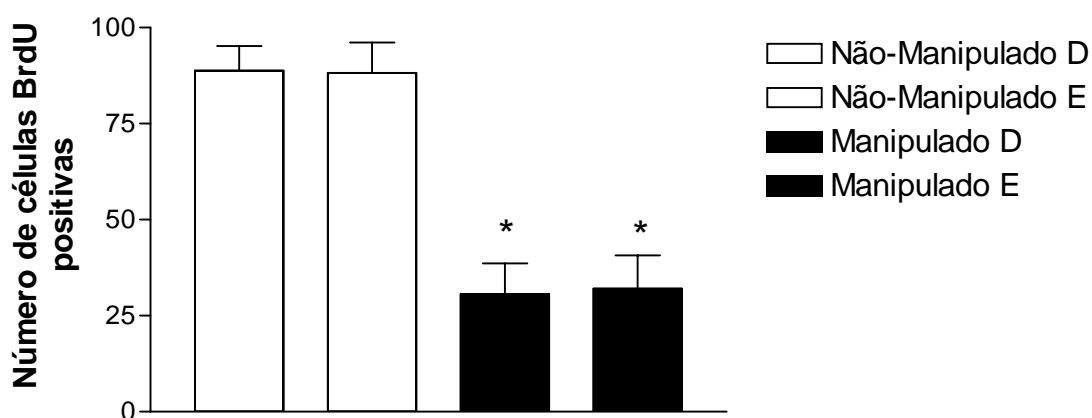


Figura 10 – Número de células BrdU positivas em um intervalo de seis cortes (média \pm EPM) no *Locus Coeruleus* de filhotes Wistar fêmeas de 11 dias de idade, não-manipulados e manipulados no período neonatal (D= Direito e E= Esquerdo).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho levou a elucidação de aspectos importantes relacionados diretamente com a morfologia alterada do encéfalo de ratas Wistar fêmeas manipuladas no período neonatal, as quais apresentavam aos 11 e aos 90 dias de idade um menor número de células na área pré-óptica medial, no núcleo paraventricular do hipotálamo e no *locus coeruleus* e um maior número de células na região CA1 da formação hipocampal se comparadas a fêmeas não-manipuladas no mesmo período. Com o presente trabalho foi possível relacionar estes aspectos com a proliferação celular que ocorre durante o período da manipulação neonatal, nos 10 primeiros dias de vida, esperava-se observar alterações na proliferação celular destes núcleos, para explicar a diferença observada com relação ao número de células entre os animais manipulados e os animais não-manipulados.

Os resultados indicaram, através do uso do BrdU como marcador de proliferação celular, que a mesma estava de fato alterada nas fêmeas manipuladas, sendo menor na área pré-óptica medial, núcleo paraventricular e *locus coeruleus* e maior na região CA1 da formação hipocampal. Isso não exclui a possibilidade de estudos futuros sobre morte celular nas regiões em que se observou uma diminuição do número de células nos animais manipulados, observando cascatas enzimáticas relacionadas a apoptose, por exemplo. O registro de um menor número de células nestas estruturas não extingue essa possibilidade ocorrendo de forma concomitante a uma diminuição da proliferação celular.

A manipulação neonatal levou a efeitos diferenciados com relação à proliferação celular em diferentes núcleos do encéfalo, levando a uma diminuição do número de células em proliferação na área pré-óptica medial, um fato particularmente interessante se considerarmos a importância da mesma para a função reprodutiva tanto em machos quanto em fêmeas, função que se encontra alterada nas fêmeas adultas manipuladas no período neonatal. Esta diminuição da proliferação celular constatada em nosso trabalho está de acordo com os prejuízos na ovulação das fêmeas manipuladas

(Gomes *et al.*, 1999) e com a diminuição da exibição do comportamento sexual pelas mesmas (Padoin *et al.*, 2001).

A mesma diminuição da proliferação celular foi observada no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), uma estrutura chave na coordenação de respostas estereotipadas frente a estressores (Rivier *et al.*, 1982). As informações sensoriais relacionadas ao estímulo estressor convergem na secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) de neurônios localizados no PVN para iniciar uma cascata de efeitos neuroendócrinos. O CRH estimula por sua vez a liberação de ACTH da hipófise e conseqüente liberação de corticosterona pelo córtex da glândula adrenal ativando desta forma o eixo HPA, originando uma resposta clássica e estereotipada frente ao estresse (Herman *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 2002). É interessante ressaltar que nos animais manipulados estas respostas estereotipadas dadas frente a um estressor estão alteradas, sendo menores nestes animais. Portanto, a diminuição no número de células na porção parvocelular deste núcleo (Winkelmann-Duarte, 2004), assim como a diminuição na taxa de proliferação celular observada neste trabalho, estão de acordo com a diminuição na resposta frente a estressores observada nos animais manipulados no período neonatal quando adultos.

Outra região que apresenta uma diminuição da proliferação celular nos animais é o *locus coeruleus*, o qual tem o principal agrupamento de neurônios noradrenérgicos do SNC. Além de ser ativado por estímulos estressantes (Kaufman *et al.*, 2000; Pacák & Palkovits, 2001; Van Bockstaele *et al.*, 2001), o *locus coeruleus* participa do controle da secreção do hormônio luteinizante (LH), sendo assim um importante modulador do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Nas fêmeas manipuladas no período neonatal tanto a resposta frente a estímulos estressantes quanto o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal encontram-se alterados, suprimidos. Esta diminuição da proliferação celular observada em nosso trabalho, portanto, está de acordo com estas alterações de longo prazo observadas no comportamento dos animais manipulados.

Já na região CA1 da formação hipocampal o que se observa é um aumento da proliferação celular, e em trabalhos anteriores do nosso laboratório um aumento também no número de neurônios desta região (Winkelmann-Duarte, 2004). Esta estrutura está diretamente relacionada a funções de aprendizagem e memória, participando também da neurocircuitaria do estresse (Roosendal *et al.*, 2003). A diminuição do número de receptores para glicocorticóides no hipocampo induzida pela manipulação neonatal, mostra que este núcleo do sistema nervoso central pode ser afetado por estímulos

externos que alteram o estado de homeostasia do organismo, mesmo no período hiporresponsivo ao estresse (Meaney *et al.*, 1993). Esse aumento na proliferação celular e no número de neurônios da região CA1 do hipocampo pode representar uma tentativa do organismo de aumentar o número de receptores glicocorticóides pelo aumento do número de células, uma vez que a manipulação neonatal induz a uma diminuição no número dos mesmos. Assim, um aumento da proliferação celular durante o período neonatal seria uma tentativa de garantir um número de receptores para glicocorticóides mais próximo do normal na idade adulta do animal.

É importante levar em consideração que os resultados do presente trabalho tratam somente das fêmeas manipuladas no período neonatal, que tem como principais características na idade adulta a hiporresponsividade ao estresse (Levine *et al.*, 1967; Meerlo *et al.*, 1999, Padoin *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004) e a ocorrência de ciclos estrais anovulatórios e exibição de comportamento sexual diminuída (Gomes *et al.*, 1999; Padoin *et al.*, 2001).

De forma geral, a principal conclusão do presente trabalho é a de que a manipulação neonatal, um estímulo aparentemente inofensivo aplicado durante os primeiros 10 dias de vida do filhote, num período hiporresponsivo ao estresse que este estímulo representa, leva a alterações de longo prazo na morfologia do encéfalo destes filhotes, as quais são mantidas mesmo durante a idade adulta, mas que se iniciam durante a infância, nestes primeiros 10 dias de vida em que o animal recebe o estímulo da manipulação. Assim, o procedimento da manipulação neonatal afeta de forma permanente a morfologia do encéfalo, e uma das formas como essa alteração acontece é através da proliferação celular, seja aumentada ou diminuída, de acordo com a região do encéfalo em questão.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam, através do uso do BrdU como marcador de proliferação celular, que a mesma encontra-se de fato alterada nas fêmeas manipuladas, sendo menor na área pré-óptica medial, núcleo paraventricular e *locus coeruleus* e maior na região CA1 da formação hipocampal. O registro de um menor número de células nestas estruturas não extingue a possibilidade de morte celular ocorrendo de forma concomitante a esta diminuição da proliferação celular observada neste trabalho.

De maneira mais geral, a principal conclusão deste trabalho é a de que a manipulação neonatal, um estímulo aparentemente inofensivo aplicado durante os primeiros 10 dias de vida do filhote, num período hiporresponsivo a estímulos estressantes, sendo o estresse representado por este estímulo, leva a alterações de longo prazo na morfologia do encéfalo destes filhotes, as quais são mantidas mesmo durante a idade adulta, mas que se iniciam durante a infância, nestes primeiros 10 dias de vida em que o animal recebe o estímulo da manipulação. Assim, o procedimento da manipulação neonatal afeta de forma permanente a morfologia do encéfalo, e uma das formas como essa alteração acontece é através da proliferação celular, seja aumentada ou diminuída, de acordo com a região do encéfalo em questão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, I. M.; KOVACS, K. J. Postnatal handling alters the activation of stress related neuronal circuits. *European J. Of Neurosc.*, 12: 3003-3014, 2000.

ADLER, N.T.; RESKO, J.A.; GOY, R.W. The effect of copulatory behavior on hormonal change in the female rat prior to implantation. *Physiology & Behavior*, 5, 1003-1007, 1970.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319-335, 1965.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433-457, 1969.

ANAND, K. J. S.; COSKUN, V.; THRIVIKRAM, K. V.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P. M. Long term behavioraleffects of repetitive pain in neonatal rats pups. *Physiology & Behav.*, 66: 627-637, 1999.

ANAND, K. J. S.; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experience alter brain development and subsequent behavior? *Biol. Neonate*, 77: 69-82, 2000.

ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S.M. *Locus coeruleus* lesions decrease norepinephrine input into medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research*, 767, 289-296, 1997.

ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROCHA-BARROS, V.M.; FRANCI, C.R.; McCANN, S.M. *Locus coeruleus* lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Brain Research*, 833, 86-92, 1999.

ASTON-JONES, G.; SHIPLEY, M.T.; GRZANNA, R. T. The *locus coeruleus*, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In G. Paxinos, *The rat nervous system*, 183-213, 1995.

BARRY, J.; HOFFMAN, G, E., WRAY, S.; LHRH-containing systems. In Björklund, A.; Hönkfelt, T.;(Eds) *Handbook of chemical Neuroanatomy*, 4:166-215, 1985.

BLOCH, G.J. & GORSKI, R.A. Cytoarchitectonic analisys of the SDN-POA of the intact and gonadectomized rat. *J. Comp. Neurol.*, 275, 604-612, 1988.

BOHN, M.C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience*, 5(11), 2003-2012, 1980.

CALDJI, C.; FRANCIS, D.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The effects of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropharmac.*, 22: 219-229, 2000.

CAMOZZATO, T.S.C. Alterações morfológicas na área pré-óptica medial, núcleo periventricular anteroventral e amígdala medial pósterodorsal induzidas pela manipulação neonatal. Dissertação de mestrado, 2006.

CAMPBELL, S. & MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J. Psychiatry Neurosci.*, 29 (6), 417-426, 2004.

CARATY, A.; MILLER, D.W.; DELALEU, B.; MARTIN, G.B Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing hormone. *J. Reprod. Fertil.* 111 (2): 249-257, 1997.

CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA*, 267, 1244-1252, 1992.

CUNNINGHAM, E.T. & SAWCHENKO, P.E. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 274, 60-76, 1998.

DAVIS, E.C.; POPPER, P.; GORSKI, R.A. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.*, 734, 10-18, 1996.

DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review*, v.71, p.335-351, 1964.

DOHLER, K.D.; COQUELIN, A.; DAVIS, F.; HINES, M.; SHRYNE, J.E.; GORSKI, R.A. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rat. *Brain Res.*, 302, 291-295, 1984.

DORNELLES, R.C.M. & FRANCI, C.R. Action of AT1 subtype angiotensin II receptors in the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides*, 32, 51-55, 1998.

FOOTE, S.L.; BLOOM, F.E.; ASTON-JONES, G. Nucleus *locus coeruleus*: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Psychological Reviews*, 63, 844-914, 1983.

FRANCI, J.A. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of *locus coeruleus* lesions on luteinizing hormone secretion under different experimental conditions. *Neuroendocrinology*, 41, 44-45, 1985.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, R.J.; MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development:

moms, pups, stress and glucocorticoid receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 794, 136-152, 1996.

FRANCIS, D.D.D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M. J. The role of corticotrophin-releasing factor-norepinephrine system in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol. Psych.*, 46:1153-1166, 1999.

FREEMAN, M. E.; The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat.. In Kobil, E.; Neill, J. D., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. 613-658, 1994.

FREESE, A.; O'ROURKE, D.; JUDY, K.; O'CONNOR, M.J. The application of 5-bromodeoxyuridine in the management of CNS tumors. *J. Neuro-Oncol.*, 20, 81-95, 1994.

GITLER, M.S. & BARRACLOUGH, C.A. *Locus coeruleus* (LC) stimulation augments LHRH release induced by medial preoptic stimulation: Evidence that the major LC stimulatory component enters contralaterally into the hypothalamus. *Brain Research*, 422, 1-10, 1987.

GOMES, C.M.; FRANTZ, P.J.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.32, p.1239-1242, 1999.

GOMES, C.M.; DONADIO, M.V.F.; ANSELMO-FRANCI, J.; FRANCI, C.R.; LUCION, A.B.; SANVITTO, G.L. Neonatal handling induces alteration in progesterone secretion after sexual behavior but not in angiotensin II receptor density in the medial amygdale: Implications for reproductive success. *Life Sciences*, 78, 2867-2871, 2006a.

GOMES, C.M.; DONADIO, M.V.F.; FRANSKOVIKI, I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; LUCION, A.B.; SANVITTO, G.L. 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.

GONZÁLEZ, A.S.; RODRÍGUES ECHANDIA, E.C.; FÓSCOLO, M.R.; FRACCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats I: Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology Behavior*, 47, 735-741, 1990.

GORSKI, R.A.; GORDON, J.H.; SHRYNE, J.E.; SOUTHAM, A.M. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research*, 48, 333-346, 1978.

GRINO, M.; YOUNG, W.S.; BURGUNDER, J.M. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in rat pituitary. *Endocrinology*, 214 (1), 60-68, 1989.

GUILLET, R.; SAFFRAN, M.; MICHAELSON, S.M. Pituitary-adrenal response in neonatal rats. *Endocrinology*, 106 (3), 991-994, 1980.

- HELENA, C.V.V.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under *locus coeruleus* control in female rats. *Brain Research*, 955, 245-252, 2002.
- HERMAN, J.P. & CULLINAN W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *TINS*, 20, 78-84, 1997.
- HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E.; ZIEGLER, D.R.; TASKER, J.G. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur. J. Neurosc.*, 16 (3), 381-385, 2002.
- JASPER, M.S. & ENGELAND, W.C. Splanchnicotomy increases adrenal sensitivity to ACTH in nonstressed rats. *Am. J. Physiol.*, 273, 363-368, 1997.
- KAUFMAN, J.; PLOTSKY, P.M.; NEMEROFF, C. B.; CHARNEY, D. S. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol. Psych.*, 48: 778-790, 2000.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, G; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, vol. 386, 493-495, 1997.
- KISS, J.; KOCSIS, Á.; CSÁKI.; HALÁS.;Z Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. *European Journal of Neuroscience* 18:3267-3278, 2003.
- KOPIN, I.J. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann. N Y Acad. Sci.* Dec. 29, 771, 19-30, 1995.
- LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*, 135: 795-799, 1962.
- LEVINE, S.; HALTMEYER, G. C.; KARAS, G. G.; DENENBERG, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behav.*, 2: 55-59, 1967.
- LEVINE, J. E.; CHAPPELL, L, M.; BAUER-DANTOIN, A, C.; BESECHE, L, M.; CONAGHAN, L, A.; LEGAN, S, J.; MEREDITH, J, M.; STROBL, J, H.; VOGELSONG, K, M.; WOLFE, A. M. Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone pulse generator in the rat. *Recent Progress in Hormones Research* 47 97-153, 1994.
- LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology Behavior*, 73, 255-260, 2001.
- LIU, D.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, v. 277, p. 1659-1662, 1997.

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

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2074-2077, 1993.

LOUGHLIN, S.E.; FOOTE, S.L.; GRZANNA, R. Efferent projections of nucleus *locus coeruleus*: Morphological subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience*, 18 307-319, 1986.

LUCION A.B.; PEREIRA F.M.; WINKELMAN E.C.; SANVITTO G.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav. Neurosci.* 117(5):894-903, 2003.

LUSKIN, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189, 1993.

McEWEN, B.S., MAGARINÓS, A.M., REAGAN. L.P. Studies of hormone action in the hippocampal formation. Possible relevance to depression and diabetes. *Journal of Psychosomatic Research*, 53: 883-890, 2002.

MEANEY, M.J.; SEMA, B.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMITHE, J.W.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hipotalamic-pituitary-adrenal stress response. *York Academy of Sciences*, v.697, p.70-85, 1993.

MEANEY, M J.; DIORIO,J.; WIDDOWSON, J.; LAPLANTE, P.; CALDJI, C.; SECKL, J. R.; PLOTSKY, P. M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Developm. Neurosc.*, 18: 49-72, 1996.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioral stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 11, p.925-933, 1999.

MEISEL, R, L.; SACHS, B, D.; The physiology of male sexual behavior. In Knobil, e.; Neill, J, D.; (Eds), *The Physiology of Reproduction*, 2 nd end. Raven Press, 3-105 , 1994.

MELIA, K.R. & DUMAN, R.S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (19), 8382-8386, 1991.

MERCHENTHALER, I.; SÉTÁLÓ, G.; CSONTOS, C.; PETRUZ, P.; FLERKO, B.; NEGROVILAR, A.; Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin containing neurones projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology* 125:2812-2821,

1989.

MIRESCU, C.; PETERS, J.D.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, vol. 7, p. 841-846, 2004.

MISTRETA, C.M. & BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. In: *Studies on the development of behavior and nervous system*. New York: Academic Press, 215-246, 1978.

PACÁK, K. & PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22, 502-548, 2001.

PADOIN, M. J.; CADORE, L. P.; GOMES, C. M.; BARROS, H. M. T.; LUCION, A. B. Long lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosc.*, 115: 1332-1340, 2001.

PAVLIDES C., McEWEN B. S., Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long term potentiation in the CA3 hippocampal field, *Brain Res*; 851:204-214, 1999.

PAXINOS, G. & WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA, Academic Press, 1997.

PINOS, H.; COLLADO, P.; RODRÍGUEZ-ZAFRA, M.; SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. The development of sex differences in the *locus coeruleus* of the rat. *Brain Research Bulletin*, 56, 73-78, 2001.

PLOTSKY, P.M.; BRUHN, T.O.; VALE, W. Evidence for multifactor regulation of the adrenocorticotropin secretory response to hemodynamic stimuli. *Endocrinology*, 116 (2); 633-639, 1985.

PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, v. 18, p. 195-200, 1993.

RIVIER, C.; BROWNSTEIN, M.; SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology*, 110 (1), 272-278, 1982.

ROOZENDAL, B., System mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych*; 27: 1213-1223, 2003.

SAAVEDRA, J.M.; ANDO, H.; ARMANDO, I.; BAIARDI, G.; BREGONZIO, C.; JEZOVA, M.; ZHOU, J. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1018, 76-84, 2004.

SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*, 11, 65-76, 1986.

SAWCHENKO, P. & SWANSON, L. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science*, 214, 683-687, 1981.

SCHMIDT, M.; LEWALD, J.; VAN DER TOGT, C.; HOFFMANN, K.P. The contribution of GABA-mediated inhibition to response properties of neurons in the nucleus of the optic tract in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 6 (11), 1656-1661, 1994.

SCHMIDT, M.; OITZL, M. S.; LEVINE, S.; KLOET, R. The HPA system during the postnatal development of CDI mice and the effects of maternal deprivation. *Dev. Brain Res.*, 139, 39-49, 2002.

SELYE, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.*, 115 (1), 53-56, 1976.

SEVERINO, G.S.; FOSSATI, I.A.M.; PADOIN, M.J.; GOMES, CM; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G.L.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. Effect of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various age and estrous cycle phases of females. *Physiology and Behavior*, 81, p.489-498, 2004.

SHUGHRUE, P, G.; MERCHENTHALER, J. Distribution of estrogen receptor- β immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol* 436:64-81, 2001.

SICKEL, M.J. & MCCARTHY, M.M. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: Developmental profile and gonadal steroid modulation. *J. Neuroendocrinol.*, 12, 397-402, 2000.

SIMERLY, R. B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANSON, L, W.; Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol* 294:76-95 , 1990.

STRUIKMANS, H.; RUTGERS, D.H.; JANSEN, G.H.; TULLEKEN, C.A.; VAN DER TWEEL, I.; BATTERMAN, J.J. S-phase fraction, 5-bromo-2'-deoxy-uridine labelling index, duration of S-phase, potential doubling time, and DNA index in benign and malignant brain tumors. *Radiat. Oncol. Investg.*, 5, 170-179, 1997.

SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, 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.

SWANSON L. W., SAWCHENKO P. E., LIND R.W., RHO J.H., The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neuron with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs, *Ann. N.Y. Acad. Sci*; 512: 12-23, 1987.

TAUPIN, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 53, 198-214, 2007.

TSIGOS, C. & CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53 (4), 865-871, 2002.

VAN BOCKSTAELE, E.J.; BAJIC, D.; PROUDFIT, H.; VALENTINO, R.J. Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic *locus coeruleus*. *Physiology & Behavior*, 73, 273-283, 2001.

WALKER, C.D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: Role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*, 118, 1445-1451, 1986.

WHITNALL, M.H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.*, 40(5), 573-629, 1993.

WINKELMANN-DUARTE-DUARTE, E.C. Alterações morfológicas do Sistema Nervoso Central induzidas pela manipulação neonatal. Tese de doutorado, 2004.

ZHANG, L. X.; LEVINE, S.; DENT, G.; ZHAN, Y.; XING, G.; OKIMOTO, D. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Develop. Brain. Res.*, 133: 1-11, 2002.