



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

**Manipulação neonatal e seus efeitos sobre o bulbo olfatório em
ratos: morfologia e comportamento**

Márcia Scherem de Azevedo

Porto Alegre - 2011



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

**Manipulação neonatal e seus efeitos sobre o bulbo olfatório em
ratos: morfologia e comportamento**

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.

Márcia Scherem de Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Giovenardi

Porto Alegre - 2011

À minha família

Agradecimentos

Ao meu orientador Aldo Bolten Lucion, um exemplo de pesquisador, pela oportunidade de orientação deste trabalho, por toda a sua paciência, confiança, compreensão e pelos ensinamentos necessários para o desenvolvimento desta tese.

À minha co-orientadora e grande amiga Márcia Giovenardi, um exemplo de pessoa, professora e pesquisadora a ser seguido. Obrigada por ter sempre me apoiado e acreditado em mim desde a Iniciação Científica, por todo incentivo, pela confiança, ensinamentos e principalmente pela amizade todos estes anos.

Ao Professor Gilberto Luiz Sanvitto pelas contribuições ao longo de meu trabalho.

Aos Professores do curso de pós-graduação que foram muito importantes ao longo da minha formação e por todas as contribuições realizadas no meu caminho científico.

Aos professores membros da banca Prof^a Dr^a Maria Flávia Marques Ribeiro, Prof Dr José Marino Neto e a Prof^a Dr^a Angelica Rosat Consiglio, muito obrigada.

À Prof^a Dr^a Elisa Winkelmann-Duarte, por todo o auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por muitas vezes me acolher em Florianópolis, pela amizade e por todos os ensinamentos.

À Prof^a Dr^a Marilda da Cruz Fernandes, coordenadora do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA pelo auxílio científico, por abrir as portas de seu laboratório e por todo seu apoio.

À Prof^a Dr^a Maria Flávia Marques Ribeiro, pelos conselhos e por contribuir na minha formação pessoal e científica.

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA Rosalva, Kelly e Teresinha por toda ajuda na realização das imunoistoquímicas, pela amizade e por todo apoio nas horas mais difíceis.

À Natacha e a Silvia, muito obrigada pelas traduções.

Aos bioteristas, por todo o cuidado e dedicação com os animais.

Aos alunos de iniciação científica Deborah, Franklin, Márcio, Tais, Carol que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial para Vanise, Bruno e Simone, sem a qual eu não teria conseguido realizar este trabalho, muito obrigada por tudo.

Aos colegas do laboratório 11. Obrigada pelo auxílio em muitos experimentos, pelo apoio, por contribuírem na minha formação e pelos ótimos momentos de descontração. Agradeço à todos com quem eu convivi ao longo da minha pesquisa.

Aos meus pais que sempre me ajudaram e me deram incentivo para a vida e que proporcionaram com que eu chegasse aqui me apoiando em todos os momentos. Obrigado por me ensinar a ciência da vida e por me incentivar desde criança a conhecer as curiosidades do mundo científico.

À minha grande mana, uma pessoa maravilhosa, sempre disposta a me ajudar e a me aturar. Obrigada por estar presente em minha vida, por todos os momentos e por ser minha grande irmã.

Ao meu amor Leandro. Obrigada por ser esta pessoa especial que Deus colocou em minha vida, por todo incentivo, apoio, carinho e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presente nas minhas conquistas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado.

À UFCSPA e à UFSC por conceder o espaço para a realização de parte do meu projeto.

Às secretárias da Pós-graduação pela disponibilidade e auxílio nos momentos em que precisei.

À UFRGS e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia pela oportunidade concedida.

À FAPESP, FAPERGS E CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMO.....	XX
ABSTRACT.....	XXII
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 ESTRESSE E MANIPULAÇÃO NEONATAL.....	2
1.2 SISTEMA OLFATÓRIO	7
1.3 PREFERÊNCIA OLFATÓRIA, PREFERÊNCIA SEXUAL E MANIPULAÇÃO NEONATAL	12
1.4 COMPORTAMENTO MATERNAL	15
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO	28
4.2 ANIMAIS	28
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.4 CICLO ESTRAL	31
4.5 EUTANÁSIA E DESCARTE	31
4.6 SEÇÃO 1 - SISTEMA OLFATÓRIO	32
4.6.1 Delineamento experimental	32
4.6.2 Cálculo da densidade numérica de células (Nv) por volume do dissector	33
4.6.3 Quantificação de neurônios NeuN positivos	37
4.6.4 Cálculo de tamanho da amostra	39
4.6.5 Análise estatística	40
4.7 SEÇÃO 2 - PREFERÊNCIA PELO ODOR DO NINHO E PREFERÊNCIA SEXUAL.....	40
4.7.1 Delineamento experimental	40
4.7.2 Preferência pelo odor do ninho (odor familiar) em filhotes (machos e fêmeas).....	41
4.7.3 Castração das fêmeas	42
4.7.4 Reposição hormonal de fêmeas	43
4.7.5 Castração dos machos	43

4.7.6 Teste de preferência sexual.....	44
4.7.7 Cálculo de tamanho da amostra	46
4.7.8 Análise Estatística.....	46
4.8 SEÇÃO 3 – COMPORTAMENTO MATERNA	47
4.8.1 Delineamento experimental	47
4.8.2 Cálculo de tamanho da amostra	49
4.8.3 Análise Estatística.....	50
5 RESULTADOS	52
5.1 SEÇÃO 1 - SISTEMA OLFATÓRIO	52
5.1.1 Densidade numérica de células mitrais na camada mitral do bulbo olfatório em machos	52
5.1.2 Densidade numérica de células na camada glomerular do bulbo olfatório em machos	54
5.1.3 Densidade numérica de células totais na camada mitral do bulbo olfatório em machos	55
5.1.4 Densidade numérica de células na camada granular do bulbo olfatório em machos	56
5.1.5 Densidade numérica de células mitrais na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas	57
5.1.6 Densidade numérica de células na camada glomerular do bulbo olfatório em fêmeas	58
5.1.7 Densidade numérica de células totais na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas	59
5.1.8 Densidade numérica de células na camada granular do bulbo olfatório em fêmeas	60
5.1.9 Número de neurônios NeuN-positivos na camada glomerular do bulbo olfatório em machos.....	61
5.1.10 Número de neurônios NeuN-positivos na camada mitral do bulbo olfatório em machos	62
5.1.11 Número de neurônios NeuN-positivos na camada granular do bulbo olfatório em machos.....	63
5.1.12 Número de neurônios NeuN-positivos na camada glomerular do bulbo olfatório em fêmeas	64
5.1.13 Número de neurônios NeuN-positivos na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas	65
5.1.14 Número de neurônios NeuN-positivos na camada granular do bulbo olfatório em fêmeas	66
5.2 SEÇÃO 2 - PREFERÊNCIA PELO ODOR DO NINHO E PREFERÊNCIA SEXUAL	67
5.2.1 Preferência pelo odor do ninho (odor familiar) em filhotes (machos e fêmeas).....	67
5.2.2 Teste de preferência sexual.....	69
5.3 SEÇÃO 3 - COMPORTAMENTO MATERNA	71

5.3.1 Registro do comportamento maternal.....	71
6 DISCUSSÃO	76
CONCLUSÕES	88
PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO 1.....	108

APRESENTAÇÃO

Esta tese teve por objetivo analisar o impacto da manipulação neonatal na morfologia do bulbo olfatório e nos comportamentos de preferência olfatória e preferência sexual de ratos machos e fêmeas aos 11 e 90 dias de idade.

A tese apresenta uma introdução, a qual descreve o modelo de manipulação neonatal e suas relações com os temas abordados neste trabalho. Seguido da introdução está a justificativa e os objetivos. A metodologia é apresentada primeiramente de forma geral, descrevendo os procedimentos comuns para todos os experimentos. Posteriormente, o material e métodos foi dividido em seções (1, 2 e 3) com a finalidade de descrever a metodologia específica usada em cada experimento realizado. Na seção 1, foram analisados os efeitos da manipulação neonatal sobre a morfologia e a estrutura do bulbo olfatório. Na seção 2 foram analisados os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos que envolvam o sistema olfatório, tanto em filhotes, na preferência pelo odor maternal, quanto em adultos, na preferência sexual. Na seção 3, foram analisados os efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento maternal, bem como a relação mãe-filhote. Esta divisão em seções também foi feita para a descrição dos resultados. Após, está a discussão e as conclusões obtidas a partir dos experimentos realizados. Finalizando a tese estão as perspectivas futuras para trabalhos a serem realizados a partir dos resultados obtidos nesta tese, as referências bibliográficas, que listam os trabalhos utilizados para a elaboração da mesma e o artigo elaborado com os resultados da seção 1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das conexões do BOP (direita) BOA (esquerda) do sistema olfatório de camundongo (adaptado de (Baum, 2009).....	8
Figura 2 - Fotomicrografia do bulbo olfatório principal, mostrando a localização das camadas e o bulbo olfatório acessório (BOA)	10
Figura 3 - Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO, a qual é importante para induzir o aprendizado olfatório (Modificado de (Moriceau e Sullivan, 2005).....	12
Figura 4 - Desenho de um subconjunto de comportamentos maternos incluindo recolher filhotes, construir ninho, amamentar, lambar e agressão maternal (contra um intruso) adaptado de Gammie 2005.	16
Figura 5 – Grupos experimentais	30
Figura 6 - Desenho esquemático do delineamento experimental.....	33
Figura 7 - Fotomicrografia de um corte sagital do bulbo olfatório (A). Delimitação das três camadas analisadas (B).....	36
Figura 8 - Fotomicrografia da camada mitral e das células mitrais.....	36
Figura 9 - Desenho esquemático do delineamento experimental.....	41
Figura 10 - Caixa utilizada para a realização do teste de preferência pelo odor do ninho e desenho esquemático do procedimento experimental.....	42
Figura 11 - Caixa utilizada para a realização do teste de preferência sexual e desenho esquemático do procedimento experimental.	45
Figura 12 – Resumo esquemático do modelo experimental de registro do comportamento maternal.....	47
Figura 13 - Principais comportamentos maternos analisados: a) postura de amamentação com dorso bem arqueado; b) postura de amamentação com dorso pouco arqueado; c) postura de amamentação passiva (supino); d) comportamento de lambar os filhotes.	49
Figura 14 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm ³) de células mitrais dentro da camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$	53

- Figura 15** - Fotomicrografia da camada mitral em um aumento de 100x mostrando a organização das células mitrais no grupo não manipulado (A) e no grupo manipulado (B). Coloração feita em cresil violeta.....53
- Figura 16** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada glomerular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$54
- Figura 17** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$55
- Figura 18** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de neurônios por mm^3) de neurônios na camada granular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$56
- Figura 19** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células mitrais dentro da camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$57
- Figura 20** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$58
- Figura 21** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$59
- Figura 22** - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) na camada granular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90

dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$60

Figura 23 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada glomerular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$61

Figura 24 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$62

Figura 25 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada granular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$63

Figura 26 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$64

Figura 27 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$65

Figura 28 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada granular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$66

Figura 29 - Preferência pelo odor do ninho em machos aos 11 dias de idade. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 18 animais no grupo não manipulado e 19 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$67

Figura 30 - Preferência pelo odor do ninho em fêmeas aos 11 dias de idade. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 18 animais no grupo não manipulado e 19 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

.....68

Figura 31 - Preferência sexual de machos adultos. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 19 animais no grupo não manipulado e 13 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$69

Figura 32 - Preferência sexual de fêmeas adultas na noite do proestro. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 11 animais para cada grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$70

Figura 33 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de amamentação (soma dos comportamentos de amamentação com dorso bem arqueado, pouco arqueado e amamentação passiva) de ratas cujos filhotes sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada em quatro seções diárias com 72 min cada, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$71

Figura 34 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de lambe os filhotes de ratas onde as ninhadas sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada em quatro seções diárias com 72 min cada, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$72

Figura 35 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de amamentação (soma dos comportamentos de amamentação com dorso bem arqueado, pouco arqueado e amamentação passiva) de ratas cujos filhotes sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada por 72 min logo após o procedimento de manipulação neonatal, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$73

Figura 36 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de lambe os filhotes de ratas onde as ninhadas sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada por 72 min logo após o procedimento de manipulação neonatal, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida

do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AMe – Amígdala Medial

ANOVA – Análise de Variância

AVP – Arginina Vasopressina

AVPV – Núcleo Periventricular anteroventral

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

BO – Bulbo Olfatório

BOA – Bulbo Olfatório Acessório

BOP – Bulbo Olfatório Principal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CREB – Proteína Ligante ao elemento Responsivo AMPc

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAB – Tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina

DPN – Dia pós-natal

EO – Epitélio Olfativo

GH – Hormônio do Crescimento

HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPG – Hipotálamo-Hipófise-Gônada

LC – *Locus Coeruleus*

MePD – Amígdala Medial Pósterodorsal

MPOA – Área Pré-óptica Medial

NA – Noradrenalina

NeuN – Proteína Neuronal Nuclear

OVN – Órgão Vomeronasal

PKA – Proteína Cinase

PRL – Prolactina

PVN – Núcleo Paraventricular

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

RESUMO

A manipulação neonatal altera o comportamento maternal e a relação mãe-filhote induzindo mudanças fisiológicas e alterações comportamentais em resposta a estímulos estressores, que perduram ao longo da vida do animal. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da manipulação neonatal (dia pós-natal 1 ao dia pós-natal 10) sobre o número de células nas camadas do bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Além disso, estudar o envolvimento do sistema olfatório (no início e na vida adulta do animal) no estabelecimento das relações sociais em ratos que sofreram manipulação neonatal. Nossos resultados mostraram uma redução significativa no número de células mitrais e no número total de células na camada glomerular em ratos manipulados machos e fêmeas em ambas as idades. O número de neurônios NeuN-positivo também está alterado. Fêmeas manipuladas no período neonatal apresentam redução no número de neurônios NeuN-positivos na vida adulta. Quanto às relações sociais, a manipulação neonatal não alterou a preferência olfatória no início da vida do animal (aos 11 dias de idade). Entretanto, na vida adulta este procedimento causou uma redução na preferência sexual de ratos machos. Em relação ao comportamento maternal, não foram encontradas diferenças entre os grupos manipulado e não manipulado. Estes resultados indicam que alterações no ambiente neonatal causam mudanças estruturais estáveis no bulbo olfatório, o que pode ser uma das causas das alterações nos comportamentos sociais, como por exemplo, comportamento sexual, interação e memória social, encontradas em animais que sofreram manipulação neonatal.

ABSTRACT

Neonatal handling alters maternal behavior and mother-pup inducing physiological changes and behavioral changes in response to stressful stimuli, which persist throughout the life of the animal. This study aims to examine the effects of neonatal handling (postnatal day 1 to postnatal day 10) on the number of cells in the layers of the olfactory bulb of male and female rats at 11 and 90 days old. Moreover, studying the involvement of the olfactory system (early and adult life of the animal) in the establishment of social relations in rats subjected to neonatal handling. Our results showed a significant reduction in the number of mitral cells and the number of cells in the glomerular layer in handled rats males and females at both ages. The number of NeuN-positive neurons is also changed. Neonatal handled females show a significant reduction in the number of NeuN-positive neurons in adulthood. As for social relations, neonatal handling did not alter olfactory preferences in early life of the animal (at 11 days old). However, in adulthood this procedure caused a reduction in the sexual preference of male rats. In relation to maternal behavior, no differences were found between the groups handled and nonhandled. Neonatal changes in the environment cause permanent structural changes in the olfactory bulb, which may be one of the causes of changes in social behaviors, such as sexual behavior, social interaction and memory, found in animals that underwent neonatal handling.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse e manipulação neonatal

O início da vida em várias espécies é muito suscetível a estímulos ambientais. Assim, a plasticidade durante o desenvolvimento é importante para gerar diferentes fenótipos apropriados para diferentes ambientes (Gluckman *et al.*, 2005). A plasticidade ocorre em todos os níveis organizacionais, desde o comportamento à anatomia, sendo que a dificuldade em reverter um desenvolvimento alterado é muito maior em nível anatômico do que comportamental (Macrì e Würbel, 2006). Sendo assim, experiências que ocorrem no início da vida têm grande influência sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e, dessa forma, modulam o comportamento e o funcionamento encefálico do adulto (Papaioannou *et al.*, 2002), bem como o desenvolvimento das funções emocionais e cognitivas (Poeggel *et al.*, 2003).

O estresse é o resultado de uma série de mecanismos adaptativos em resposta a estressores que visam proteger o organismo e restaurar a homeostase, envolvendo mudanças tanto no sistema neuroendócrino quanto no autonômico (Bomholt *et al.*, 2004). O cérebro é o órgão central da resposta ao estresse, e é ele que determina o que será considerado um estímulo estressante e que controla as respostas comportamentais e fisiológicas a estressores reais ou em potencial (Mcewen, 2007). O organismo precisa de uma resposta hormonal normal ao estresse para sobreviver a certas situações; sendo assim, uma resposta adrenocortical excessiva e uma inadequada função autonômica são deletérias para a saúde e a sobrevivência (Mcewen, 2007).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um dos principais sistemas envolvidos nas respostas comportamentais e neuroendócrinas ativadas em situações estressoras. A ativação deste eixo resulta na liberação de glicocorticóides do córtex da adrenal que, junto com o aumento da atividade catecolaminérgica e a participação de diversos outros sistemas neuroendócrinos, regulam a função vascular e a produção de energia, entre outras, facilitando as respostas comportamentais adequadas com o objetivo de manter a homeostase (Meaney *et al.*, 1993; Meerlo *et al.*, 1999). Para que isto ocorra, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que ativam a hipófise anterior, promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, promove a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (Handa *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1996; Herman e Cullinan, 1997). Em humanos, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e no rato, a corticosterona.

Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso (SN) plenamente desenvolvido, sendo mais suscetíveis a alterações ambientais. Durante as duas primeiras semanas de vida, em ratos, a concentração de corticosterona plasmática é baixa e permanece assim até aproximadamente o 14^o dia de vida. Esta baixa concentração plasmática de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é essencial para a maturação normal do SN (Sapolsky e Meaney, 1986). Além disso, as concentrações hipofisárias de ACTH, e hipotalâmicas de CRH, também são diminuídas neste período. Assim, estímulos que normalmente induzem o aumento destes hormônios em adultos são incapazes de fazê-lo em animais neonatos. Devido a estes fatores, este período é chamado de hiporresponsivo ao estresse (Sapolsky e Meaney, 1986; Levine, 2001). Sendo assim, o neonato necessita do

cuidado maternal para protegê-lo e diminuir sua exposição a estímulos estressores (Sapolsky e Meaney, 1986) mantendo os níveis de corticosterona baixos (Moriceau *et al.*, 2004; Moriceau e Sullivan, 2004a) para que ocorra o desenvolvimento normal do SN.

O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem nesta época (Meaney *et al.*, 1993). Eventos estressantes durante o período neonatal podem influenciar a maturação do eixo HPA (Coutinho *et al.*, 2002), o comportamento do rato na vida adulta (Aguiar *et al.*, 1997) e o desenvolvimento da plasticidade do SN. Assim, injúrias, doenças e outros estressores severos podem romper o processo normal de desenvolvimento, induzindo mudanças fenotípicas que podem ser inadequadas sob diversas condições ambientais (Gluckman *et al.*, 2005). Eventos traumáticos e estressantes, desencadeados durante o período da infância, podem induzir diversas patologias que se manifestam na vida adulta, como transtornos depressivos, obesidade ou até mesmo doenças cardiovasculares (Kaffman e Meaney, 2007; Swain *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse em identificar quais são os fatores do ambiente neonatal e de que forma estes fatores podem influenciar a fisiologia e o comportamento de animais que tiveram qualquer tipo de intervenção nessa fase. Devido a isso, diversos laboratórios utilizam tratamentos artificiais como modelos de variações ambientais no início da vida (separação maternal, estresse pré-natal, restrição de alimento, dentre outros), buscando o entendimento dos efeitos a longo prazo que as alterações no ambiente neonatal podem causar (Meaney *et al.*, 1988; Van Oers *et al.*, 1999; Huot *et al.*, 2002; Poeggel *et al.*, 2003; Raineiki *et al.*, 2009)

Estudos que envolvam esses modelos são uma ferramenta importante na investigação da relação das interações com o meio, no período neonatal, com as alterações que ocorrem na vida adulta (Meerlo *et al.*, 1999). Dentre estes modelos está a manipulação neonatal, que tem por objetivo avaliar como uma interferência ambiental nos primeiros dias pós-parto pode alterar os mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas ao estresse. A manipulação neonatal envolve uma separação breve da mãe e uma estimulação tátil dos filhotes (Rainecki *et al.*, 2009) o que altera o comportamento maternal e consequentemente a relação mãe-filhote (Liu *et al.*, 1997; De Azevedo *et al.*, 2010). Esta ruptura na relação mãe-filhote, bem como a ruptura do filhote com o ambiente/ninho, induz mudanças fisiológicas que promovem alterações nos padrões comportamentais em resposta a estímulos estressores que perduram ao longo da vida do animal (Levine *et al.*, 1967; Hess *et al.*, 1969; Levine, 1993; Meaney *et al.*, 1993; Meaney *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 1996; Meerlo *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Levine, 2001).

Foi demonstrado que o modelo de manipulação causa uma redução nas concentrações de mRNA do CRH na amígdala central e um menor conteúdo deste hormônio no *Locus coeruleus* (LC) (Francis *et al.*, 1999). Existe também uma atenuação da ativação do LC induzida pelo CRH, o que resulta em pequenos aumentos de noradrenalina (NA) no PVN no hipotálamo, após o estresse por contenção (Liu *et al.*, 2000). Quando adultos, os ratos manipulados sintetizam e secretam menos CRH, ACTH e corticosterona quando expostos a diversos estressores e a secreção hormonal induzida pelo estresse apresenta um retorno mais rápido aos níveis basais, quando comparados a animais não manipulados (Plotsky e Meaney, 1993). Outro hormônio que sofre alterações devido à

manipulação neonatal é a prolactina (PRL). Ratos manipulados na infância apresentam uma menor secreção de PRL quando expostos a estresse agudo por contenção, quando comparados a ratos não manipulados (Severino *et al.*, 2004).

Lucion *et al.* (2003) demonstraram que a manipulação neonatal afeta o número de células em diferentes áreas do SNC. Ratos manipulados apresentam uma redução no número e no volume de células no LC, tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados ao grupo não manipulado (Lucion *et al.*, 2003). Estudos realizados em nosso laboratório demonstram que a manipulação neonatal causa uma redução na densidade de células e no diâmetro do soma neuronal na área pré-óptica medial (MPOA), e diminuição da densidade de células, volume e número total de neurônios na amígdala medial pósterodorsal (MePD) e no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) (Camozzato *et al.*, 2009).

A manipulação neonatal altera as respostas nociceptivas. Ratos machos submetidos à manipulação neonatal não apresentam alteração no limiar nociceptivo quando expostos a plataforma quente, entretanto fêmeas em diestro apresentam um aumento no limiar nociceptivo quando avaliadas no mesmo teste (Smythe *et al.*, 1994). A manipulação neonatal também causa alteração em camundongos submetidos ao tail-flick e ao teste de formalina, reduzindo a sensibilização à dor, nestas tarefas (D'amato *et al.*, 1999). Estes resultados demonstram que a manipulação neonatal modifica o sistema nociceptivo, o que pode ocorrer concomitantemente com alterações nas funções do eixo HPA.

Estudos mostram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) sofre alterações em animais que foram manipulados no período neonatal. Fêmeas manipuladas durante este período, apresentam alterações nas concentrações de

hormônios relacionados à ovulação (Gomes *et al.*, 2005) e ciclos estrais anovulatórios (Gomes *et al.*, 1999).

A manipulação neonatal também causa alterações comportamentais. Em ratos adultos (machos e fêmeas), reduz respostas emocionais expressadas por um aumento na atividade exploratória, o qual é interpretado como redução do medo a ambientes novos (Levine *et al.*, 1967; Bodnoff *et al.*, 1987; Fernández-Teruel *et al.*, 1991; Padoin *et al.*, 2001; De Azevedo *et al.*, 2010). Este procedimento reduz também um tipo específico de comportamento social, que é o comportamento de interação social em ratos machos adultos (Todeschin *et al.*, 2009). O comportamento sexual também está alterado. Em fêmeas, há uma redução do quociente de lordose (Gomes *et al.*, 2005); já os machos apresentam uma redução no número de montas (Gomes *et al.*, 1999; Padoin *et al.*, 2001), o que demonstra uma capacidade reprodutiva reduzida.

1.2 Sistema olfatório

Em roedores, o sistema olfatório pode discriminar milhares de estímulos químicos diferentes. Este sistema é discutido por vários autores devido a sua importância em diversos aspectos anatômicos, fisiológicos e comportamentais (Whitten e Champlin, 1959). O sistema olfatório se diferencia anatomicamente em dois sistemas distintos, que diferem quanto à natureza da informação processada. O bulbo olfatório principal (BOP) é responsável por discriminar uma grande variedade de odores presentes no ambiente, gerando assim, diversos tipos de comportamentos. O bulbo olfatório acessório (BOA) é um sistema que determina tarefas mais simples, detectando uma faixa menor de odores, como moléculas de

ferormônios, transmitindo a informação centralmente para iniciar um comportamento específico ou respostas endócrinas (Davis *et al.*, 1978; De Olmos *et al.*, 2004). Devido a isso, o sistema olfatório é capaz de processar informações de dois tipos de estímulos: os ferormônios, detectados pelo órgão vomeronasal (OVN) e os estímulos químicos do ar, pelo epitélio olfativo (EO), ambos situados na cavidade nasal. Os receptores do OVN se projetam para o BOA, localizado na região dorsocaudal do BOP. Estes sinais são processados primeiramente no bulbo olfatório (BO) de onde são projetados para diversas áreas envolvidas com a percepção, como a amígdala e o hipotálamo (Sanchez-Andrade *et al.*, 2005). O BOP, que detecta uma grande variedade de odores, recebe aferências do EO e envia suas eferências para a amígdala medial (AMe) (Davis *et al.*, 1978; de Olmos *et al.*, 2004) (Figura 1).

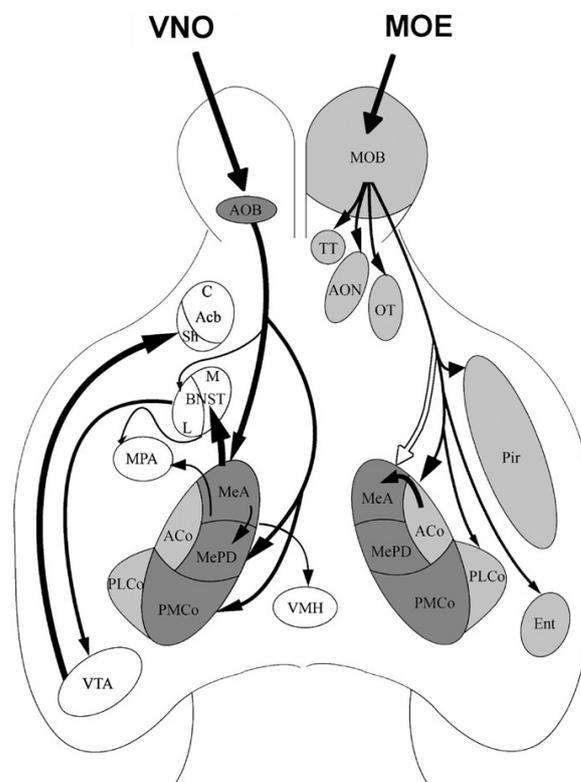


Figura 1 - Desenho esquemático das conexões do BOP (direita) BOA (esquerda) do sistema olfatório de camundongo (adaptado de (Baum, 2009).

Abreviações: VNO, órgão vomeronasal; AOB, bulbo olfatório acessório; MeA, amígdala medial; MePD, amígdala medial pósterodorsal; PMCo, amígdala cortical posteromedial; ACo, amígdala cortical anterior; PLCo, amígdala cortical posterolateral; BNST, núcleo da estria terminal - lateral (L) e medial (M); mPOA, área pré-óptica medial; VMH, núcleo hipotalâmico ventromedial; VTA, área tegmental ventral; Acb, núcleo accumbens; MOE, epitélio olfatório principal; MOB, bulbo olfatório principal; AON, núcleo olfatório anterior; OT, trato olfatório; Pir, córtex piriforme; Ent, cortex entorrinal.

A percepção olfatória ocorre nos neurônios sensoriais dentro do EO que se projetam até o BOP, este por sua vez, possui uma organização laminar, dividida em camadas de acordo com o tipo celular principal (Figura 2). A projeção dos neurônios sensoriais é feita através do nervo olfatório, que converge milhares de axônios do EO até a camada glomerular, onde se inicia a integração sináptica do BO (Shipley *et al.*, 2004). Os glomérulos têm papel fundamental na transmissão de sinais gerados nos receptores olfatórios, fazendo sinapse principalmente com as células mitrais (Meisami e Sendera, 1993). A camada plexiforme externa apresenta baixa densidade celular; nesta camada predominam os dendritos das células mitrais, células em tufo e células granulares. Logo após, está a camada mitral que contém o soma das células mitrais e as células granulares. As células mitrais estão arranjadas em uma camada única e contínua e são a principal via de saída do BO. As células mitrais e em tufo são as principais vias de eferência do BO e utilizam principalmente o glutamato como neurotransmissor. Estas células recebem aferências via conexão dendrítica primária dos glomérulos. As células mitrais e em tufo possuem seus dendritos na camada plexiforme externa, onde formam sinapses dendrodendríticas com as células granulares, que são interneurônios gabaérgicos. Imediatamente após esta camada, está a camada plexiforme interna, formada por vários axônios e dendritos e com baixa densidade de células. Após, está a camada de células granulares. Estas células são responsáveis pelo controle das eferências das células

mitrais e pela interação inibitória lateral. Por último, está a camada subependimal, que se caracteriza por ser progenitora de diversos tipos de células do BO (Shiple *et al.*, 2004).

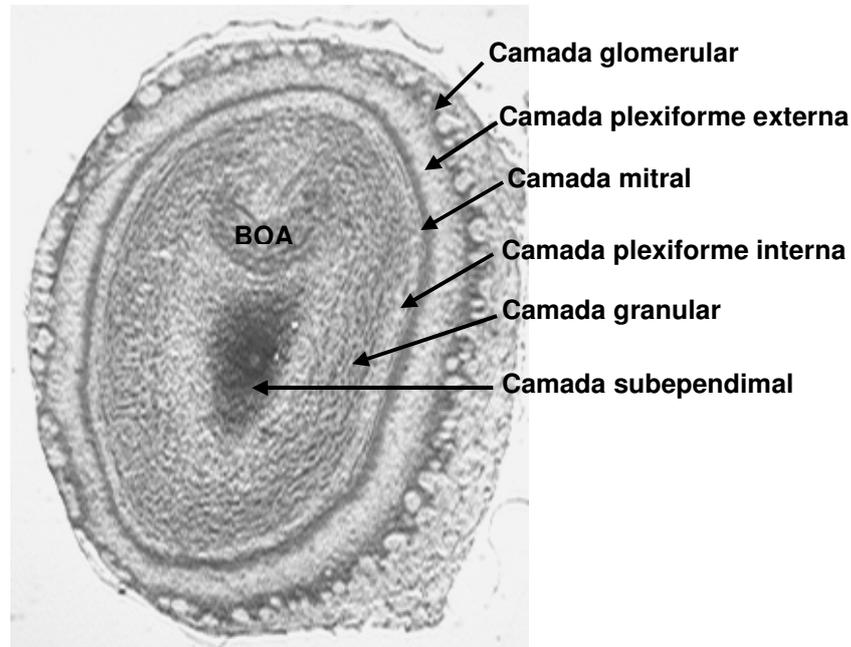


Figura 2 - Fotomicrografia do bulbo olfatório principal, mostrando a localização das camadas e o bulbo olfatório acessório (BOA)

As interações e os vínculos sociais são muito importantes para os humanos, assim como para diversas outras espécies de animais. A importância do reconhecimento social é fundamental para o desenvolvimento e a manutenção das estruturas sociais (Sanchez-Andrade e Kendrick, 2009). O cérebro está envolvido em sofisticadas especializações para o controle de comportamentos sociais (Sanchez-Andrade e Kendrick, 2009) e o BO possui extrema importância para estes comportamentos. O sistema olfatório é filogeneticamente conservado e apresenta um importante papel na memória de diversos comportamentos ecologicamente significativos tanto na infância quanto na vida adulta (Wilson *et al.*, 2004). Sendo assim, uma modificação no sistema olfatório além de prejudicar o aprendizado olfatório na infância, pode também ser responsável por alterações em

comportamentos que envolvam esta via, como por exemplo, os comportamentos sociais.

O reconhecimento mútuo da mãe pelo filhote em animais altriciais como os ratos assegura que o recém-nascido seja alimentado, cuidado e protegido. Assim, o olfato possui extrema importância para o desenvolvimento normal do filhote, sendo necessário para mediar a ligação mãe-filhote, e o reconhecimento da mãe pelo filhote se dá através do aprendizado olfatório (Sullivan *et al.*, 1989). Em ratos, para que ocorra o aprendizado olfatório, é necessário o pareamento de um estímulo tátil e um olfatório, neste caso, o cuidado maternal e o odor da mãe/ninho (Sullivan e Wilson, 2003). O reconhecimento do odor maternal na infância é diretamente dependente da memória olfativa e o processo de aprendizado olfatório produz mudanças metabólicas e anatômicas. Estas mudanças são causadas por uma reorganização do processamento de informações que ocorre no BO (Sanches-Andrade e Kendrick, 2009), devido a um aumento de NA no LC (Moriceau e Sullivan, 2004b). A NA e o LC possuem um importante papel no comportamento e na plasticidade neural no início do desenvolvimento. O aprendizado olfatório em filhotes requer aferências do LC para o BO durante a exposição a um odor para que a memória olfativa seja formada (Landers e Sullivan, 1999) (Figura 3).

As células mitrais possuem extrema importância na formação da memória do odor maternal (Sullivan *et al.*, 2000). A informação recebida e processada pelas células mitrais é enviada para áreas do córtex, onde ocorre o processamento final da informação sensorial (Saghatelian *et al.*, 2003). As mudanças que ocorrem nas sinapses entre as células mitral-granular são de crucial importância para o aprendizado olfatório (Sanches-Andrade e Kendrick, 2009).

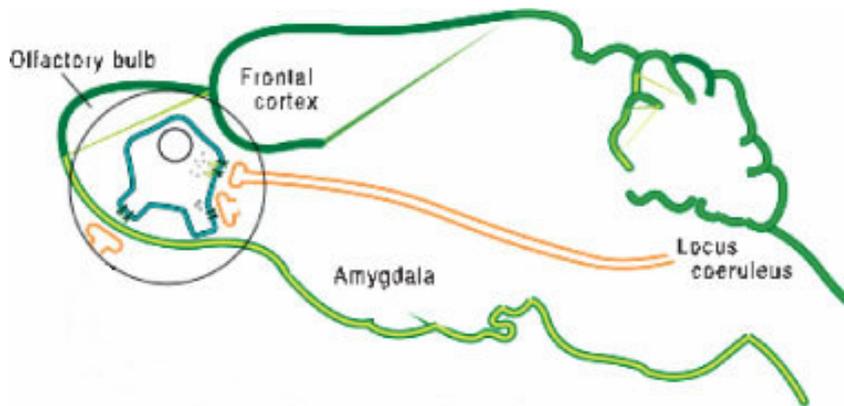


Figura 3 - Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO, a qual é importante para induzir o aprendizado olfatório (Modificado de (Moriceau e Sullivan, 2005))

As células mitrais estão diretamente envolvidas com o processo de aprendizagem olfatória, sendo assim, alterações nessas células podem estar modificando eventos biológicos significativos, tais como na relação mãe-filhote (Kendrick *et al.*, 1992; Wilson e Sullivan, 1994; Brennan e Keverne, 1997). Estas mudanças possuem extrema importância na vida adulta, pois o odor apresenta um papel essencial no comportamento sexual, no medo do predador, na busca por alimento, no reconhecimento de ambientes novos e no comportamento maternal (Moore *et al.*, 1997).

1.3 Preferência olfatória, preferência sexual e manipulação neonatal

O olfato, assim como o tato é um dos principais responsáveis pelo início do vínculo entre a mãe e o filhote. Esta capacidade de reconhecimento da mãe, pelo filhote, é essencial para sua sobrevivência e se dá através do aprendizado olfatório (Moriceau e Sullivan, 2004b) estando diretamente relacionado com a atividade noradrenérgica do LC (Moriceau e Sullivan, 2004b). A atividade noradrenérgica é

diferente em filhotes e adultos, principalmente devido a pouca ou a ausência da inibição dos auto-receptores α -adrenérgicos em filhotes. Estes receptores irão completar sua maturação por volta dos 10 dias de vida (Nakamura e Sakaguchi, 1990).

Os ratos no período neonatal são capazes de adquirir preferência pelo odor. Estudos realizados em nosso laboratório demonstram que ratos manipulados no período neonatal apresentam uma redução na preferência pelo odor maternal aos sete dias de idade, quando comparados a animais controle, ou seja, eles não reconhecem a presença da mãe nesta idade. Estes resultados demonstram uma interferência na relação mãe-filhote, a qual determina mudanças na vida adulta do animal manipulado. O não reconhecimento do odor da mãe pelo filhote pode ser devido a uma redução na atividade de NA no BO, o que altera a formação da memória de preferência de odor, neste caso, maternal.

O comportamento da mãe em relação ao seu filhote pode alterar o desenvolvimento do SNC do filhote (Levine, 2001). A estabilidade na relação mãe-filhote é importante para regular a neuroplasticidade do eixo HPA durante as primeiras semanas do período pós-natal (Van Oers *et al.*, 1999). Sendo assim, o estabelecimento da relação normal entre a mãe e o filhote é de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento da prole (Moriceau e Sullivan, 2005). O protocolo de manipulação neonatal aumenta esta interação através de um aumento do comportamento maternal imediatamente após os filhotes retornarem ao ninho (Meaney *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1997), desestabilizando assim, os padrões normais de cuidado maternal.

O reconhecimento do odor maternal em filhotes depende da memória olfativa. Ratos filhotes apresentam um período sensível para aprendizagem de respostas comportamentais associadas a novos odores, através da estimulação recebida por sua mãe (Sullivan *et al.*, 2000). Este período sensível e as respostas do aprendizado olfatório são críticos para manter a relação mãe-filhote necessária para a sobrevivência da prole. Este período se estende desde o nascimento até a segunda semana de vida e caracteriza-se por um aumento no aprendizado olfatório (Sullivan e Wilson, 1995).

O olfato também é uma importante ferramenta reguladora do comportamento sexual, tanto de invertebrados, como vertebrados (Dias *et al.*, 2008). A preferência por parceiro é um paradigma que tem sido utilizado para avaliar aspectos motivacionais de comportamento sexual tanto em machos quanto em fêmeas de diversas espécies, inclusive em roedores (Avitsur e Yirmiya, 1999).

Vários estudos demonstram que a atividade do eixo HPG pode sofrer alterações em animais que foram manipulados no período neonatal, alterando assim diversos aspectos relacionados aos comportamentos sociais e sexuais. Fêmeas manipuladas durante este período, além de apresentarem uma diminuição no comportamento sexual, (Padoin *et al.*, 2001) apresentam ciclos estrais anovulatórios o que demonstra uma capacidade reprodutiva reduzida (Gomes *et al.*, 1999). Gomes *et al.* (2005), demonstraram que hormônios relacionados à ovulação e ao comportamento sexual em fêmeas, também estão alterados em ratos que foram manipulados nas duas primeiras semanas de vida.

A perpetuação da espécie e a procriação são processos complexos, nos quais eventos fisiológicos e comportamentais devem ocorrer de modo sincrônico para que haja o sucesso reprodutivo. Alterações nestes mecanismos podem

comprometer comportamentos relacionados com a preservação e a proliferação da espécie (Cameron *et al.*, 2005). A percepção de odores irá influenciar e até mesmo determinar diversas fases do processo reprodutivo de um animal, como o reconhecimento do parceiro e o comportamento sexual (Brennan e Keverne, 1997). Estes fatores são determinantes para o sucesso reprodutivo.

1.4 Comportamento maternal

O comportamento dos mamíferos durante a lactação difere daquele exibido por fêmeas em outros períodos de seus ciclos reprodutivos (Ferreira e Hansen, 1986). No final da gravidez e durante os primeiros dias da lactação, as fêmeas passam por importantes mudanças hormonais e comportamentais que induzem e permitem a nutrição e cuidado da prole, para que a fêmea possa cumprir com êxito sua função reprodutiva e garantir a sobrevivência dos filhotes (Russell *et al.*, 2001; Numan e Insel, 2003; Giovenardi *et al.*, 2005). Uma das hipóteses que poderia explicar o rápido surgimento do comportamento maternal seriam as mudanças hormonais que ocorrem no término da gestação (Numan, 1994). Nesta fase e durante os primeiros dias de lactação, a fêmea passa por mudanças hormonais (Numan, 1994) e comportamentais importantes que induzem e habilitam-na a proteger e orientar a ninhada (Stern e Johnson, 1990). A presença dos filhotes também é fundamental para o surgimento deste comportamento (Giovenardi *et al.*, 2000).

O comportamento maternal em ratas consiste de vários elementos integrados e que estão relacionados com a nutrição e o cuidado dos filhotes (Figura 4). Eles podem envolver diretamente os filhotes (amamentação, lambida, busca e

recolhimento de filhotes) ou não (construção de ninhos, comportamento agressivo maternal, aumento da ingestão e diminuição de medo e ansiedade) (Rosenblatt *et al.*, 1996). Este padrão complexo aparece espontaneamente em mães primíparas. Perto da data do parto, a mãe inicia uma sequência de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na limpeza da região mamária e, alguns dias antes do parto, ela constrói um ninho com o substrato disponível (Numan, 1994).

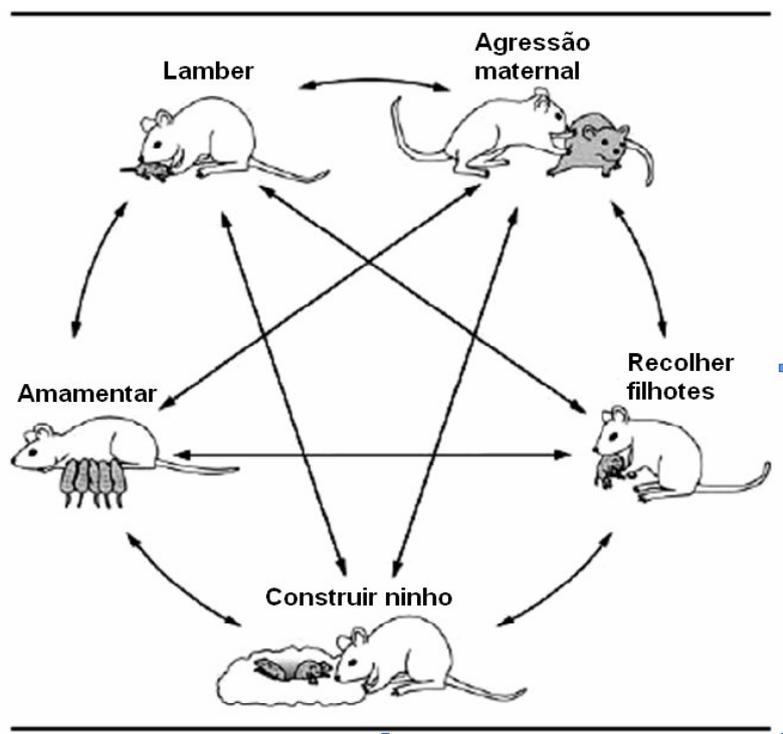


Figura 4 - Desenho de um subconjunto de comportamentos maternos incluindo recolher filhotes, construir ninho, amamentar, lambar e agressão maternal (contra um intruso) adaptado de Gammie 2005.

Após o estabelecimento da interação mãe-filhote, a resposta maternal passa a ser induzida por estímulo dos filhotes, independentemente de hormônios (Van Leengoed *et al.*, 1987). A rata lactante precisa de vários estímulos, além das mudanças hormonais causadas pela gestação em si, para estabelecer uma resposta maternal. O principal estímulo é a presença dos filhotes, que atrai a atenção da mãe,

com alguns comportamentos, como vocalizações e movimentos do corpo, e pelo olfato (Moore *et al.*, 1997).

Em ratos, o comportamento maternal ocorre com maior frequência nos primeiros dez dias após o parto, onde as lactantes passam até 85% do tempo total junto aos filhotes; este padrão diminui gradualmente (Grota e Ader, 1969). Existem variações naturais nestes cuidados, especialmente nos comportamentos de amamentação e lambida de filhotes (Champagne *et al.*, 2007). Os filhotes de ratos, assim como a maioria dos roedores, nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, não possuem o sistema visual e auditivo bem desenvolvido, são incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (Grota e Ader, 1969; 1974).

Durante o período da lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e manifestam-no pela busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los de nutrição e calor, construção do ninho e defesa contra intrusos (Grota e Ader, 1969; Stern e Johnson, 1990; Albert e Walsh, 1995). Os diversos comportamentos maternos parecem ser modulados por diferentes vias neurais. A postura de amamentação é reflexamente iniciada pelos filhotes, sendo necessário que os mesmos estejam vivos, quentes e presos aos mamilos. A fêmea lactante pode manter-se por cima da ninhada com uma postura arqueada, o que faz com que as mamas fiquem mais expostas e facilita a ejeção do leite pelo estímulo de sucção dos filhotes (Stern e Johnson, 1990).

O comportamento de lambar a prole parece expressar a motivação da mãe em relação à ninhada (Stern, 1997), sendo este comportamento nato da mãe e independente da ação do filhote. A lambida serve para melhorar o crescimento

somático e o desenvolvimento do cérebro através de efeitos imediatos no sistema endócrino do filhote (Schanberg *et al.*, 1984; Levine, 2001). Além disso, a estimulação tátil causada por este comportamento também é responsável pela ligação e pelo vínculo do filhote com sua mãe, através do aprendizado olfatório (Sullivan e Wilson, 1995). Sendo assim, a frequência do comportamento de lambe os filhotes tem sido utilizada como parâmetro para mensurar o cuidado materno (Champagne *et al.*, 2003).

Até aproximadamente o 12^o dia de vida, é a mãe que toma iniciativa de se aproximar dos filhotes. Após este período, os filhotes estão aptos a se locomoverem e a deixar o ninho, então são eles que se aproximam da mãe para requererem cuidados (Leon e Moltz, 1971). Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame, que ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida (Reisbick *et al.*, 1975).

Interações normais na relação mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos. A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (Pauk *et al.*, 1986). O contato físico ativo provido pela mãe é particularmente importante para a regulação dos processos de crescimento normal em filhotes de mamíferos.

Diversos estudos relacionados ao desenvolvimento de roedores demonstram que a mãe é responsável por regular diversas respostas fisiológicas nos filhotes, como por exemplo, a frequência cardíaca, os ciclos de sono/vigília e a produção de hormônio do crescimento (GH) (Levine, 2001). Ratos com duas semanas de idade, se separados por 24 horas da mãe, apresentam um decréscimo de 40% da

frequência cardíaca. Este decréscimo ocorre devido à ausência do leite materno e pelo rompimento do contato maternal e é revertido assim que a mãe retorna (Levine, 2001).

Filhotes em que a mãe despende mais tempo para cuidá-los, lambendo-os mais, apresentam quando adultos um aumento de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma redução na secreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse (Liu *et al.*, 1997). Esta resposta é similar à de animais que são manipulados no período neonatal.

Acredita-se que as intervenções realizadas no período hiporresponsivo ao estresse podem ter um efeito próprio, bem como podem induzir um aumento do comportamento maternal, devido a uma alteração na relação mãe-filhote. O procedimento realizado pelo experimentador seria um estímulo para aumentar o comportamento da mãe em relação à prole (Liu *et al.*, 1997). Sendo assim, diversos estudos tentam esclarecer se os efeitos comportamentais e neuroendócrinos observados em um animal que sofreu intervenção no período neonatal são devidos à intervenção em si ou ao comportamento da mãe ao retornar para o ninho.

Experiências que ocorrem no início da vida são conhecidas por exercer fortes influências no comportamento e no desenvolvimento do SNC em diversos animais, inclusive em humanos (Liu *et al.*, 2000). Para muitas espécies, a mãe representa uma fonte de alimentação, calor, proteção e educação, que são fatores essenciais para o desenvolvimento de comportamentos sociais normais (Kuhn e Schanberg, 1998). O período neonatal, para humanos e a maioria dos mamíferos, é caracterizado por uma intensa relação entre a mãe e o filhote, o que ajuda o neonato a se adaptar no novo ambiente e forma o vínculo afetivo (Winberg, 2005). Em

algumas espécies, como o musaranho, os filhotes permanecem muito tempo sozinhos enquanto a mãe vai em busca de alimento e recebem alimentação uma única e longa vez ao dia. Outras espécies, como os ratos, os filhotes se alimentam quase que continuamente durante os primeiros dias de vida, mas gradualmente este período aumenta e eles começam a ficar menos dependentes da mãe (Ader e Grota, 1970). A maioria das espécies de primatas despende a maior parte do tempo com a mãe nos primeiros dias de vida e se tornam independentes ao longo do tempo (Kuhn e Schanberg, 1998). Cada espécie possui o desenvolvimento fisiológico apropriado e adaptações comportamentais que permitem uma adaptação ideal ao ambiente em que vivem.

Em ratos, a alteração ou interferência no ambiente neonatal podem alterar a relação mãe-filhote, modificando assim padrões comportamentais estáveis da mãe em relação a sua prole (De Azevedo *et al.*, 2010). A manipulação neonatal pode causar estas alterações. Estudos demonstram que as mães de filhotes manipulados no período neonatal apresentam um aumento nos padrões de amamentação e lambida (Liu *et al.*, 1997) logo após o retorno dos filhotes ao ninho. Sabe-se que esta alteração comportamental da mãe pode alterar o desenvolvimento do SNC do filhote (Pryce e Feldon, 2003). Devido a estes fatores, infere-se que as alterações que ocorrem na relação mãe-filhote sejam responsáveis pelas alterações no padrão comportamental e neuroendócrino encontrado em ratos que foram manipulados no período neonatal.

A atividade do eixo HPA em ratos neonatos parece depender da presença da mãe (Suchecki *et al.*, 1993). Portanto, fatores externos, como a presença da mãe, podem interferir nos processos fisiológicos dos filhotes (Suchecki *et al.*, 1993). O comportamento de ratos adultos que sofreram intervenção no período neonatal é

afetado pelos estímulos ambientais combinados com a resposta imediata da mãe em relação aos filhotes (Villescas *et al.*, 1977).

Assim, essas alterações fisiológicas e endócrinas observadas em animais neonatos e adultos podem ser devidas à interferência na relação mãe-filhote em um período crítico para o desenvolvimento do SNC de roedores. Mães que foram privadas durante algum período de suas ninhadas lambem, cuidam e permanecem mais tempo em cima dos filhotes do que aquelas cuja relação mãe-filhote não sofreu interferência (Liu *et al.*, 1997).

Interações normais na relação mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos. A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (Schanberg *et al.*, 1984; Pauk *et al.*, 1986). O contato físico ativo provido pela mãe é particularmente importante para a regulação dos processos de crescimento normal em filhotes de mamíferos. Sendo assim, diversos estudos tentam esclarecer se os efeitos comportamentais e neuroendócrinos observados em um animal que sofreu intervenção no período neonatal são devidos à intervenção em si, ao comportamento da mãe ao retornar para o ninho ou a um rompimento do ambiente neonatal.

Devemos considerar que este comportamento da mãe é muito importante, mas existem outros fatores que parecem ser decisivos para o desenvolvimento normal do filhote como seu cheiro (estímulo olfativo) e o próprio ninho. A relação do filhote com os próprios irmãos e a ruptura do ambiente em que ele vive (ninho) contribui de forma significativa para desencadear as alterações comportamentais observadas na idade adulta, em ratos que sofreram algum tipo de intervenção neonatal (Benetti *et al.*, 2007; De Azevedo *et al.*, 2010).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a manipulação neonatal causa diversas alterações comportamentais e neuroendócrinas que perduram ao longo da vida do animal. Este procedimento tem um efeito próprio, bem como causa uma alteração na relação mãe-filhote. Nesta fase, o reconhecimento do odor maternal é de fundamental importância para a sobrevivência dos neonatos, pois eles dependem da mãe para se manterem vivos. Este reconhecimento ocorre devido ao pareamento do cuidado maternal com o cheiro da mãe, chamado de aprendizado olfatório. O odor irá interferir diretamente na vida do animal, pois está relacionado com o reconhecimento da mãe, busca de alimento, comportamento reprodutivo e comportamento de medo. Devido a isso, o sistema olfativo é um fator importante a ser estudado. Considerando que experiências que ocorrem no início da vida podem modificar diversos comportamentos sociais do animal quando adulto, como por exemplo, comportamento sexual, interação e memória social, o presente trabalho hipotetiza que a intervenção ambiental pode modificar a morfologia do bulbo olfatório e assim induzir alterações de comportamentos sociais no filhote e na idade adulta. Sendo assim, analisamos quantitativamente o número de células em três camadas do bulbo olfatório, de ratos machos e fêmeas no período neonatal e na vida adulta, bem como comportamentos que envolvem este sistema.

Este tipo de estudo é relevante face ao fato de que o sistema olfatório está envolvido com diversos aspectos na sobrevivência e na perpetuação das espécies. Portanto, avaliar os efeitos de intervenções no período neonatal é imprescindível para um melhor entendimento da fisiologia do comportamento, visto que alterações nessa fase podem perdurar ao longo da vida do animal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar se a manipulação neonatal altera a morfologia do bulbo olfatório em ratos. Além disso, estudar o envolvimento do sistema olfatório (no período neonatal e na vida adulta do animal) no estabelecimento das relações sociais em ratos que sofreram manipulação neonatal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar quantitativamente o número de células nas camadas glomerular, mitral e granular do bulbo olfatório de ratos, machos e fêmeas, aos 11 e aos 90 dias de idade;
- Avaliar quantitativamente o número de células mitrais dentro da camada mitral do bulbo olfatório de ratos, machos e fêmeas, aos 11 e aos 90 dias de idade;
- Avaliar através a expressão da proteína neuronal nuclear (NeuN), a quantidade de células neuronais nas camadas glomerular, mitral e granular do bulbo olfatório de ratos, machos e fêmeas, aos 11 e aos 90 dias de idade.
- Avaliar a preferência pelo odor do ninho aos 11 dias de vida em ratos (machos e fêmeas) que foram manipulados no período neonatal;

- Avaliar a preferência sexual na vida adulta, de ratos (machos e fêmeas) que foram manipulados no período neonatal.
- Analisar de maneira pontual (frequência comportamental em diferentes períodos do dia) o comportamento maternal de ratas cujos filhotes foram manipulados, em quatro períodos ao longo dos 10 primeiros dias pós-parto.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi utilizada para a realização de todos os experimentos desenvolvidos nesta tese. Porém, o item material e métodos foi dividido em seções onde foi descrito detalhadamente a metodologia específica de cada experimento.

4.1 Local de realização

Os experimentos apresentados nesta tese foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A contagem de células foi realizada em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas. A técnica de imunistoquímica foi realizada na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre no Laboratório de Patologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

4.2 Animais

Foram utilizadas ratas prenhas (N=40), primíparas, da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estas ratas foram levadas para o biotério setorial do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, cerca de uma semana antes do parto, onde foram colocadas em

caixas-residência (com as seguintes dimensões: 65 x 55 x 25 cm) com maravalha servindo de substrato. O dia do nascimento dos filhotes foi controlado e denominado dia zero. No dia seguinte ao nascimento (dia pós-natal 1 – DPN1), as ninhadas foram padronizadas aleatoriamente em oito filhotes. Aos 21 dias de idade os filhotes foram desmamados e machos e fêmeas permaneceram em caixas separadas, com cinco animais até a idade adulta. Os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 17:30 horas. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de 22°C. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida (Rodent Show, Nutrilab, Colombo, Brasil) durante todo o período desta pesquisa e foram tratados pelos funcionários do próprio biotério.

Todos os procedimentos estão de acordo com as orientações éticas do uso de animais experimentais, conforme orientação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram tomados todos os cuidados para reduzir o número de animais usados e seu sofrimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o parecer nº 2007/767.

4.3 Grupos experimentais

Ao parirem (DPN 0), as ratas com suas ninhadas foram divididas em dois grupos:

- **Não manipulado/controle (NM):** animais que não foram tocados pelos experimentadores nem pelos tratadores durante os 10 primeiros dias após o nascimento.

• **Manipulados (M):** animais que foram separados brevemente da mãe e manipulados durante 1 minuto por dia, nos 10 primeiros dias após o nascimento. A manipulação consistiu em retirar a mãe da caixa-residência e colocá-la em uma caixa separada contendo maravalha. Os filhotes foram retirados do ninho e suavemente manipulados todos juntos, pelas mãos do pesquisador que utilizou luvas de látex. A manipulação foi realizada de maneira sutil, durante 1 minuto. Logo após, os filhotes foram devolvidos para seus ninhos nas caixas-residência e a mãe foi colocada junto a eles novamente.

Este procedimento (Figura 5) foi realizado no ciclo claro e teve início no dia seguinte ao nascimento dos filhotes, considerado dia 1 (DPN1) e ambos os grupos tiveram suas caixas-residência limpas somente a partir do DPN11.

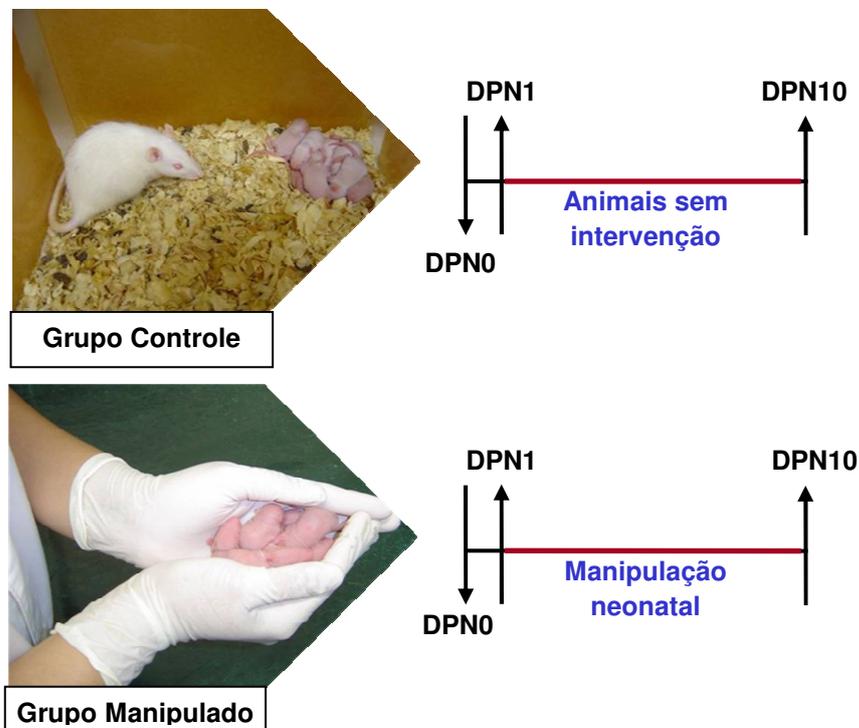


Figura 5 – Grupos experimentais

4.4 Ciclo estral

Para a realização dos procedimentos com fêmeas adultas, foi verificado o ciclo estral. A partir de 70 dias de idade, foi feita a coleta diária do esfregaço vaginal, obtida através da lavagem vaginal feita com solução salina, a fim de verificar a fase do ciclo em que a fêmea estava. Após a coleta, o material foi analisado a fresco em um microscópio óptico. As fases do ciclo foram determinadas pela avaliação citológica. Foram utilizadas nos experimentos somente ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares seguidos.

4.5 Eutanásia e descarte

Os animais submetidos aos procedimentos histológicos foram eutanasiados durante o procedimento de perfusão para a realização das análises histológicas. Este protocolo experimental foi necessário para viabilizar a coleta das estruturas cerebrais de interesse desse trabalho. Os animais foram conduzidos do biotério setorial para o laboratório, onde estão localizados os equipamentos para os procedimentos experimentais. Para a realização da perfusão os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 5-10 mg/kg de xilasina (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brasil) e 75-95 mg/kg de quetamina (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brasil). Esse procedimento foi realizado em uma sala separada, afastada dos outros animais para não estressá-los. Após a perfusão, o bulbo olfatório dos animais foi retirado e armazenado em um frasco contendo uma solução tamponada de paraformaldeído (4%). O material utilizado nos procedimentos foi lavado e os resíduos (papel com sangue e outros resíduos) devidamente descartados. Os animais utilizados para os procedimentos comportamentais foram

levados ao biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo devidamente eutanasiados em uma câmara de CO₂.

Quanto aos procedimentos de descarte, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos de coloração branca, próprios para descarte, armazenadas em freezer (-18° C) e após aviso prévio, foram conduzidas ao Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os resíduos biológicos, tais como: tecidos ou partes do encéfalo foram levados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) onde o tratamento foi posteriormente realizado. Todos os resíduos biológicos tiveram o mesmo tratamento dado às carcaças.

4.6 SEÇÃO 1 - SISTEMA OLFATÓRIO

4.6.1 Delineamento experimental

Para a realização dos experimentos descritos neste capítulo, foram utilizados ratos machos e fêmeas dos grupos NM e M aos 11 e aos 90 dias de idade (Figura 6). O número de animais de cada grupo experimental foi de seis. As fêmeas adultas foram estudadas na fase de diestro. Para isto, o ciclo estral foi observado diariamente através do esfregaço vaginal por um período de 15 dias e somente fêmeas com três ciclos regulares foram estudadas.

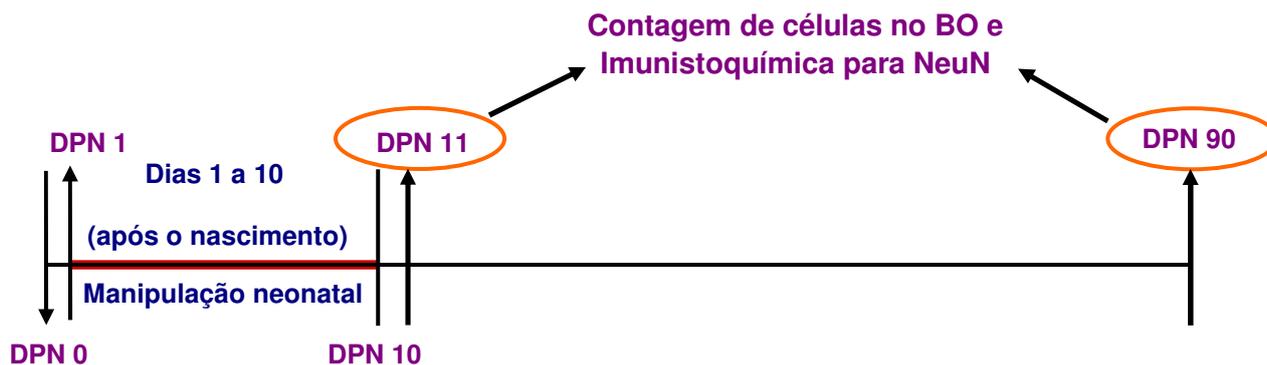


Figura 6 - Desenho esquemático do delineamento experimental.

4.6.2 Cálculo da densidade numérica de células (Nv) por volume do dissector

Protocolo experimental

Para a realização deste experimento foi feita uma estimativa da densidade numérica de células na camada glomerular, na camada mitral e na camada granular do BO. O cálculo da densidade numérica de células foi realizado no lado direito e esquerdo do BO, entretanto para a análise dos resultados foi realizada a soma dos lados.

- Animais: os animais (machos e fêmeas) foram perfundidos e seus cérebros, fixados, incluídos, cortados e corados com cresil violeta e posteriormente analisados através de técnica de contagem.

- Histologia: para a realização da perfusão os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 5-10 mg/kg de xilasina (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brasil) e 75-95 mg/kg de quetamina (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brasil). Após a anestesia, foi feita a toracotomia onde o coração foi exposto, e a seguir colocada uma cânula no ventrículo esquerdo. Os animais foram então perfundidos, com o auxílio de uma bomba peristáltica, contendo uma solução

lavadora de tampão fosfatado com heparina (50 mL em animais com 11 dias e 100 mL em animais com 90 dias), seguido por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4).

Após a perfusão transcardíaca o encéfalo foi retirado do crânio e permaneceu na mesma solução fixadora por 8h. Depois de fixado, o cérebro foi lavado por 1h em água corrente e desidratado em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), colocado em xilol e incluído na posição final com uma resina paraplastic (Histosec - Merck). Após a inclusão, foram realizadas secções coronais seriadas do cérebro, com 5 μ m de espessura cada, cortadas em um micrótomo e coletadas em série de fatias em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram corados com cresil violeta e depois desidratados através de séries de álcool, clareados com xilol e encobertos com Entellan (Merck). O BO, foi identificado de acordo com atlas do cérebro de ratos de (Paxinos e Watson, 2007) e com o atlas estereotáxico do bulbo olfatório de rato de Slotnick e Hersch (1980).

- Cálculo da densidade numérica de células (Nv) por volume do disector: para o cálculo da densidade numérica utilizamos a técnica do disector óptico. Foi utilizado um microscópio (Zeiss Axioscop2) com uma lente de 100X e uma câmera de vídeo (CCD vídeo câmera module) acoplada a um computador (Apple Macintosh 8600-300) e um sistema para análise de imagem (NIH Image 1.62f). As contagens foram realizadas em secções de 5 μ m, onde focalizávamos as faces superior (look up) e inferior (look down), através da alteração de foco (alterando o eixo-z), sendo que a distância entre esses planos foi a própria espessura do corte (5 μ m).

Por razão de eficiência, o núcleo da célula foi considerado a representação de uma célula e somente foram contadas as células observadas em apenas um dos planos. A Q_A (número das células contadas na área teste) foi o número de núcleos

celulares, visto em somente um foco, quando eles estão totalmente ou parcialmente dentro da estrutura (Schmitz e Hof, 2005). A contagem foi realizada do lado direito e esquerdo em uma área teste de $8.405\mu\text{m}^2$ para a contagem de células nas camadas glomerular, mitral e granular e de $15.558\mu\text{m}^2$ para a contagem de células mitrais dentro da camada mitral. Para obter uma contagem imparcial da estrutura foi utilizada uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão), quando o objeto tocava as linhas proibidas ele não era contado, no entanto quando contava as linhas aceitáveis ou estivesse dentro da área completamente ele foi contado (Howard e Reed, 1998).

A contagem do BO foi feita ao longo da extensão de todo o núcleo iniciando na região posterior correspondente à lâmina 16.21 do atlas estereotáxico do bulbo olfatório de rato (Slotnick e Hersch, 1980) até o fim do núcleo. Foram contados 10 cortes por rato, com intervalo de 20 cortes nos filhotes e 40 nos adultos, resultando em 60 cortes por grupo.

Como a contagem foi realizada dentro de uma área teste conhecida (A_T), então o volume do disector (V_{Dis}) foi calculado através da multiplicação da área teste pela espessura da microtomia ($A_T \cdot e$), e essa contagem dentro desse volume do disector é considerada imparcial. A densidade numérica de células (N_v) pode ser estimada pela seguinte fórmula: $N_v = Q_A / A_T \cdot e$ $1/\text{mm}^3$; Onde N_v = densidade numérica de células; Q_A = número das células contadas na área teste; A_T = área teste; e = espessura (Mandarim-De-Lacerda, 2003).

- Delimitação das camadas do BO: Para a realização deste experimento foi feita a análise histológica do BO e a delimitação das camadas a serem analisadas (Figura 7). Após este procedimento foi realizada uma estimativa do número de

células nas seguintes regiões: camada glomerular, camada mitral e camada granular. Dentro da camada mitral, foi feita a análise das células totais e separadamente das células mitrais (Figura 8).

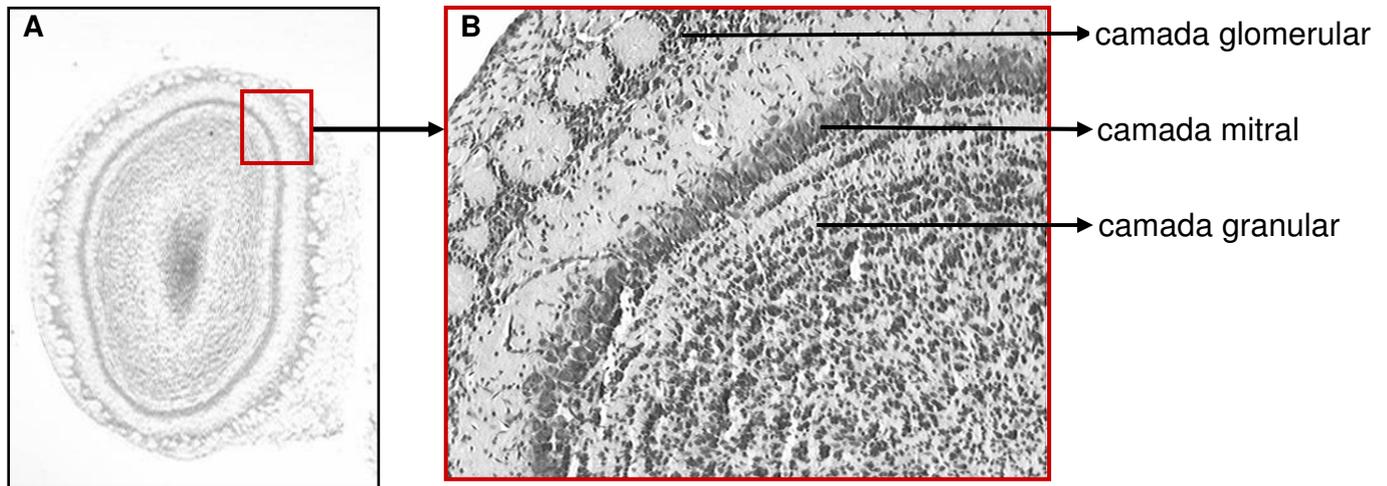


Figura 7 - Fotomicrografia de um corte sagital do bulbo olfatório (A). Delimitação das três camadas analisadas (B).

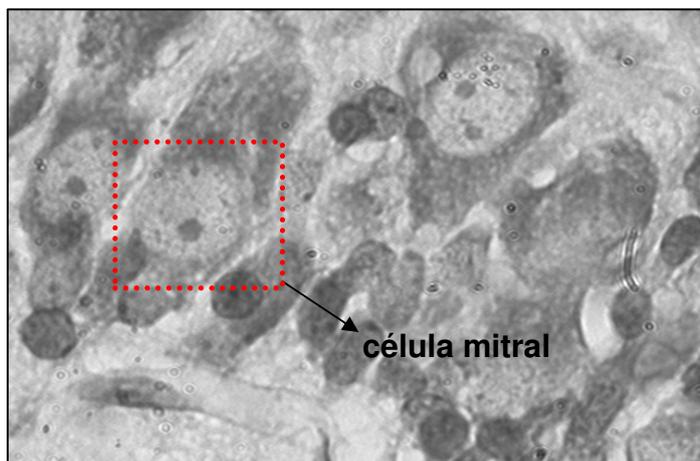


Figura 8 - Fotomicrografia da camada mitral e das células mitrais

4.6.3 Quantificação de neurônios NeuN positivos

Protocolo experimental

Para a realização deste experimento foi feita uma estimativa do número de neurônios pela expressão da proteína neuronal nuclear (NeuN) na camada glomerular, camada mitral e camada granular do BO. A quantificação de neurônios NeuN positivos foi realizada no lado direito e esquerdo do BO, entretanto para a análise dos resultados foi feita a soma dos lados.

- Animais: os animais (machos e fêmeas) foram perfundidos e seus cérebros, fixados, incluídos, cortados e armazenados em freezer (-18°C). Posteriormente foi realizada a técnica de imunistoquímica para a marcação dos neurônios NeuN-positivos.

- Histologia: para a realização do experimento os animais foram anestesiados e perfundidos (conforme a técnica descrita acima no item 3.2) com solução lavadora de tampão fosfatado com heparina, seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4).

Após a perfusão transcardíaca o encéfalo foi retirado do crânio e permaneceu na mesma solução fixadora por 8h. Depois de fixado, o cérebro foi lavado por 1h em água corrente e desidratado em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), colocado em xilol e incluído na posição final com uma resina paraplastic (Histosec - Merck). Após a inclusão, foram realizadas secções coronais seriadas do cérebro, com 5µm espessura cada, cortadas em um micrótomo e coletadas em série de fatias em lâminas gelatinizadas. Após a coleta os cortes foram mantidos em freezer -18°C até o momento da imunistoquímica.

- Técnica de imunistoquímica: para a realização da imunistoquímica as

lâminas contendo os cortes foram desparafinizados em estufa a 70°C e lavados em álcool 100% e xilol. Após este procedimento, foi feita a recuperação em citrato de sódio (pH 6,0). Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram embebidos em uma solução de peróxido de hidrogênio 5% e após 20 minutos foi feita a lavagem em PBS. Após este procedimento foi feito o bloqueio das proteínas inespecíficas com albumina de soro bovino 1% durante 1h. As secções, foram incubadas com anticorpo primário (anti-NeuN, da marca Chemicon International) na diluição de 1:1000 por 12h a 4°C. Após o período de incubação o material foi lavado em PBS e os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-mouse/rabbit (Picture Max, HPR Polimer conjugate da marca Invitrogen) durante 40 minutos. O material foi então lavado em PBS e foi feita a incubação com anticorpo terciário (Picture Max, HPR Polimer conjugate da marca Invitrogen) durante 40 minutos. Após este processo o material foi novamente lavado com PBS. Para a visualização da reação os cortes foram tratados com tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) 0,06% diluído em PBS. Os cortes foram lavados em PBS, desidratados em álcool 100% e diafanizados em xilol. As lâminas foram então, cobertas com entellan e lamínulas.

Para o controle da técnica de imunistoquímica, o anticorpo primário foi substituído por PBS e o restante do procedimento foi idêntico ao descrito acima.

- Quantificação dos neurônios NeuN-positivos: para a quantificação dos neurônios marcados imunistoquimicamente para proteína NeuN, foi utilizado um microscópio (Zeiss Axioscop2) com uma lente de 100x e uma câmera de vídeo (CCD vídeo camera module) acoplada a um computador (Apple Macintosh 8600-300) e um sistema para análise de imagem (NIH Image 1.62f). A contagem dos neurônios de cada região foi realizada utilizando-se os hemisférios direito e esquerdo (Madruga *et*

al., 2006), e com o auxílio de uma área teste ($8.405 \mu\text{m}^2$). Para obter uma contagem imparcial da estrutura foi utilizada uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão). Foram contados os neurônios que encontravam-se dentro desta área teste e os que encostavam nas linhas de inclusão. Os neurônios que incidiam sobre as linhas de exclusão, não foram contados (Howard e Reed, 1998; Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007; Camozzato *et al.*, 2009).

4.6.4 Cálculo de tamanho da amostra

Cálculo da densidade numérica de células (Nv) por volume do dissector

Para a realização do experimento de contagem de células o n amostral foi calculado para a variável número de células, com base em estudos realizados anteriormente pelo nosso laboratório (Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007). Foi considerado um poder de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$. O número de animais calculado foi de seis por grupo.

Quantificação de células NeuN positivas

Para a realização do experimento imunoistoquímica o n amostral foi calculado para a variável número de células, com base em estudos realizados anteriormente pelo grupo (Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007). Foi considerado um poder de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$. O número de animais calculado foi de seis por grupo.

4.6.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos através de média (\pm EPM). Para a análise dos resultados do cálculo da densidade numérica de células e para a contagem de células NeuN-positivas foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, quando necessário. Os fatores considerados foram grupo (manipulado ou não manipulado) e idade (11 dias ou 90 dias). O nível de significância utilizado para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa foi de 5% ($P < 0,05$). O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado com ferramenta computacional para a análise estatística do dados.

4.7 SEÇÃO 2 - PREFERÊNCIA PELO ODOR DO NINHO E PREFERÊNCIA SEXUAL

4.7.1 Delineamento experimental

Para a realização dos experimentos descritos neste capítulo, foram utilizados ratos machos (N=37) e fêmeas (N=37) divididos em grupos NM e M. Aos 11 dias de idade foi retirado um macho e uma fêmea de cada ninhada para a realização do teste de preferência pelo odor do ninho, após o teste os filhotes foram marcados e colocados novamente na ninhada, onde permaneceram até o desmame. Na idade adulta (DPN90), os mesmos animais foram testados quanto à preferência sexual (Figura 9).

As fêmeas adultas foram estudadas na fase de proestro, que é a fase receptiva. Para isto, o ciclo estral foi observado diariamente através do esfregaço

vaginal por um período de 15 dias e somente fêmeas com três ciclos regulares foram estudadas.

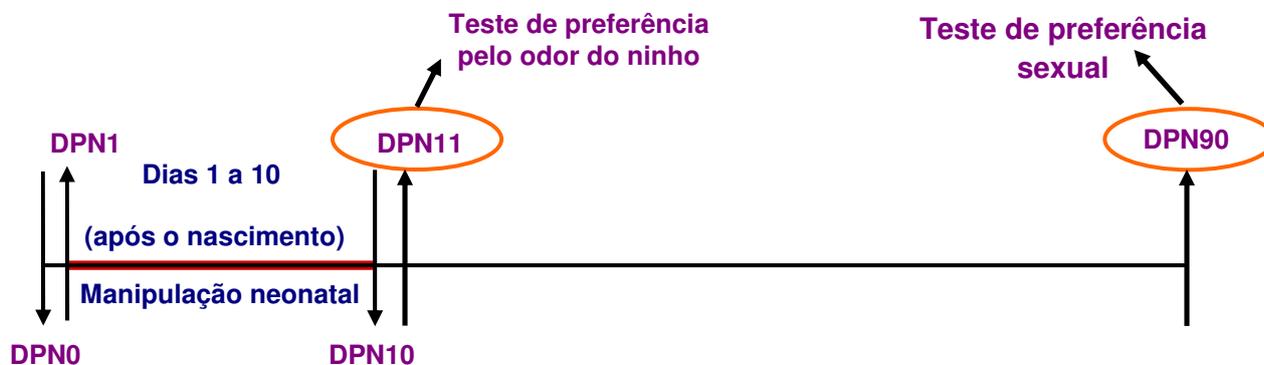


Figura 9 - Desenho esquemático do delineamento experimental

4.7.2 Preferência pelo odor do ninho (odor familiar) em filhotes (machos e fêmeas)

Protocolo experimental

Este teste permite que o filhote possa escolher entre duas áreas com maravalhas de odores diferentes, onde uma das áreas é colocada a maravalha do ninho em que o filhote vive (odor familiar) e na outra uma maravalha limpa (odor neutro).

- Teste de preferência pelo odor do ninho: este teste mede o tempo que o filhote gasta em torno do odor familiar, ou seja, o cheiro do ninho. Para isto, foi utilizada uma arena de acrílico transparente dividida em duas partes por uma linha central de dois centímetros. Em um lado foi colocado 300 mL de maravalha limpa e no outro a mesma quantidade de maravalha do ninho. O filhote foi colocado na linha central, entre os dois odores e monitorado através de uma filmadora durante 1 minuto. Este procedimento foi repetido cinco vezes, com um intervalo de 2 minutos,

sendo que em cada sessão de filmagem a caixa era limpa com álcool 70% e as maravalhas foram invertidas para que não houvesse nenhum tipo de condicionamento do filhote. Os parâmetros analisados foram: o tempo em que o filhote despende cheirando cada área e a latência em que ele alcança a região da maravalha (Figura 10).

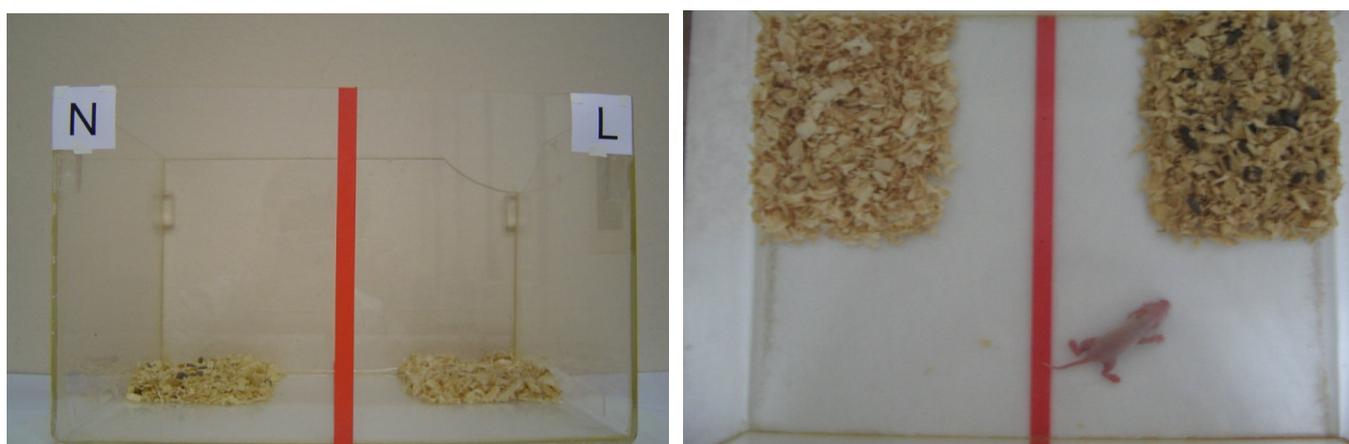


Figura 10 - Caixa utilizada para a realização do teste de preferência pelo odor do ninho e desenho esquemático do procedimento experimental.

4.7.3 Castração das fêmeas

Este procedimento teve como objetivo utilizar ratas ovariectomizadas e com reposição hormonal, com intuito de mimetizar a noite do proestro (período de receptividade da fêmea ao macho). Para a realização da castração, foram utilizadas ratas adultas. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 5-10 mg/kg de xilasina (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brasil) e 75-95 mg/kg de quetamina (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brasil). A ovariectomia foi realizada

através de incisões bilaterais com cerca da 1cm de cada lado, na altura dos flancos. Após a abertura da pele e da parede muscular, o ovário foi retirado e feita uma ligadura nas porções uterinas expostas. A parede muscular foi suturada, assim como a pele. Após a cirurgia, as ratas foram colocadas em caixas-residência e utilizadas no mínimo duas semanas depois.

4.7.4 Reposição hormonal de fêmeas

Este procedimento mimetiza a noite do proestro. Após o período de recuperação da ovariectomia, as ratas foram induzidas à receptividade sexual com injeções subcutâneas de estradiol e progesterona. A primeira injeção foi de benzoato de estradiol (benzo-ginoestril ap® 5mg - SARSA, RJ) na dose de 20 µg/rata e 48 horas depois foi feita uma injeção de progesterona (Sigma) na dose de 2,5 mg/rata mais benzoato de estradiol na dose de 20 µg/rata, seis horas antes da utilização da rata.

4.7.5 Castração dos machos

Ratos adultos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 5-10 mg/Kg de xilasina (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brasil) e 75-95 mg/Kg de quetamina (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brasil). A orquiectomia foi realizada 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 e a pele suturada. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas coletivas e só foram utilizados no mínimo duas semanas depois.

4.7.6 Teste de preferência sexual

Protocolo experimental

O teste de preferência sexual é utilizado para avaliar a motivação sexual, sendo muito dependente da percepção de odores. Este teste permite que o rato adulto possa escolher entre um animal que esteja receptivo e outro que não esteja.

- Teste de preferência sexual em machos adultos: este teste mediu o tempo que o macho despende em torno da área em que a fêmea ativa se encontra. Para isto, foi utilizada uma arena de acrílico 90x60x40 cm transparente dividida em três partes, sendo que a região central possui comunicação com as laterais (Figura 11). Essas são divididas por duas tampas de acrílico contendo furos para que os animais não tenham contato físico, mas possam sentir os odores. Em um dos lados foi colocada uma fêmea não receptiva (castrada) e no outro uma fêmea ativa (castrada e repostada com estradiol e progesterona). O macho testado foi colocado na região central, tendo um período de 15 minutos de adaptação. Após esse tempo as fêmeas foram colocadas nas laterais e o macho na região central, e as caixas foram filmadas por 15 minutos. Os parâmetros analisados foram o tempo em que o macho despende cheirando cada área lateral.

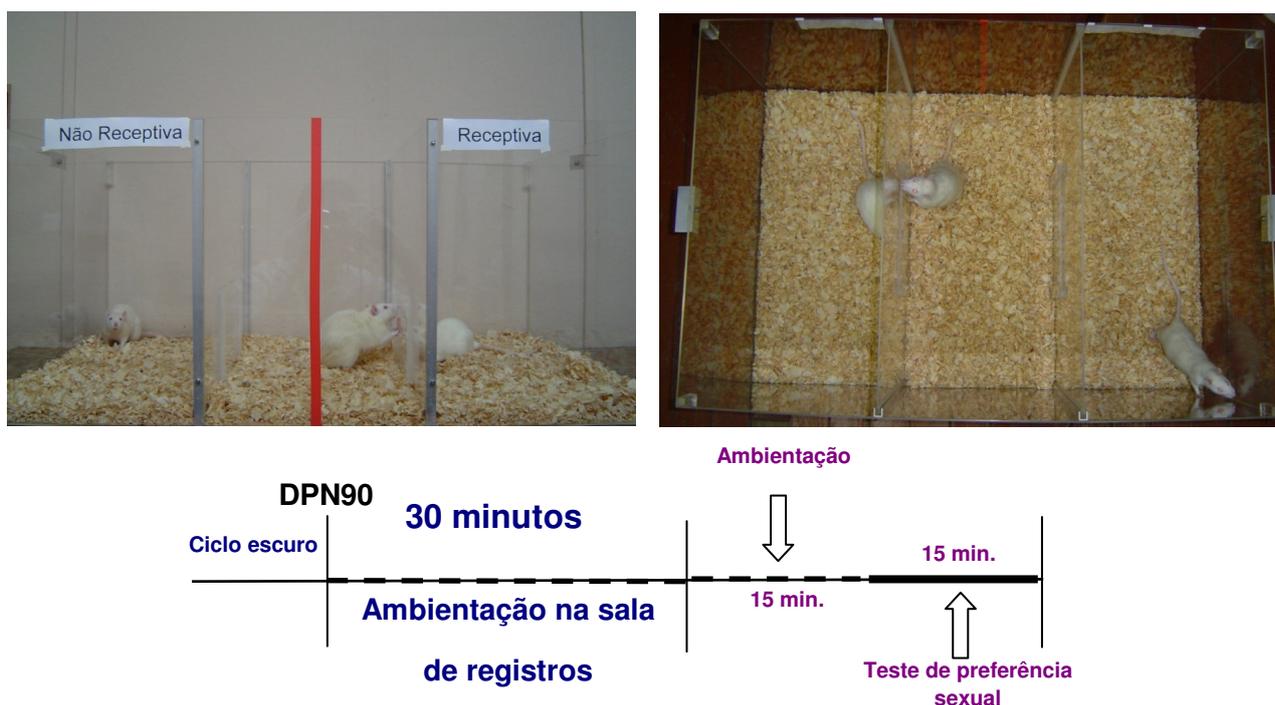


Figura 11 - Caixa utilizada para a realização do teste de preferência sexual e desenho esquemático do procedimento experimental.

- Teste de preferência sexual em fêmeas adultas: as fêmeas foram estudadas na fase de proestro. Este teste mede o tempo que a fêmea despende em torno da área em que o macho intacto se encontra. Para isto, foi utilizada a mesma caixa do experimento anterior (Figura 11). Em um dos lados foi colocado um macho intacto e no outro, um macho castrado. A fêmea testada na fase do proestro foi colocada na região central, tendo um período de 15 minutos de adaptação. Após esse tempo os machos foram colocados nas laterais e a fêmea colocada na região central. A caixa foi filmada por 15 minutos e os parâmetros analisados foram o tempo em que a fêmea despende cheirando cada área lateral.

4.7.7 Cálculo de tamanho da amostra

Tese de preferência pelo odor do ninho em filhotes

Para a realização dos testes de preferência pelo odor do ninho em filhotes o n amostral foi calculado para a variável latência de chegada na área do ninho, com base em estudos realizados anteriormente pelo nosso laboratório (Raineiki *et al.*, 2009). Foi considerado um poder de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$. O número de animais calculado foi de 15 por grupo.

Teste de preferência sexual

Para a realização dos testes de preferência sexual o n amostral foi calculado para a variável duração do tempo de cheirar, com base em estudos realizados anteriormente pelo nosso laboratório (Raineiki *et al.*, 2009). Foi considerado um poder de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$. O número de animais calculado foi de 14 por grupo.

4.7.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos através de média (\pm EPM). Para a análise dos resultados do teste de preferência pelo odor do ninho e de preferência sexual foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, quando necessário. Os fatores considerados foram grupo (manipulado ou não manipulado) e lado (maravalha limpa ou do ninho, para o teste de preferência pelo odor maternal; área do animal castrado ou ativo, para o teste de preferência sexual). O nível de significância utilizado para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa foi de 5% ($P < 0,05$). O

software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado com ferramenta computacional para a análise estatística do dados.

4.8 SEÇÃO 3 – COMPORTAMENTO MATERNAI

4.8.1 Delineamento experimental

Para a realização dos experimentos descritos neste capítulo, foram utilizadas ratas prenhas, divididas em NM e M. A partir do DPN1 estas ratas foram observadas diariamente para o registro do comportamento materno, que foi realizado até o DPN10 (Figura 12).



Figura 12 – Resumo esquemático do modelo experimental de registro do comportamento materno.

Protocolo experimental

O comportamento materno de cada fêmea lactante foi registrado, em quatro sessões diárias de 72 min de observação, sendo três sessões no ciclo claro (com início às 9h, 12h e 15h) e uma no ciclo escuro (iniciando às 18h). Este procedimento foi realizado durante os 10 primeiros dias pós-parto. A distribuição das sessões foi feita em função de que os comportamentos maternos ocorrem mais frequentemente durante o ciclo claro (Champagne *et al.*, 2003). Em cada sessão, o comportamento

maternal das fêmeas foi registrado através de 25 observações pontuais feitas em intervalos de três minutos (25 observações por sessão x 4 sessões por dia = 100 observações/mãe/dia). Nestas sessões as fêmeas lactantes foram observadas em sequência e o(s) comportamento(s) desenvolvido(s) no instante da observação foi registrado em uma planilha. Com base na descrição encontrada em estudos prévios (Caldji *et al.*, 2000; Champagne *et al.*, 2003) os comportamentos observados foram: mãe fora do ninho; amamentar os filhotes em três posturas diferentes: 1) posicionada sobre eles com o dorso muito arqueado (Figura 13a), 2) posicionada sobre eles com o dorso pouco arqueado (Figura 13b), ou apresentando uma postura passiva onde fica deitada de lado (Figura 13c) ou de costas enquanto os filhotes mamam; lambe os filhotes (superfície do corpo ou região anogenital) (Figura 13d); construir ninho; filhotes fora do ninho; recolher os filhotes para o ninho.

Para os comportamentos descritos acima, o parâmetro utilizado na análise estatística foi a frequência de cada comportamento. Ao final dos registros, foram somadas as frequências das três posturas de amamentação para compor a frequência do comportamento chamado de amamentar.

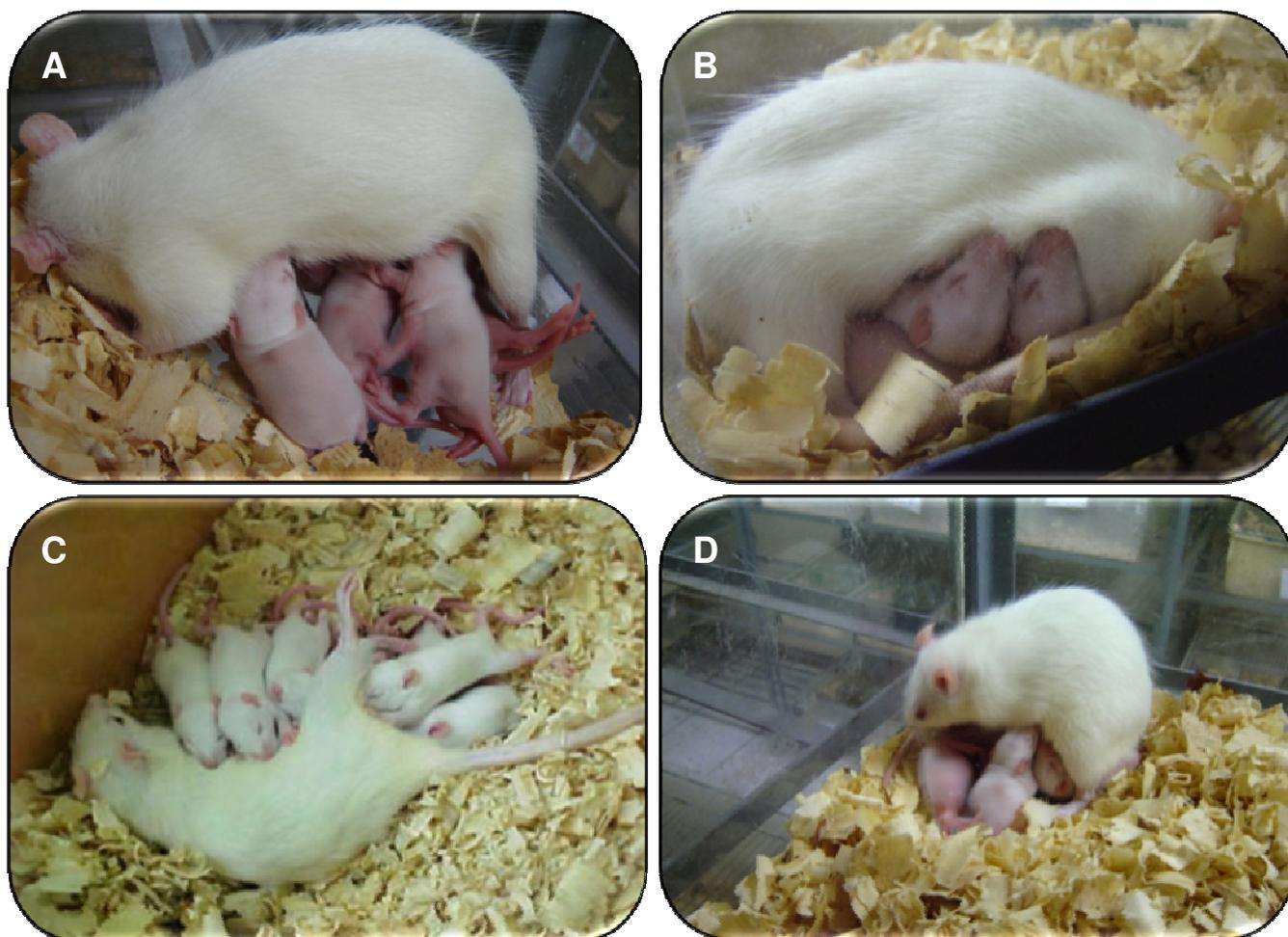


Figura 13 - Principais comportamentos maternos analisados: a) postura de amamentação com dorso bem arqueado; b) postura de amamentação com dorso pouco arqueado; c) postura de amamentação passiva (supino); d) comportamento de lambe os filhotes.

4.8.2 Cálculo de tamanho da amostra

Para a realização das análises do comportamento materno o n amostral foi calculado para a variável frequência de lambe, com base em estudos realizados anteriormente pelo grupo (De Azevedo *et al.*, 2010). Foi considerado um poder de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$. O número de animais calculado foi de 14 por grupo.

4.8.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos através de média (\pm EPM). Para a análise dos resultados do registro do comportamento maternal foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, quando necessário. Os fatores considerados foram grupo (manipulado ou não manipulado) e dia pós-parto. O nível de significância utilizado para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa foi de 5% ($P < 0,05$). O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado com ferramenta computacional para a análise estatística dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 SEÇÃO 1 - SISTEMA OLFATÓRIO

5.1.1 Densidade numérica de células mitrais na camada mitral do bulbo olfatório em machos

A figura 14 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células mitrais da camada mitral do bulbo olfatório de ratos machos aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,007$ $P=0,93$]. Porém, observou-se um efeito da manipulação [$F_{(1,20)}=37,48$ $P<0,0001$], onde a densidade numérica de células mitrais, da camada mitral do bulbo olfatório dos ratos manipulados foi significativamente menor do que nos não manipulados. Também houve um efeito idade [$F_{(1,20)}=12,07$ $P=0,002$] onde o grupo não manipulado apresentou uma maior densidade numérica aos 11 dias de idade.

A figura 15 mostra uma fotomicrografia da camada mitral em um aumento de 100x mostrando as alterações morfológicas da manipulação neonatal (A) em relação ao grupo não manipulado (B). Este procedimento além de causar uma redução na densidade numérica de células mitrais da camada mitral, causou também uma desestruturação organizacional desta camada.

CÉLULAS MITRAIS NA CAMADA MITRAL EM RATOS MACHOS

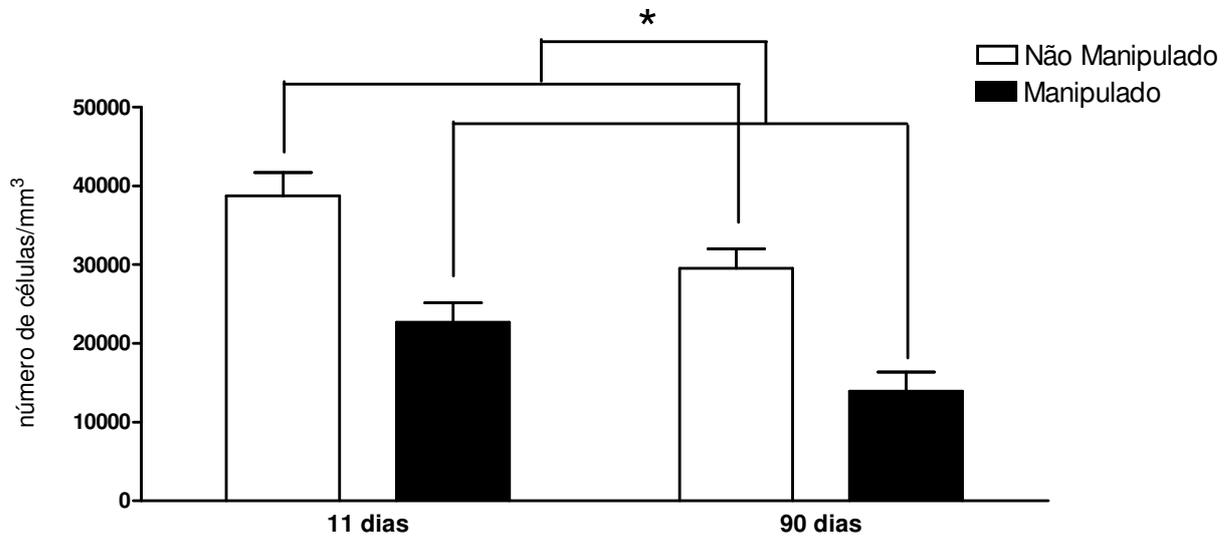


Figura 14 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm³) de células mitrais dentro da camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

* representa diferença quanto ao efeito principal manipulação.

Obs.: para simplificação do gráfico, não foi colocado a representação gráfica do efeito principal idade.

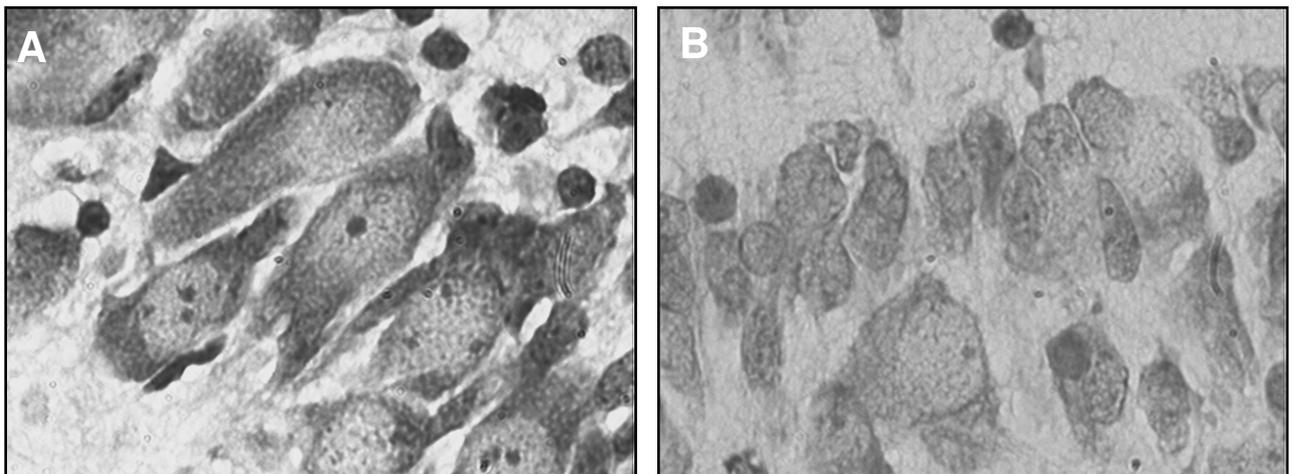


Figura 15 - Fotomicrografia da camada mitral em um aumento de 100x mostrando a organização das células mitrais no grupo não manipulado (A) e no grupo manipulado (B). Coloração feita em cresil violeta.

5.1.2 Densidade numérica de células na camada glomerular do bulbo olfatório em machos

A figura 16 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células da camada glomerular do bulbo olfatório de machos aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,68$ $P=0,42$]. Porém, observou-se um efeito da manipulação [$F_{(1,20)}=12,11$ $P=0,0024$] onde a densidade numérica de células da camada glomerular do bulbo olfatório de ratos manipulados aos 11 dias é significativamente menor do que nos não manipulados. Também houve um efeito idade [$F_{(1,20)}=6,09$ $P=0,0227$] onde houve uma redução aos 11 dias.

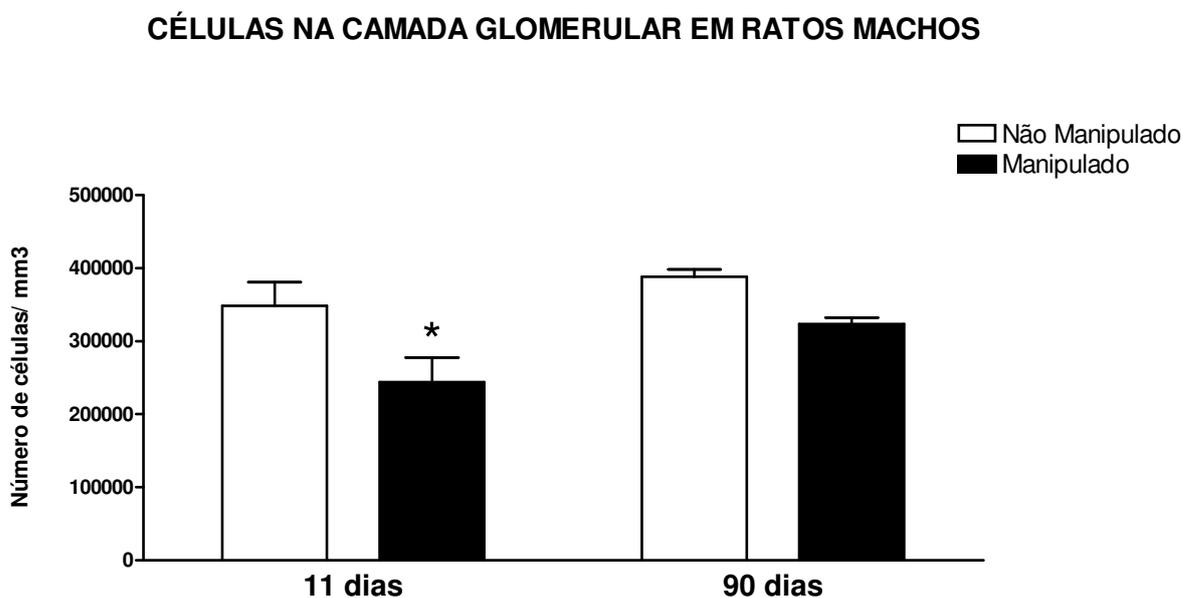


Figura 16 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada glomerular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* quando comparado aos demais grupos

5.1.3 Densidade numérica de células totais na camada mitral do bulbo olfatório em machos

A figura 17 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células totais na camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=1,92$ $P=0,18$]. Os resultados também mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=0,42$ $P=0,52$] e nem diferença entre as duas idades [$F_{(1,20)}=0,009$ $P=0,92$].

CÉLULAS TOTAIS NA CAMADA MITRAL EM RATOS MACHOS

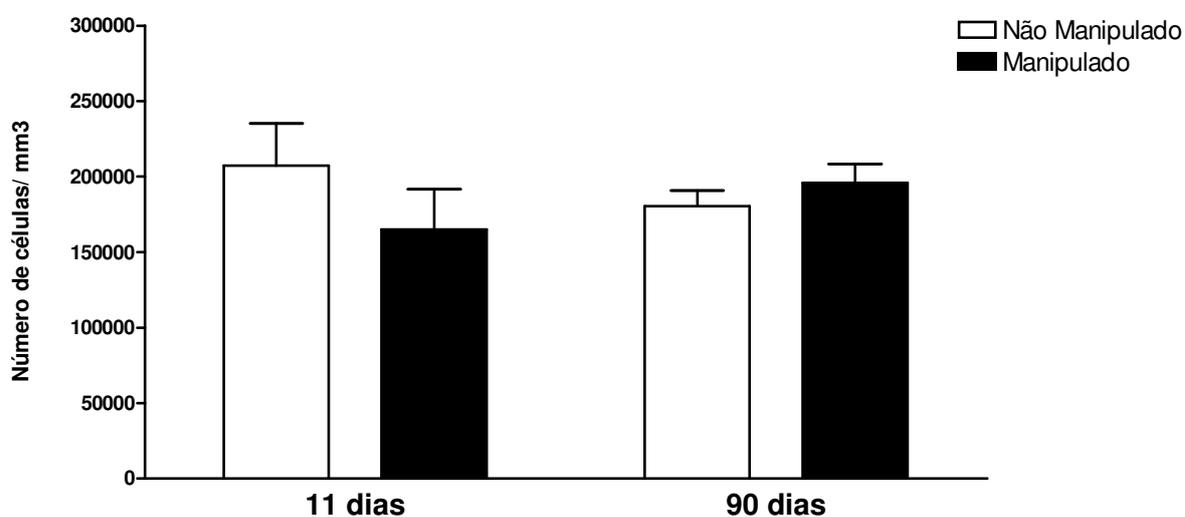


Figura 17 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

5.1.4 Densidade numérica de células na camada granular do bulbo olfatório em machos

A figura 18 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada granular do bulbo olfatório dos ratos machos aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,003$ $P=0,956$]. Porém, observou-se um efeito da manipulação [$F_{(1,20)}=5,99$ $P=0,0345$] onde a densidade numérica de células da camada granular do bulbo olfatório de ratos manipulados é significativamente menor que nos não manipulados. Também houve um efeito idade [$F_{(1,20)}=13,05$ $P=0,0047$].

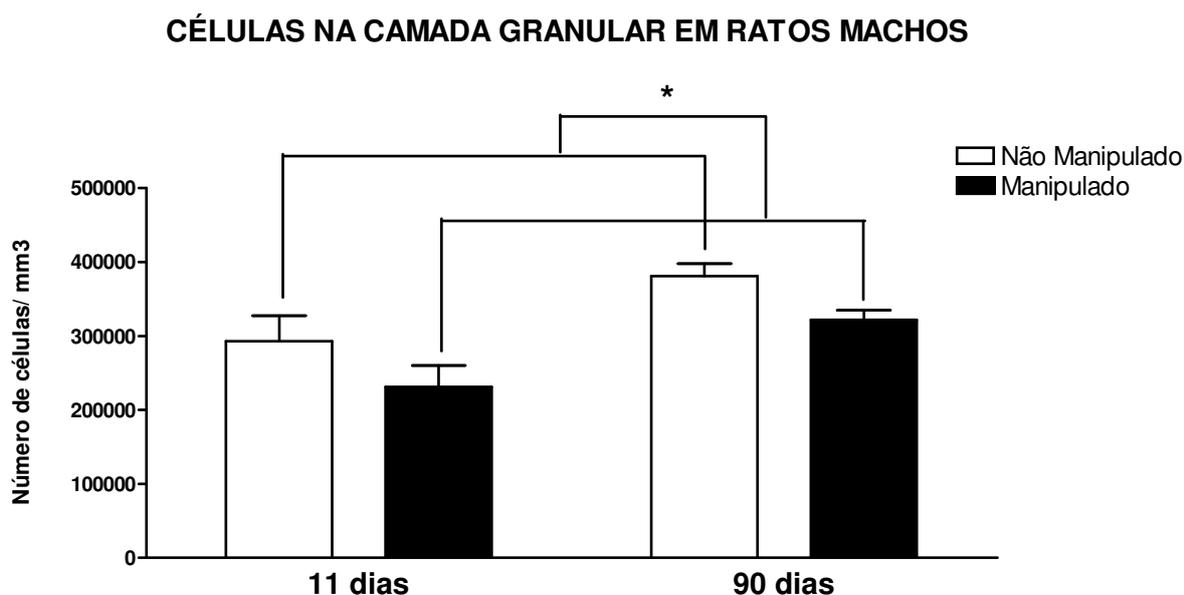


Figura 18 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de neurônios por mm^3) de neurônios na camada granular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

*diferença quanto ao efeito principal manipulação

Obs.: para simplificação do gráfico, não foi colocada à representação gráfica do efeito principal idade.

5.1.5 Densidade numérica de células mitrais na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 19 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células mitrais, da camada mitral do bulbo olfatório das fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=9,28$ $P=0,0064$]. Observou-se um efeito da manipulação [$F_{(1,20)}=6,85$ $P=0,0165$] entretanto não houve efeito idade [$F_{(1,20)}=2,52$ $P=0,1281$]. A densidade numérica de células mitrais na camada mitral apresenta uma redução significativa em fêmeas manipuladas aos 90 dias de idade, quando comparadas ao grupo não manipulado. Além disso, houve um aumento significativo na densidade numérica de células mitrais na camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 90 dias de idade no grupo não manipulado quando comparado aos 11 dias de idade.

CÉLULAS MITRAIS NA CAMADA MITRAL EM RATAS FÊMEAS

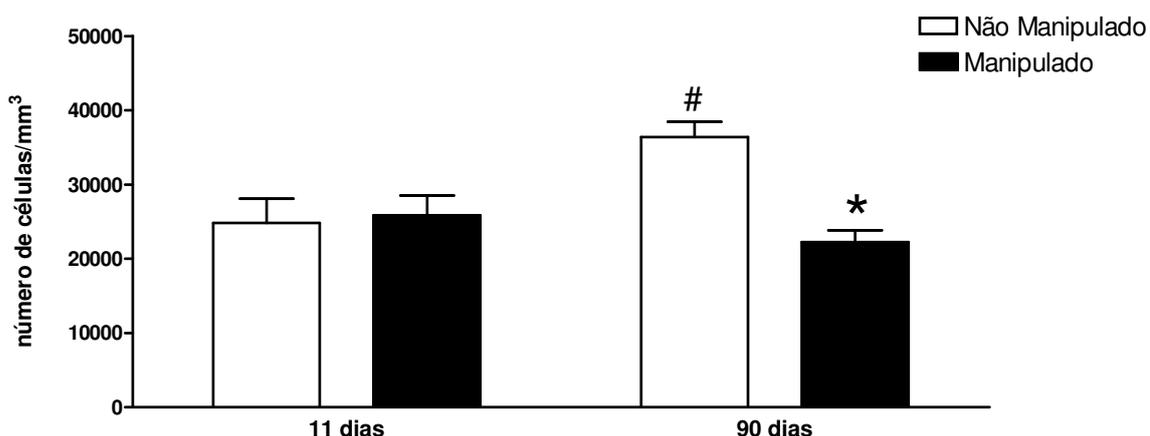


Figura 19 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células mitrais dentro da camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* quando comparado ao grupo não manipulado aos 90 dias
quando comparado ao grupo não manipulado aos 11 dias

5.1.6 Densidade numérica de células na camada glomerular do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 20 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,94$ $P=0,34$]. Entretanto houve um efeito da manipulação [$F_{(1,20)}=6,75$ $P=0,0172$] e também um efeito idade [$F_{(1,20)}=14,27$ $P=0,0012$]. Os resultados mostraram que fêmeas não manipuladas apresentam um aumento significativo na densidade numérica de células, aos 90 dias de idade, quando comparados ao grupo manipulado.

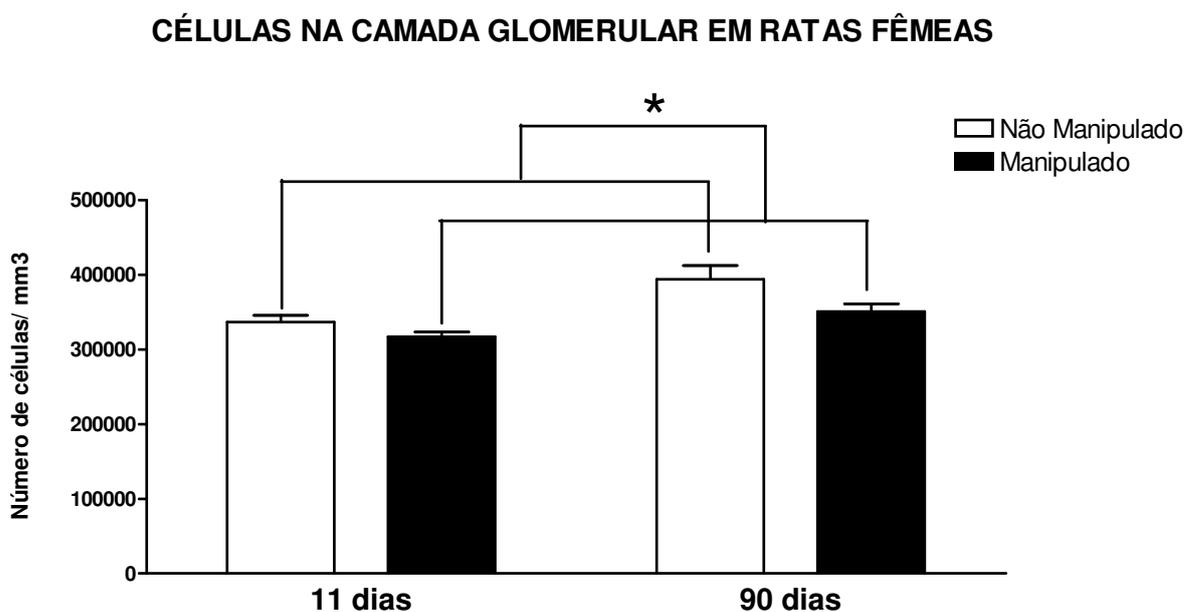


Figura 20 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* diferença quanto ao efeito principal manipulação

Obs.: para simplificação do gráfico, não foi colocada a representação gráfica do efeito principal idade.

5.1.7 Densidade numérica de células totais na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 21 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células totais na camada mitral do bulbo olfatório das fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,03$ $P=0,87$]. Os resultados também mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=0,42$ $P=0,52$] entretanto houve diferença entre as duas idades [$F_{(1,20)}=5,28$ $P=0,0324$].

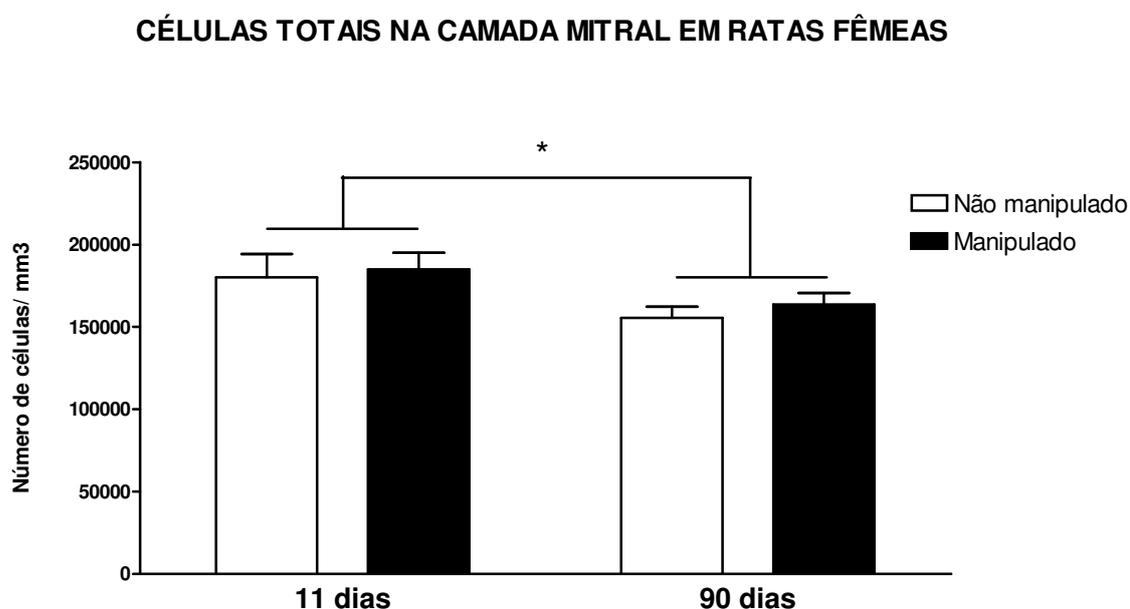


Figura 21 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

5.1.8 Densidade numérica de células na camada granular do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 22 mostra a densidade numérica (número de células por mm^3) de células na camada granular do bulbo olfatório das fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=0,84$ $P=0,37$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=1,92$ $P=0,18$], entretanto houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=17,03$ $P=0,0005$]. A densidade numérica de células na camada granular é maior aos 90 dias de idade em ambos os grupos.

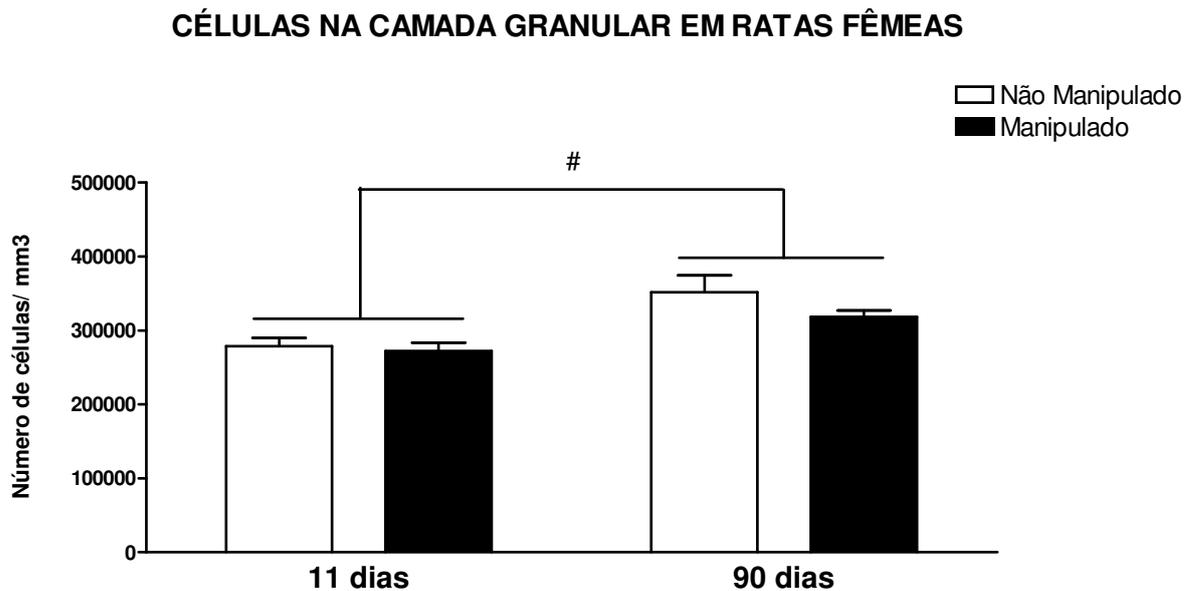


Figura 22 - Efeito da manipulação neonatal sobre a densidade numérica (número de células por mm^3) na camada granular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa por médias (\pm EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$. # diferença quanto ao efeito principal idade

5.1.9 Número de neurônios NeuN-positivos na camada glomerular do bulbo olfatório em machos

A figura 23 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada glomerular do bulbo olfatório de machos. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=2,26$ $P=0,15$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=0,36$ $P=0,57$] e também não houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=0,20$ $P=0,65$].

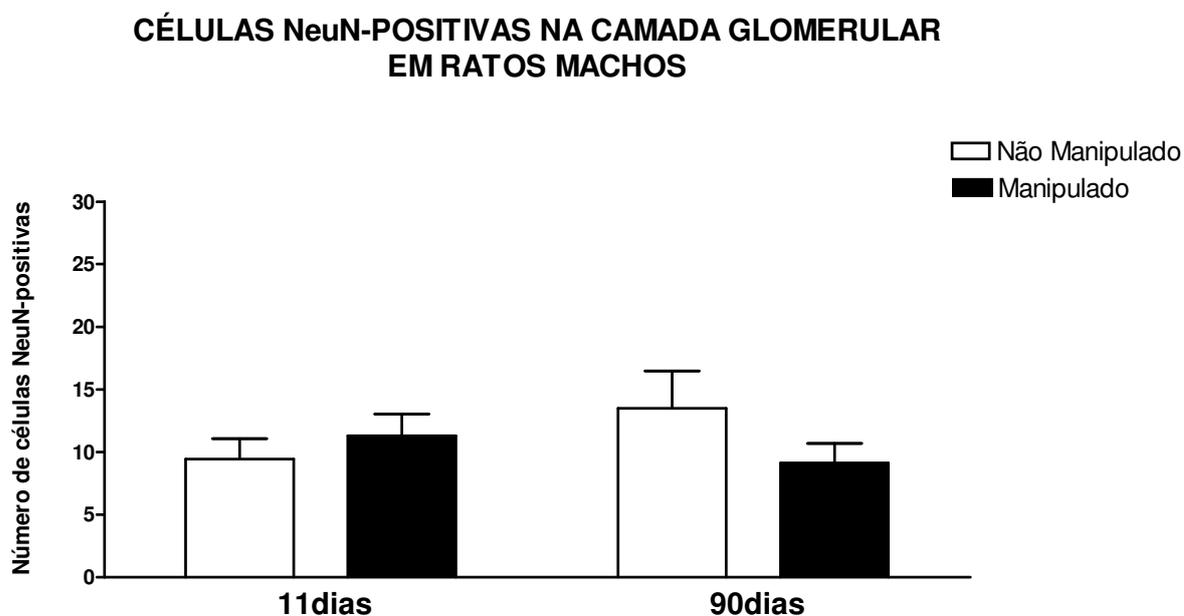


Figura 23 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada glomerular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

5.1.10 Número de neurônios NeuN-positivos na camada mitral do bulbo olfatório em machos

A figura 24 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada mitral do bulbo olfatório de machos. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=1,82$ $P=0,19$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,20)}=0,15$ $P=0,69$] e também não houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=2,15$ $P=0,16$].

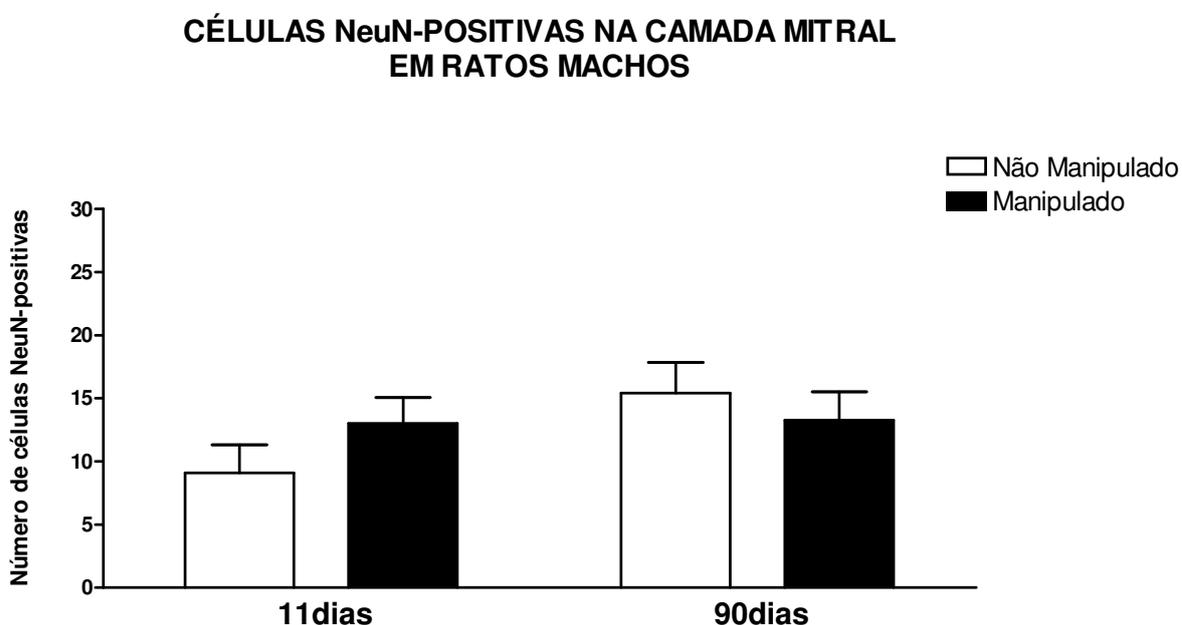


Figura 24 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada mitral do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

5.1.11 Número de neurônios NeuN-positivos na camada granular do bulbo olfatório em machos

A figura 25 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada granular do bulbo olfatório de machos. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=1,35$ $P=0,26$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,20)}=0,006$ $P=0,94$]. Entretanto houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=16,5$ $P=0,0006$] onde houve um aumento no número de neurônios NeuN-positivos aos 90 dias.

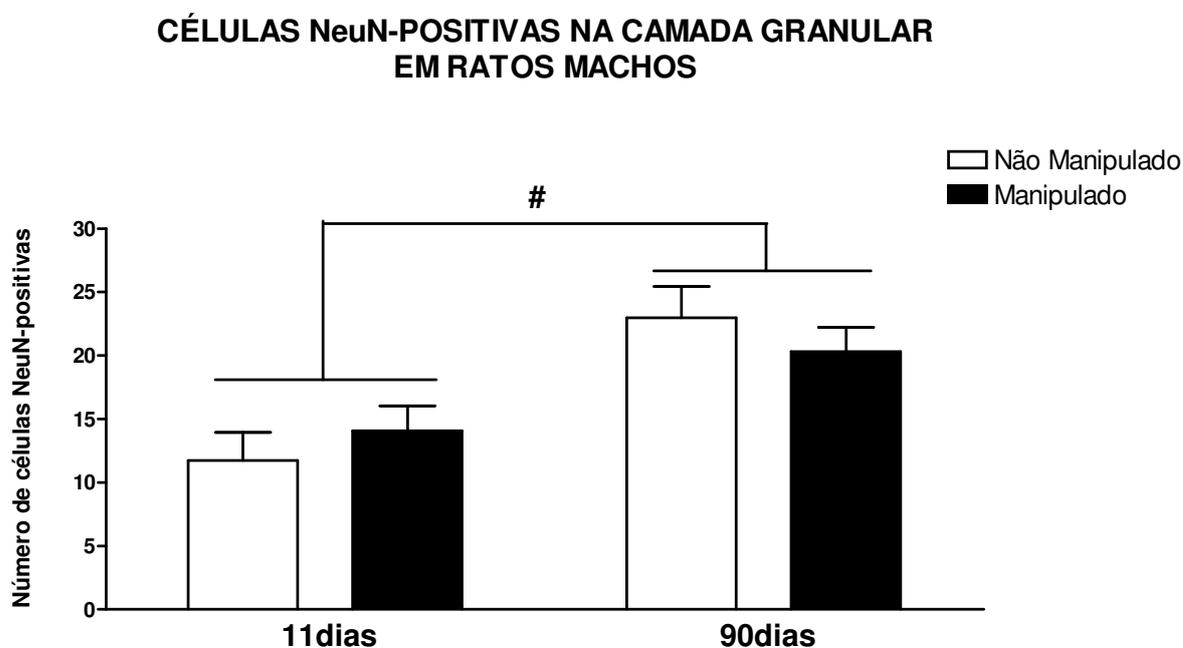


Figura 25 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada granular do bulbo olfatório de machos aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

diferença quanto ao efeito principal idade

5.1.12 Número de neurônios NeuN-positivos na camada glomerular do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 26 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas. A ANOVA de duas vias apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=9,32$ $P=0,0063$] onde o grupo manipulado apresenta uma redução no número de células NeuN-positivas em relação ao não manipulado aos 90 dias de idade. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,20)}=0,27$ $P=0,61$] e também não houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=1,25$ $P=0,28$].

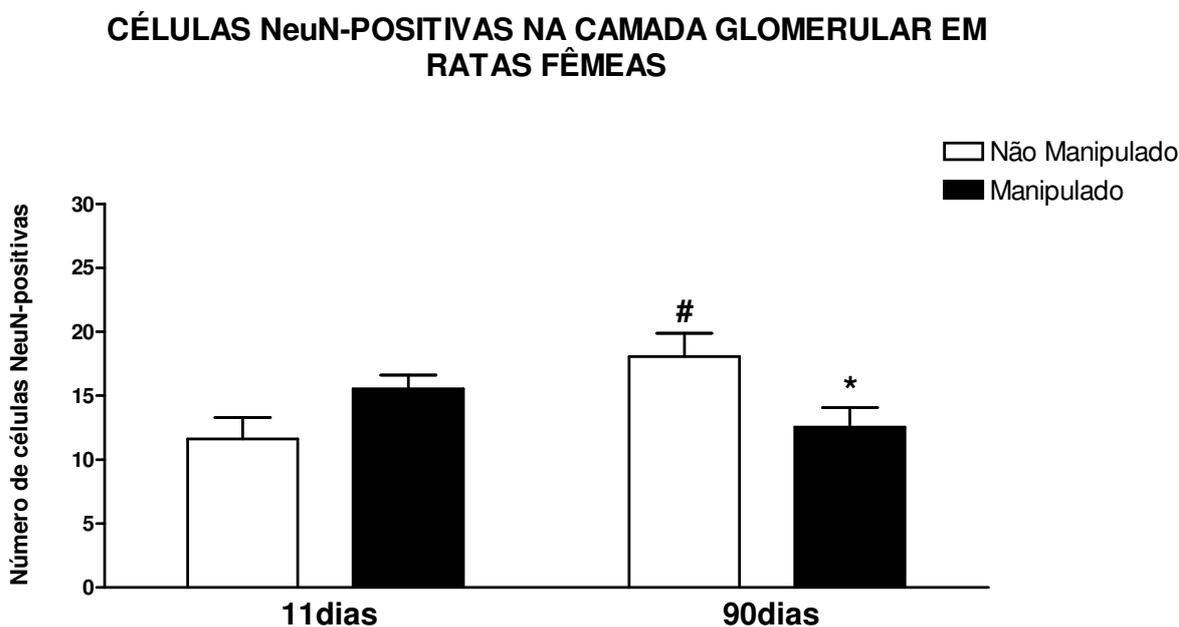


Figura 26 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número neurônios NeuN-positivos (média ± EPM) na camada glomerular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* quando comparado ao grupo não manipulado aos 90 dias

quando comparado ao grupo não manipulado aos 11 dias

5.1.13 Número de neurônios NeuN-positivos na camada mitral do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 27 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas. A ANOVA de duas vias apresentou interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=7,68$ $P=0,0118$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=0,14$ $P=0,70$] e também não houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=0,72$ $P=0,40$]. A quantidade de células NeuN-positivas é menor nos ratos manipulados aos 90 dias de idade quando comparado aos 11 dias.

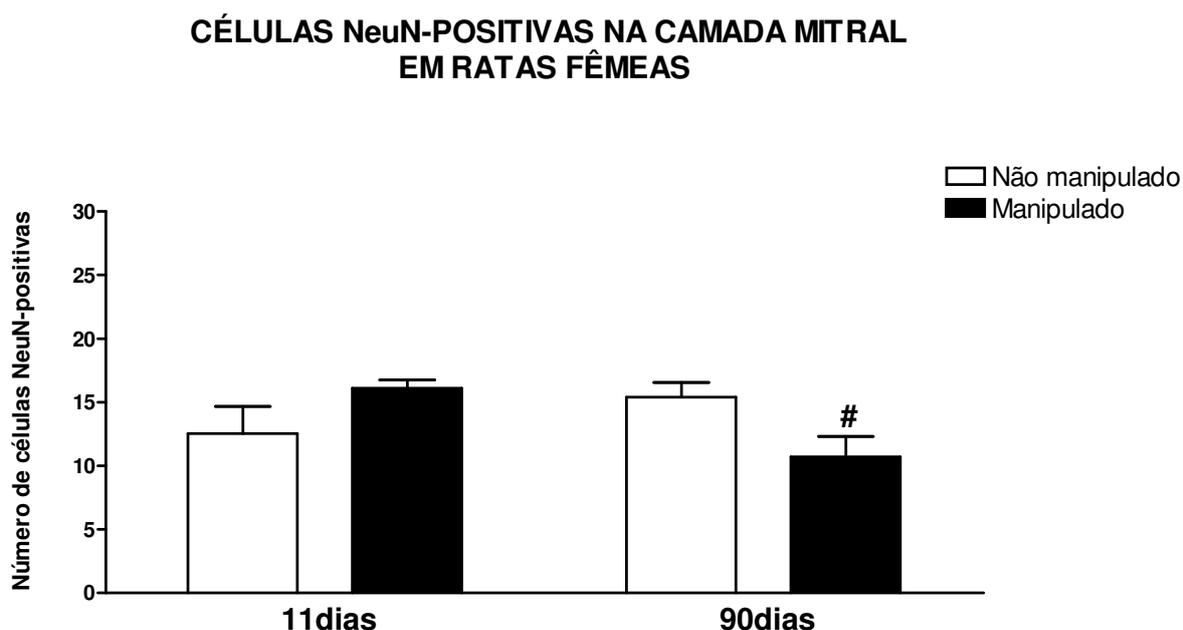


Figura 27 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média \pm EPM) na camada mitral do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

quando comparado ao grupo manipulado aos 11 dias

5.1.14 Número de neurônios NeuN-positivos na camada granular do bulbo olfatório em fêmeas

A figura 28 mostra a quantidade de neurônios NeuN-positivos da camada granular do bulbo olfatório de fêmeas. A ANOVA de duas vias apresentou efeito na interação manipulação X idade [$F_{(1,20)}=12,56$ $P=0,0020$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,20)}=3,16$ $P=0,09$] entretanto houve diferença em relação ao efeito idade [$F_{(1,20)}=13,35$ $P=0,0016$]. A quantidade de células NeuN-positivas é maior nos ratos não manipulados aos 90 dias de idade quando comparado aos 11 dias.

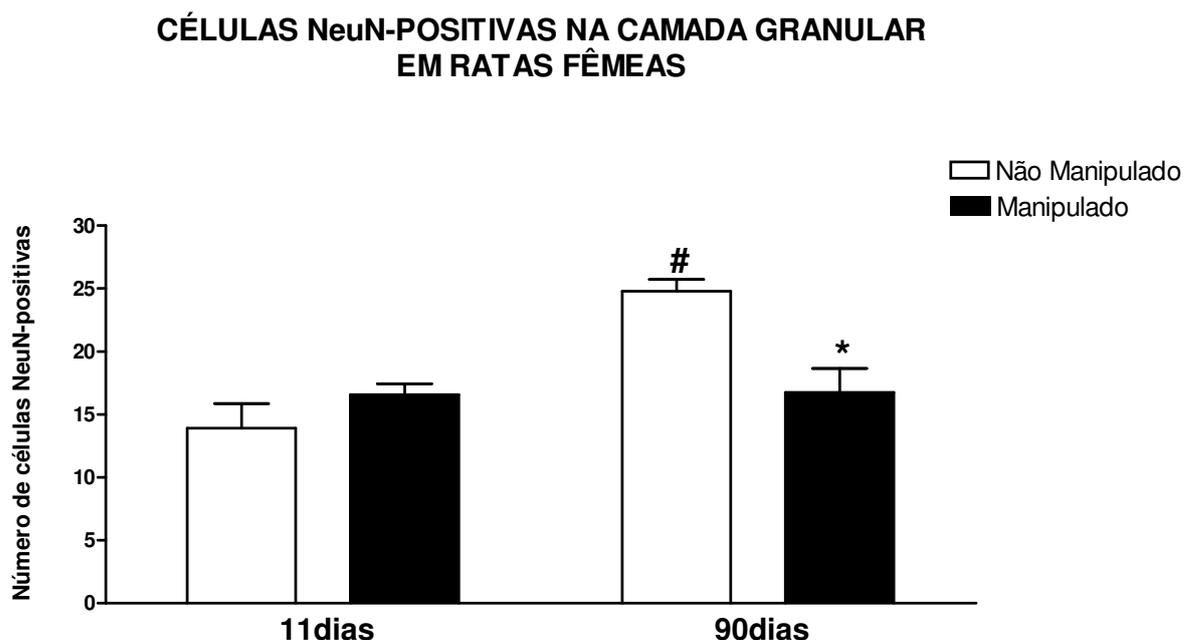


Figura 28 - Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios NeuN-positivos (média ± EPM) na camada granular do bulbo olfatório de fêmeas aos 11 e aos 90 dias de idade. Foram utilizados 6 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* quando comparado ao grupo não manipulado aos 90 dias

quando comparado aos demais grupos

5.2 SEÇÃO 2 - PREFERÊNCIA PELO ODOR DO NINHO E PREFERÊNCIA SEXUAL

5.2.1 Preferência pelo odor do ninho (odor familiar) em filhotes (machos e fêmeas)

A figura 29 mostra a preferência pelo odor do ninho em ratos machos aos 11 dias. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X lado [$F_{(1,70)}=0,32$ $P=0,57$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,70)}=0,37$ $P=0,54$] entretanto houve diferença em relação ao efeito lado [$F_{(1,70)}=75,73$ $P<0,0001$] onde os machos, tanto manipulados, quanto não manipulados apresentam preferência pelo odor do ninho, permanecendo mais tempo na área da maravalha do ninho.

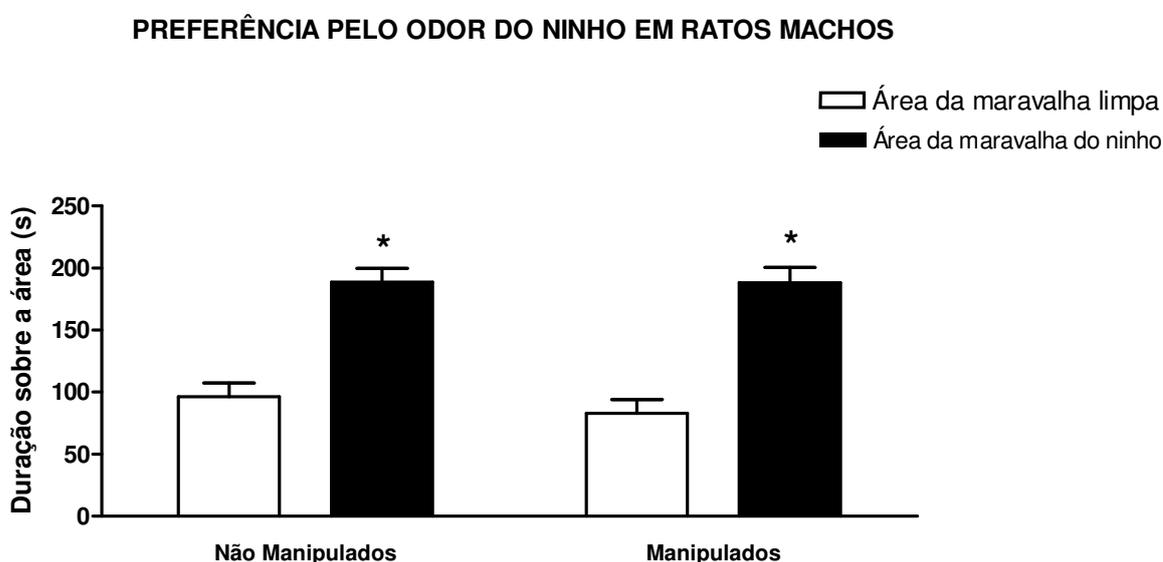


Figura 29 - Preferência pelo odor do ninho em machos aos 11 dias de idade. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 18 animais no grupo não manipulado e 19 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$. * diferença em relação à área da maravalha limpa.

A figura 30 mostra preferência pelo odor do ninho em ratas fêmeas aos 11 dias. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X lado [$F_{(1,70)}=0,68$ $P=0,41$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,70)}=0,92$ $P=0,34$] entretanto houve diferença em relação ao efeito lado [$F_{(1,70)}=27,58$ $P<0,0001$] onde as fêmeas, tanto manipuladas, quanto não manipuladas apresentam preferência pelo odor do ninho, permanecendo mais tempo na área da maravalha do ninho.

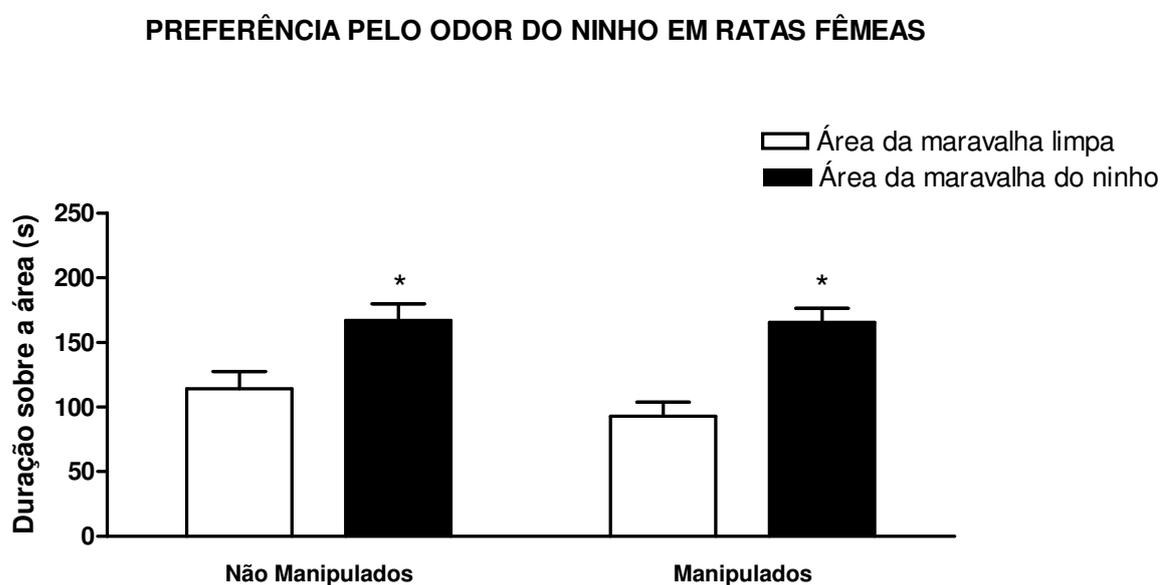


Figura 30 - Preferência pelo odor do ninho em fêmeas aos 11 dias de idade. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 18 animais no grupo não manipulado e 19 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$. * diferença em relação à área da maravalha limpa.

5.2.2 Teste de preferência sexual

A figura 31 mostra preferência sexual em ratos machos aos 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X lado [$F_{(1,60)} = 0,89$ $P=0,35$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,60)} = 0,00$ $P=0,99$] entretanto houve diferença em relação ao efeito lado [$F_{(1,60)} = 7,14$ $P=0,0097$]. Os machos não manipulados permanecem mais tempo na área do animal ativo, entretanto os manipulados não apresentam esta preferência.

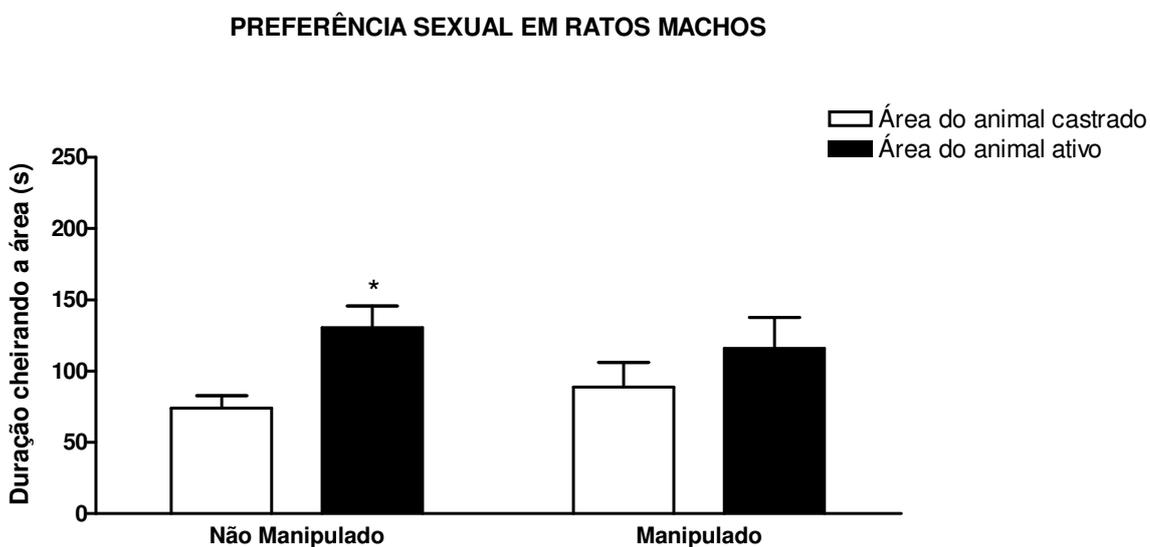


Figura 31 - Preferência sexual de machos adultos. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 19 animais no grupo não manipulado e 13 no manipulado. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

* diferença em relação à área do animal castrado no mesmo grupo.

A figura 32 mostra preferência sexual em ratas fêmeas aos 90 dias de idade. A ANOVA de duas vias não apresentou interação manipulação X lado [$F_{(1,40)}= 0,02$ $P=0,88$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,40)}= 0,71$ $P=0,40$] entretanto houve diferença em relação ao efeito lado [$F_{(1,40)}= 37,35$ $P<0,0001$]. Os machos não manipulados permanecem mais tempo na área do animal ativo, entretanto os manipulados permaneceram o mesmo tempo nas duas áreas.

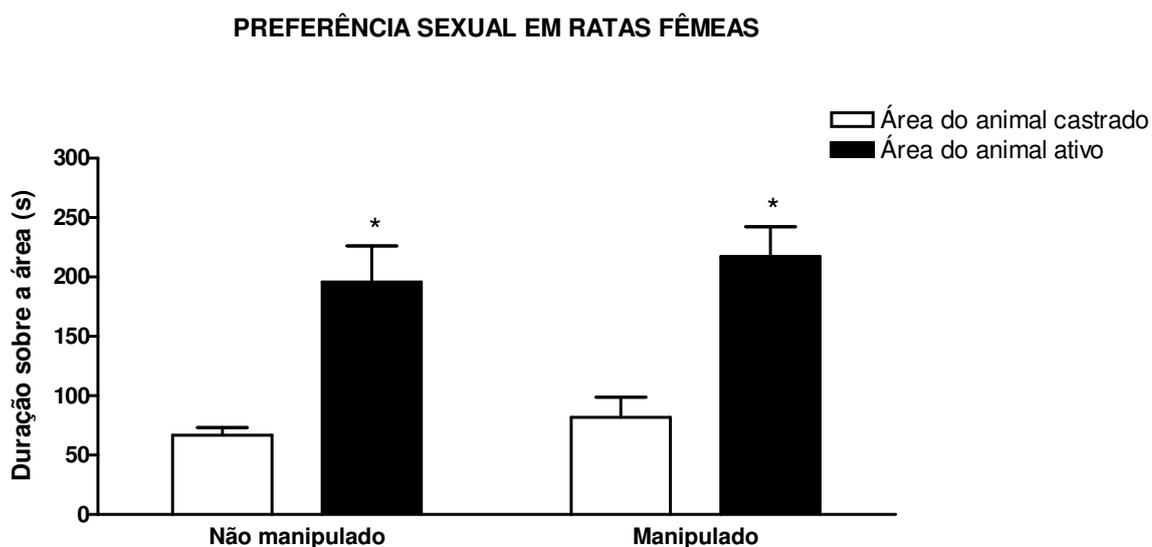


Figura 32 - Preferência sexual de fêmeas adultas na noite do proestro. Os dados são expressos pela média \pm EPM. Foram utilizados 11 animais para cada grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

* diferença em relação à área do animal castrado no mesmo grupo.

5.3 SEÇÃO 3 - COMPORTAMENTO MATERNAL

5.3.1 Registro do comportamento maternal

A figura 33 representa a frequência do comportamento de amamentação total ao longo dos 10 primeiros dias pós-parto em ratas cujos filhotes foram submetidos à manipulação neonatal. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(9,162)}=1,84$ $P=0,06$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,18)}=0,16$ $P=0,69$] entretanto houve diferença em relação ao efeito dia [$F_{(9,162)}=1,94$ $P=0,0488$].

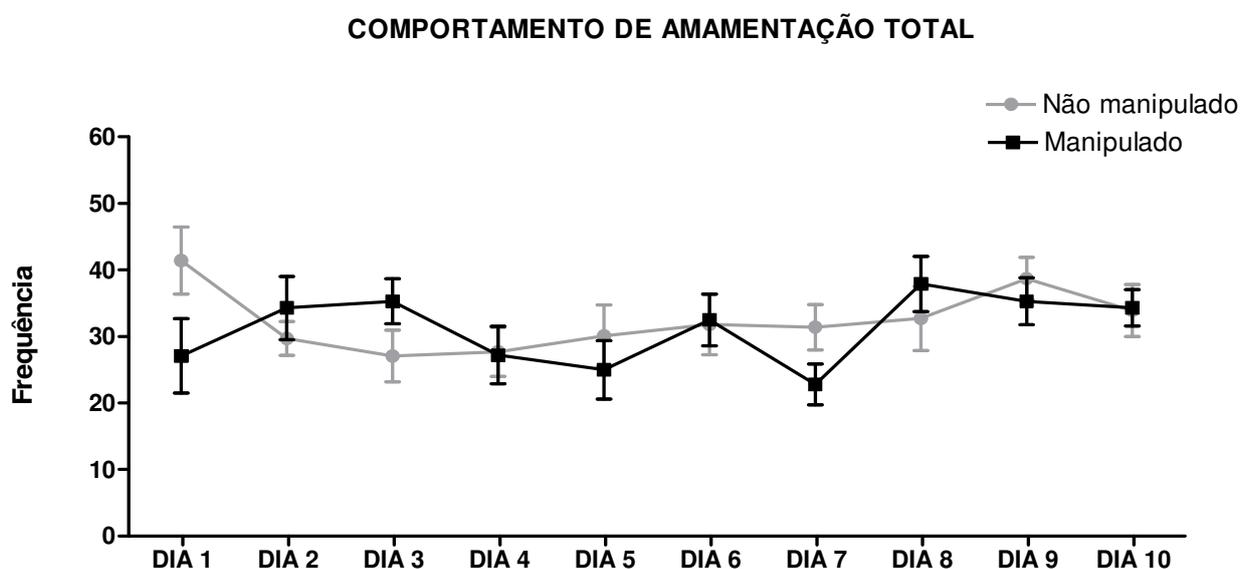


Figura 33 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de amamentação (soma dos comportamentos de amamentação com dorso bem arqueado, pouco arqueado e amamentação passiva) de ratas cujos filhotes sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada em quatro seções diárias com 72 min cada, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

A figura 34 representa a frequência do comportamento total de lambeo ao longo dos 10 primeiros dias pós-parto em ratas, cujos filhotes foram submetidos à manipulação neonatal. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(9,162)}=0,95$ $P=0,48$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,18)}=0,05$ $P=0,82$] entretanto houve diferença em relação ao efeito dia [$F_{(9,162)}=2,49$ $P=0,0108$].

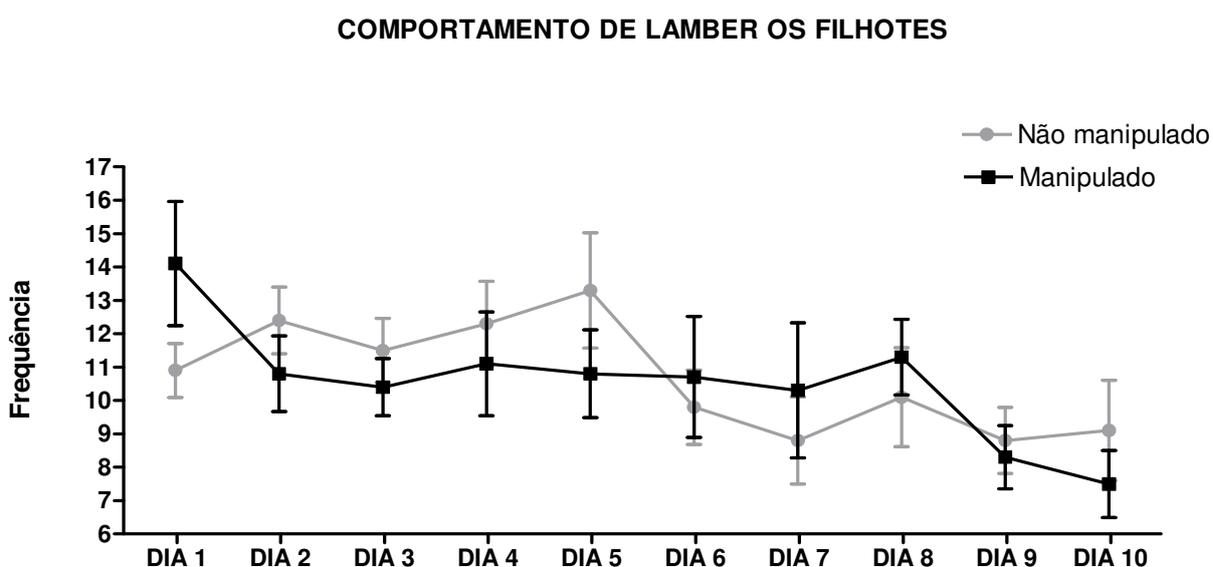


Figura 34 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de lambeo os filhotes de ratas onde as ninhadas sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada em quatro seções diárias com 72 min cada, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

A figura 35 representa a frequência do comportamento de amamentação total, do registro realizado logo após o procedimento de manipulação ao longo dos 10 primeiros dias pós-parto em ratas, cujos filhotes foram submetidos ao protocolo experimental. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(9,162)}=1,16$ $P=0,32$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos manipulado X não manipulado [$F_{(1,18)}=0,16$ $P=0,69$] entretanto houve diferença em relação ao efeito dia [$F_{(1,162)}=2,68$ $P=0,0062$].

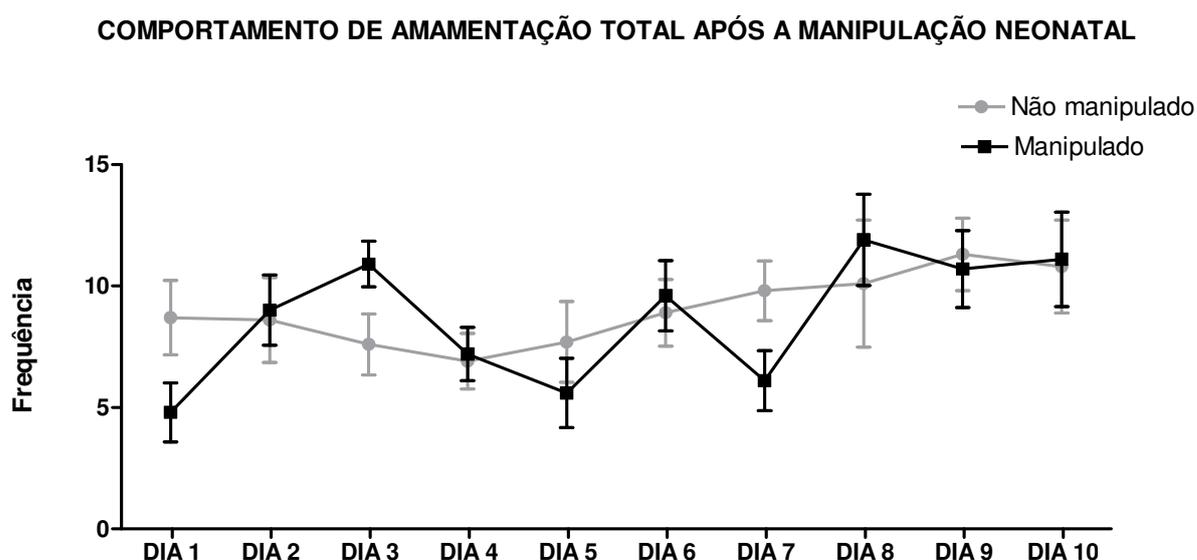


Figura 35 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de amamentação (soma dos comportamentos de amamentação com dorso bem arqueado, pouco arqueado e amamentação passiva) de ratas cujos filhotes sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada por 72 min logo após o procedimento de manipulação neonatal, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

A figura 36 representa a frequência do comportamento total de lambar, do registro realizado logo após o procedimento de manipulação ao longo dos 10 primeiros dias pós-parto em ratas, cujos filhotes foram submetidos ao protocolo experimental. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não apresentou interação manipulação X idade [$F_{(9,162)}=0,31$ $P=0,96$]. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,18)}=3,61$ $P=0,07$] entretanto houve diferença em relação ao efeito dia [$F_{(1,162)}=1,88$ $P=0,0586$].

COMPORTAMENTO DE LAMBER OS FILHOTES APÓS A MANIPULAÇÃO NEONATAL

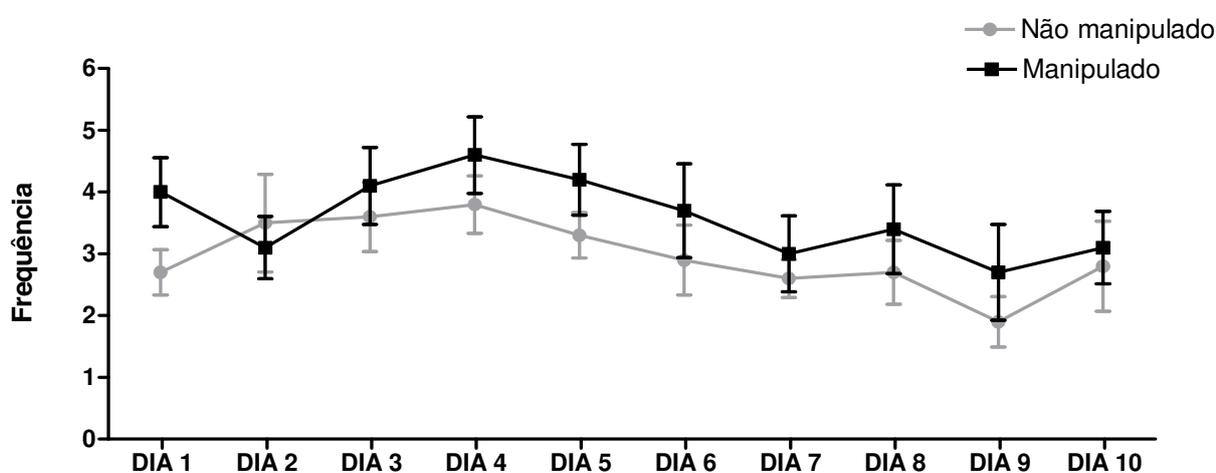


Figura 36 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento total de lambar os filhotes de ratas onde as ninhadas sofreram manipulação neonatal. Cada rata foi analisada por 72 min logo após o procedimento de manipulação neonatal, durante os 10 primeiros dias pós-parto. Foram utilizadas 10 prenhas por grupo. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, utilizando-se dia como medida repetida, seguida do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P<0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese mostraram que o protocolo de manipulação neonatal, alterou a morfologia do BO tanto em machos, quanto em fêmeas. A manipulação neonatal reduziu a densidade numérica de células mitrais em ratos machos aos 11 dias e esta diminuição se manteve na idade adulta. As fêmeas não apresentaram alteração na densidade de células mitrais aos 11 dias, entretanto aos 90 dias houve uma redução no número de células quando comparadas ao grupo não manipulado. Um aspecto interessante observado em relação aos não manipulados é de que os machos apresentam uma redução na densidade numérica de células mitrais na idade adulta, ao contrário do que ocorre nas fêmeas não manipuladas, que apresentam um aumento destas células. Estes resultados sugerem que nas fêmeas não manipuladas possa ter ocorrido proliferação celular. O BO é uma das poucas estruturas do SN de mamíferos em que há neurogênese. As células progenitoras se originam na zona ventricular e subventricular dos ventrículos laterais do telencéfalo e migram para o BO (Carleton *et al.*, 2002). A neurogênese no adulto pode representar uma adaptação em resposta a mudanças impostas pelo ambiente, pelo estado do animal e pelos níveis hormonais (Gheusi e Lledo, 2007).

Nossos resultados também mostram que machos manipulados no período neonatal apresentam uma redução na densidade numérica de células na camada glomerular. Em fêmeas, a manipulação neonatal também alterou a densidade numérica de células nesta camada e quando adultas, estas ratas apresentam uma redução no número de neurônios maduros, demonstrada por uma diminuição no número de neurônios NeuN-positivos. Em relação ao número total de células na

camada mitral, não houve alteração tanto machos quanto em fêmeas nas duas idades. Entretanto, ao analisarmos o número de neurônios NeuN-positivos, podemos verificar que as fêmeas manipuladas apresentam uma redução na vida adulta quando comparadas às não manipuladas e aos 11 dias de idade. Estes resultados demonstram que apesar de não haver alterações no número de células, ocorre uma redução no número de neurônios maduros. A análise de densidade numérica através da técnica do dissector óptico, muitas vezes pode quantificar células gliais junto a neurônios, por isso a importância de fazermos técnicas de imunohistoquímica para quantificação e diferenciação de neurônios maduros. O NeuN é um marcador neuronal específico que tem sido utilizado para identificar células nervosas, o qual é expresso tanto no núcleo, quanto no citoplasma na maioria das células do sistema nervoso de vertebrados (Do Nascimento *et al.*, 2010). O NeuN é uma molécula regulatória, diretamente envolvida na diferenciação neuronal, sendo utilizada em estudos do desenvolvimento do SN (Mullen *et al.*, 1992). O NeuN não marca células nervosas imaturas, ao menos até que cheguem a um estágio de desenvolvimento que se aproxime de uma célula madura quanto a sua função, portanto é um marcador importante de maturação celular (Sarnat *et al.*, 1998).

Na camada granular, onde encontramos interneurônios responsáveis pela regulação das células mitrais houve um efeito da manipulação neonatal em ratos machos em ambas as idades. As fêmeas não apresentaram diferença na densidade numérica de células, entretanto houve alteração no número de neurônios NeuN-positivos. Quando adultas as fêmeas manipuladas permanecem com o mesmo número de células que no período neonatal, em compensação os animais não manipulados apresentaram um aumento no número de neurônios na vida adulta, o que indica uma provável neurogênese nestes animais.

Nossos resultados estão de acordo com diversos estudos (Lucion *et al.*, 2003; Camozzato *et al.*, 2009) que mostram que o procedimento de manipulação neonatal causa alterações no número de células no SNC. Winkelmann-Duarte e colaboradores (2007) mostraram que a manipulação neonatal reduz o número de células no núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo supraóptico em fêmeas aos 11 dias de idade e na vida adulta. A área préóptica medial também é afetada por este procedimento (Camozzato *et al.*, 2009). Fêmeas apresentam uma redução no número de células causada pela manipulação, o que também justifica os efeitos deste procedimento no eixo HPG e na redução da ovulação nestas ratas (Camozzato *et al.*, 2009).

Outra área afetada pela manipulação neonatal é o LC. Machos e fêmeas manipulados apresentam uma redução no número de células no LC tanto no período neonatal quanto na vida adulta (Lucion *et al.*, 2003). O LC localiza-se no tegumento dorsolateral da ponte e é a principal fonte de NA para o BO. A estimulação tátil no período neonatal induz um aumento da atividade elétrica no LC, promovendo assim um aumento na liberação de NA no BO (Rangel e Leon, 1995). Esta liberação de NA é necessária para a manutenção das respostas das células mitrais para a aquisição da preferência pelo odor (Wilson e Sullivan, 1991). O BO apresenta receptores β -adrenérgicos que estão funcionais desde as primeiras semanas de vida em ratos (Woo e Leon, 1995). Estudos mostram que a preferência pelo odor pode ser rapidamente adquirida pela ativação dos receptores β -adrenérgicos do BO (Sullivan *et al.*, 2000). A NA age nas células mitrais do BO através dos receptores β -adrenérgicos e na presença de um novo odor irá produzir uma preferência por este odor (Moriceau e Sullivan, 2004b). A ativação dos receptores β -adrenérgicos promove um aumento na concentração de AMPc, que por sua vez irá ativar uma

proteína quinase (PKA). Esta proteína atua fosforilando diversos substratos, como o fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc). Este processo induz a plasticidade neural do BO, sendo assim, a NA possui grande importância para o aprendizado olfatório (Sullivan *et al.*, 1989).

Estudos mostram que a manipulação neonatal também altera a liberação de monaminas no BO. Rainecki *et al.* (2009) mostraram que ratos machos e fêmeas manipulados no período neonatal apresentam uma redução da atividade de NA no BO aos 7 dias de idade. Estudos sugerem que uma disfunção no sistema noradrenérgico pode causar danos no SNC (Veyrac *et al.*, 2005). Perdas de neurônios noradrenérgicos no LC, responsáveis pela ruptura de aferências noradrenérgicas para o BO, podem contribuir para que ocorram alterações estruturais e funcionais no sistema olfatório. O rompimento das entradas sensoriais para o BO afeta diversos passos da neurogênese bulbar, incluindo o aumento da apoptose da população de interneurônios (Mandairon *et al.*, 2003). A NA é um regulador positivo para a neurogênese no BO e exerce um efeito neuroprotetor em ratos na vida adulta (Veyrac *et al.*, 2008). Considerando que a manipulação reduz o número de células no LC e que este procedimento causa também uma redução de NA, podemos inferir que estes fatores possam estar causando uma diminuição no número de células no BO, conforme demonstrado pelos nossos resultados.

Outra possível causa das alterações encontradas neste estudo, no BO podem ser os fatores neurotróficos. O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) está envolvido com a plasticidade, pois ajuda no crescimento e sobrevivência neuronal, bem como na manutenção estrutural e funcional das mudanças que ocorrem no SN durante o aprendizado olfatório. A morfologia da arborização dendrítica, sobrevivência, migração e diferenciação neuronal, também envolvem a regulação do

BDNF (Zimmerberg *et al.*, 2009). O BDNF é uma proteína cuja transcrição é aumentada durante o aprendizado olfatório. O CREB é conhecido como um fator de transcrição para o BDNF (Zimmerberg *et al.*, 2009). O BDNF apresenta um importante papel em diversos processos para regulação da morte celular, no desenvolvimento dos padrões de conexões, para o crescimento e complexidade dos dendritos, entre outros (Huang e Reichardt, 2001). Trabalhos realizados em nosso laboratório (resultados não publicados) mostram que a manipulação neonatal causa um aumento nos níveis de BDNF no BO. Sendo assim, alterações nos níveis de BDNF podem também estar causando modificações no número de células no BO.

O sistema olfatório é de grande importância para o desenvolvimento do animal e experiências vivenciadas na infância possuem grande impacto na sua vida adulta. Os odores que são apresentados na infância (reconhecimento da mãe) irão repercutir no desenvolvimento e na reprodução do animal (Moriceau e Sullivan, 2005). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a manipulação neonatal não alterou a preferência pelo odor do ninho em ratos machos e fêmeas aos 11 dias de vida, pois os animais submetidos ao procedimento de manipulação neonatal, testados aos 11 dias de idade, permanecem o mesmo tempo sobre a área com maravalha do seu ninho comparados a área com maravalha limpa. Rainecki *et al.* (2009) demonstraram que a manipulação neonatal causa uma redução na preferência pelo odor do ninho apenas em fêmeas e aos 7 dias de vida. Estes resultados podem ser explicados devido à diferença dos protocolos utilizados. O presente trabalho analisou animais aos 11 dias de vida (período mais seletivo ao aprendizado olfatório), enquanto Rainecki *et al.* (2009) analisou animais com 7 dias de vida (período sensível ao aprendizado olfatório). Durante o período neonatal os ratos aprendem rápida e facilmente a preferência pelo odor. Para que ocorra o

aprendizado olfatório no filhote, possibilitando que ele identifique o odor de sua mãe, ou até mesmo outro cheiro, é necessário o pareamento de dois estímulos: o tátil (que pode ser o cuidado maternal) e o olfatório (odor da mãe) (Sullivan *et al.*, 2000). Estudos demonstram que usando condicionamento clássico, no qual um odor é pareado com um estímulo tátil ou com choque os filhotes aprendem facilmente a distinguir este odor aos 6 dias de idade, independente do estímulo. Entretanto, quando é realizado este mesmo teste aos 12 dias de idade, não ocorre a preferência pelo odor pareado com o estímulo tátil, apenas com o choque (Sullivan e Leon, 1986). Isto demonstra que os animais tornam-se menos seletivos ao aprendizado com o passar do tempo, ocorrendo também a maturação de outras áreas, como a amígdala. A maturação de outras áreas do encéfalo após o período hiporresponsivo pode explicar o fato dos animais aos 11 dias de idade não apresentarem alteração na preferência olfatória. A manipulação neonatal causa uma alteração no estímulo tátil da mãe para com seu filhote, esta alteração causa um efeito nos filhotes fêmeas aos 7 dias de idade, fazendo com que os mesmos não reconheçam o ninho, entretanto esta alteração não tem efeito na preferência olfatória aos 11 dias. Estes resultados demonstram que a alteração do estímulo tátil da mãe é mais prejudicial durante o período sensível ao aprendizado olfatório, sendo a fase em que o filhote mais necessita de cuidados.

Diversos trabalhos enfocam a importância da relação mãe-filhote para o estabelecimento de respostas defensivas e estratégias reprodutivas na vida adulta (Cameron *et al.*, 2005). O sistema noradrenérgico envolvido na aprendizagem olfatória na infância é crítico para sobrevivência do animal até a vida adulta e comportamentos como o de acasalamento e cuidado com a prole são dependentes de fatores que acontecem durante este período (Brennan e Keverne, 1997). O

reconhecimento do estado reprodutivo do parceiro sexual é de extrema importância para o desenvolvimento dos comportamentos pré-copulatórios, que conseqüentemente irão levar ao comportamento sexual em si.

Os resultados apresentados nesta tese mostram que a manipulação neonatal realizada nos 10 primeiros dias de vida alterou a preferência sexual dos machos na vida adulta. Estes animais não demonstram preferência entre uma fêmea castrada e uma fêmea ativa, diferente do grupo não manipulado, que apresenta uma clara preferência pela fêmea sexualmente ativa. Entretanto, este resultado é diferente em fêmeas, pois ambos os grupos experimentais demonstraram preferência pelo macho sexualmente ativo. Apesar da manipulação não alterar a preferência olfatória aos 11 dias de idade, ocorreu um efeito tardio dependente do sexo, pois apenas os machos foram afetados.

Trabalhos realizados em nosso laboratório mostram que a manipulação neonatal induziu alterações nos comportamento sociais (Todeschin *et al.*, 2009). Este procedimento reduz o tempo de investigação social de ratos machos nos testes de memória social e interação social. Estes resultados também apresentam dimorfismo sexual, pois fêmeas submetidas ao teste de interação social não apresentam diferença em relação ao grupo não manipulado (Todeschin *et al.*, 2009). Nossos resultados estão de acordo com este estudo, mostrando que apenas os machos foram afetados pelo procedimento de manipulação.

Estudos mostram que o comportamento sexual é reduzido pela manipulação neonatal, tanto em machos quanto em fêmeas. Padoin *et al.* (2001) demonstraram que machos manipulados no período neonatal apresentam uma redução na frequência de intromissões penianas e no número de intromissões. Estes resultados

também são encontrados em fêmeas, visto que a manipulação causa uma redução na frequência de lordose (Gomes *et al.*, 2006). Estes estudos demonstram que a manipulação afeta o comportamento sexual em fêmeas, mas não sua preferência na busca de parceiro, o que não ocorre nos machos, que apresentam uma redução na preferência sexual e também do comportamento em si.

A importância do reconhecimento social é fundamental para o desenvolvimento e a manutenção das estruturas sociais (Sanches-Andrade e Kendrick, 2009). O desenvolvimento normal do filhote é necessário para mediar a ligação mãe-filhote, e o reconhecimento da mãe pelo filhote ocorre através do aprendizado olfatório (Sullivan *et al.*, 1989) que envolve o pareamento de um estímulo tátil e um olfatório, neste caso o cuidado maternal e o odor da mãe/ninho (Sullivan e Wilson, 2003). A manipulação neonatal é um procedimento considerado um estresse leve, o qual envolve uma breve separação maternal seguida de um aumento do estímulo tátil no filhote (Rainecki *et al.*, 2009).

Em ratos, o principal estímulo tátil nos filhotes é o comportamento de lambem o corpo e a região anogenital dos mesmos pela mãe. Este comportamento é tão importante quanto a amamentação, podendo alterar a plasticidade do SN (Van Oers *et al.*, 1999). Diversos trabalhos enfocam a importância da relação mãe-filhote no período neonatal para o desenvolvimento dos filhotes (Anderson e Schanberg, 1975; Pauk *et al.*, 1986). Alterações e/ou intervenções na relação mãe-filhote neste período, como a manipulação, podem causar distúrbios nesta relação e conseqüentemente modificar o comportamento maternal em relação a sua prole. Estudos propõem que os efeitos da manipulação dos filhotes são mediados pelo aumento do comportamento maternal causado pela intervenção na relação mãe-filhote (Liu *et al.*, 1997). Mães cujos filhotes foram manipulados no período neonatal

apresentam um aumento no comportamento de lambe os filhotes e de amamentação com o dorso arqueado quando comparadas a mães com filhotes não manipulados (Francis e Meaney, 1999).

O presente estudo também avaliou a frequência do comportamento maternal em diferentes horários do dia, no período em que os filhotes foram submetidos ao procedimento de manipulação neonatal. Nossos resultados mostram que a frequência do comportamento de amamentação total não foi estatisticamente diferente entre os grupos manipulado e não manipulado, tanto ao longo dos dias, quanto logo após o procedimento de manipulação. Entretanto, podemos perceber que existe uma maior oscilação na frequência deste comportamento no grupo manipulado, demonstrando que ocorre uma modificação nos padrões comportamentais dessas mães. A frequência do comportamento de lambe os filhotes também apresentou o mesmo padrão de oscilação, apesar dos grupos não serem estatisticamente diferentes, as mães dos filhotes que foram submetidos à manipulação neonatal apresentam um padrão instável deste comportamento ao longo dos dias. Quando avaliamos o comportamento de lambe logo após o procedimento de manipulação, verificamos uma tendência no aumento de lambidas nos filhotes do grupo manipulado. Os resultados obtidos no nosso estudo são diferentes dos descritos na literatura, os quais demonstram que a manipulação e o breve afastamento dos filhotes do ninho (15 min) aumentam o cuidado materno logo após o retorno dos filhotes (Liu *et al.*, 1997; Francis e Meaney, 1999; Champagne e Meaney, 2001).

Possivelmente a frequência de registros realizados no nosso estudo, tenha sido insuficiente para mostrar o aumento do comportamento da mãe, visto que não foram observações contínuas. Cabe salientar também que os protocolos utilizados

no desenvolvimento do nosso experimento e da literatura foram diferentes. Liu *et al.*, (1997) demonstraram um aumento no comportamento de lambar e de amamentação com dorso arqueado da mãe com os filhotes separados por 15 minutos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura realiza observações contínuas logo após o procedimento de manipulação. O presente trabalho realizou observações pontuais em diferentes períodos do dia, analisando apenas a frequência do comportamento realizado pela mãe a cada três minutos. Outro fator importante é que a mãe deve manter um padrão organizacional no cuidado e no comportamento maternal, seguindo assim uma sequência apropriada de eventos, como por exemplo, recolher os filhotes, lambê-los, amamentá-los com dorso arqueado (Stern, 1997). Mudanças na frequência e na intensidade da amamentação podem ser mediadores críticos para alterações fisiológicas e comportamentais a longo prazo (Walker, 2010).

Estudos realizados em nosso laboratório (Benetti *et al.*, 2006; de Azevedo *et al.*, 2010) sugerem que o aumento do comportamento da mãe em relação ao filhote não seja o fator preponderante para explicar as alterações comportamentais observadas no animal adulto que sofreu intervenção neonatal. A ruptura da relação mãe-filhote e a retirada dos filhotes do ambiente/ninho são fatores que exercem efeitos permanentes no desenvolvimento do animal. A retirada da ninhada da caixa-residência e sua manipulação parecem promover na mãe uma resposta comportamental de alteração no cuidado com sua prole. Apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas nos comportamentos de amamentação e de lambar os filhotes, podemos observar estas alterações. Estudos mais aprofundados devem ser realizados, sugere-se que haja um aumento no número de registros realizados, bem como no número amostral a fim de confirmar estes dados.

Em suma, o presente estudo mostra que a manipulação neonatal altera a morfologia do BO, reduzindo o número de células nas camadas glomerular e mitral e impede o crescimento esperado de células nestas camadas. Desta forma, podemos inferir que a manipulação neonatal atua tanto na morte celular quanto na neurogênese do BO. Em conjunto, estes fatores podem ser responsáveis pelas mudanças comportamentais observadas na vida adulta de animais que sofreram manipulação neonatal.

Tendo em vista a importância da relação mãe-filhote e do ambiente/ninho para o desenvolvimento da prole, bem como para a perpetuação da espécie, são necessários mais estudos elucidativos em relação aos efeitos que o procedimento de manipulação neonatal pode causar na vida destes animais.

CONCLUSÕES

Através dos experimentos desenvolvidos, foi possível concluir nesta tese que:

- A manipulação neonatal é um modelo experimental que causa alterações morfológicas permanentes no bulbo olfatório.
- A manipulação neonatal não altera a preferência olfatória no início da vida do animal (aos 11 dias de idade).
- A manipulação neonatal reduz a preferência sexual em machos na vida adulta.
- A manipulação neonatal não altera a frequência do comportamento maternal de fêmeas nos 10 primeiros dias após o parto, cujos filhotes foram manipulados no período neonatal.

PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados encontrados nesta tese e dando continuidade aos estudos dos efeitos da manipulação sobre o sistema olfatório, seria pertinente uma abordagem mais aprofundada sobre a morfologia do bulbo olfatório, deste modo propomos:

- Investigar se a redução no número de células na camada glomerular e de células mitrais está ocorrendo devido à morte celular, avaliando assim se está ocorrendo apoptose nestas células, através de imunistoquímica e microscopia eletrônica;
- Avaliar se está ocorrendo proliferação celular nestas células através de imunistoquímica para Brdu, nas regiões afetadas.
- Analisar se além da redução no número de neurônios também existe alterações na quantidade de células gliais do bulbo olfatório, devido à importância destas células nos processos de transmissão de informações.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, CE; Cadore, LP; Padoin, MJ; Barbosa-Coutinho, LM; Lucion, AB. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 1463-1466. 1997.

Albert, D; Walsh, M. Aggression in the lactating female rat: the decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiology and behavior**, 58: 477-481. 1995.

Anderson, TR; Schanberg, SM. Effect of thyroxine and cortisol on brain ornithine decarboxylase activity and swimming behavior in developing rat* 1. **Biochemical Pharmacology**, 24(4): 495-501. 1975.

Avitsur, R; Yirmiya, R. The partner preference paradigm: a method to study sexual motivation and performance of female rats. **Brain Research Protocols**, 3(3): 320-325. 1999.

Baum, MJ. Sexual differentiation of pheromone processing: Links to male-typical mating behavior and partner preference. **Hormones and Behavior**, 55(5): 579-588. 2009.

Benetti, F; Andrade de Araujo, P; Luiz Sanvitto, G; Lucion, AB. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress response in adult rats. **Developmental Psychobiology**, 49(3): 258-264. 2007.

Bodnoff, SR; Suranyi-Cadotte, B; Quirion, R; Meaney, MJ. Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H]flunitrazepam binding in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, 144(1): 105-107. 1987.

Bomholt, SF; Harbuz, MS; Blackburn-Munro, G; Blackburn-Munro, RE. Involvement and Role of the Hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) Stress Axis in Animal Models of Chronic Pain and Inflammation. **Stress**, 7(1): 1-14. 2004.

Brennan, PA; Keverne, EB. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, 51(4): 457-481. 1997.

Caldji, C; Diorio, J; Meaney, M, J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological psychiatry**, 48(12): 1164-1174. 2000.

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 through variations in maternal care. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 29(4-5): 843-865. 2005.

Camozzato, TSC; Winkelmann-Duarte, EC; Padilha, CB; Miguel, SPR; Bonzanini, L; Anselmo-Franci, JA; Fernandes, MC; Lucion, AB. Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. **Brain Research**, 1247: 92-99. 2009.

Carleton, A; Rochefort, C; Morante-Oria, J; Desmaisons, D; Vincent, J-D; Gheusi, G; Lledo, P-M. Making scents of olfactory neurogenesis. **Journal of Physiology-Paris**, 96(1-2): 115-122. 2002.

Champagne, F; Meaney, MJ. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Progress in Brain Research**, 133: 287-302. 2001.

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(3): 359-371. 2003.

Champagne, FA; Curley, JP; Keverne, EB; Bateson, PPG. Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. **Physiology & Behavior**, 91(2-3): 325-334. 2007.

Coutinho, SV; Plotsky, PM; Sablad, M; Miller, JC; Zhou, H; Bayati, AI; McRoberts, JA; Mayer, EA. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology** 282(2): G307-316. 2002.

D'Amato, FR; Mazzacane, E; Capone, F; Pavone, F. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice. **Developmental Brain Research**, 117(1): 15-20. 1999.

Davis, BJ; Macrides, F; Youngs, WM; Schneider, SP; Rosene, DL. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. **Brain Research Bulletin**, 3(1): 59-72. 1978.

de Azevedo, MS; de Souza, FL; Donadio, MVF; Lucion, AB; Giovenardi, M. Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior. **Psychology & Neuroscience**, 3(1): 73-78. 2010.

de Olmos, J; Beltramino, C; Alheid, G. Amygdala and Extended Amygdala of the rat: a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: G Ed. Paxinos (Ed.). The rat nervous system: Elsevier Academic Presss, v.19, 2004.p.509-603. .

Dias, CGA; Silva, LDM; Mattos, MRF. Papel do olfato no estabelecimento do vínculo materno-filial em mamíferos. **Ciência Animal**, 18(2): 57-66. 2008.

do Nascimento, RBS; Borda, JS; Engelberth, RCGJ. The presence of neuronal-specific nuclear protein (NeuN) in the circadian timing system of the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Sleep Science**: 36. 2010.

Fernández-Teruel, A; Escorihuela, RM; Driscoll, P; Tobena, A; Bättig, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman high-and low-avoidance rats. **Physiology and Behavior** 50(3): 563-565. 1991.

Ferreira, A; Hansen, S. Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, 100(2): 173. 1986.

Francis, D; 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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 794(1): 136-152. 1996.

Francis, DD; Caldji, C; Champagne, F; Plotsky, PM; Meaney, MJ. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. **Biological Psychiatry** 46(9): 1153-1166. 1999.

Francis, DD; Meaney, MJ. Maternal care and the development of stress responses. **Current Opinion in Neurobiology**, 9(1): 128-134. 1999.

Gheusi, G; Lledo, PM. Control of early events in olfactory processing by adult neurogenesis. **Chemical senses**, 32(4): 397. 2007.

Giovenardi, M; Consiglio, AR; Barros, HMT; Lucion, AB. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33(9): 1083-1088. 2000.

Giovenardi, M; de Azevedo, MS; da Silva, SP; Hermel, EES; Gomes, CM; Lucion, AB. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology & Behavior**, 86(1-2): 209-217. 2005.

Gluckman, PD; Hanson, MA; Spencer, HG; Bateson, P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease:

implications for the interpretation of empirical studies. **Proceedings Biological Sciences**, 272(1564): 671-677. 2005.

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.

Gomes, CM; Rainecki, C; de Paula, PR; 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(2): 435-445. 2005.

Grota, LJ; Ader, R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, 17(4): 722, IN9, 723-729. 1969.

Grota, LJ; Ader, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage* 1. **Hormones and Behavior**, 5(4): 275-282. 1974.

Handa, RJ; Burgess, LH; Kerr, JE; O'Keefe, JA. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. **Hormones and Behavior**, 28(4): 464-476. 1994.

Herman, JP; Cullinan, WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, 20(2): 78-84. 1997.

Hess, JL; Denenberg, VH; Zarrow, MX; Pfeifer, WD. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology and Behavior** 4(1): 109-111. 1969.

Howard, CV; Reed, MG. **Unbiased Stereology**: Bios Scientific Publishers. 1998. 41-106 p.

Huang, EJ; Reichardt, LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, 24: 677. 2001.

Huot, RL; Plotsky, PM; Lenox, RH; McNamara, RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, 950(1-2): 52-63. 2002.

Kaffman, A; Meaney, MJ. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, 48(3-4): 224-244. 2007.

Kendrick, KM; Levy, F; Keverne, EB. Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sleep. **Science**, 256(5058): 833. 1992.

Kuhn, CM; Schanberg, SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 16(3-4): 261-270. 1998.

Landers, MS; Sullivan, RM. Norepinephrine and associative conditioning in the neonatal rat somatosensory system. **Developmental Brain Research**, 114(2): 261-264. 1999.

Leon, M; Moltz, H. Maternal pheromone: Discrimination by pre-weanling albino rats. **Physiology & Behavior**, 7(2): 265-267. 1971.

Levine, S; Haltmeyer, GC; Karas, GG; Denenberg, VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology & Behavior**, 2(1): 55-59. 1967.

Levine, S. The Psychoendocrinology of Stressa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 697(1): 61-69. 1993.

Levine, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**, 73(3): 255-260. 2001.

Liu; Caldji; Sharma; Plotsky; Meaney. Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, 12(1): 5-12. 2000.

Liu, D; Diorio, J; Tannenbaum, B; Caldji, C; Francis, D; Freedman, A; Sharma, S; Pearson, D; Plotsky, PM; Meaney, MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, 277(5332): 1659. 1997.

Lucion, AB; Pereira, FM; Winkelman, EC; Sanvitto, GL; Anselmo-Franci, JA. Neonatal Handling Reduces the Number of Cells in the Locus Coeruleus of Rats* 1. **Behavioral Neuroscience**, 117(5): 894-903. 2003.

Macrì, S; Würbel, H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. **Hormones and Behavior**, 50(5): 667-680. 2006.

Madruga, C; 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(2): 241-246. 2006.

Mandairon, N; Jourdan, F; Didier, A. Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. **Neuroscience**, 119(2): 507-516. 2003.

Mandarim-de-Lacerda, CA. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 75(4): 469-486. 2003.

McEwen, BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological reviews**, 87(3): 873. 2007.

Meaney, MJ; Aitken, DH; Van Berkel, C; Bhatnagar, S; Sapolsky, RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. **Science**, 239(4841): 766. 1988.

Meaney, MJ; Bhatnagar, S; Larocque, S; McCormick, C; Shanks, N; Sharma, S; Smythe, J; Viau, V; Plotsky, PM. Individual Differences in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Response and the Hypothalamic CRF Systema. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 697(1): 70-85. 1993.

Meaney, MJ; Diorio, J; Francis, D; Widdowson, J; LaPlante, P; Caldji, CH; Sharma, S; Seckl, JR; Plotsky, PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Developmental Neuroscience** 18(1-2): 49. 1996.

Meerlo; Horvath; Nagy; Bohus; Koolhaas. The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, 11(12): 925-933. 1999.

Meisami, E; Sendera, TJ. Morphometry of rat olfactory bulbs stained for cytochrome oxidase reveals that the entire population of glomeruli forms early in the neonatal period. **Developmental brain research**, 71(2): 253-257. 1993.

Moore, CL; Jordan, L; Wong, L. Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. **Physiology & behavior**, 60(5): 1361-1367. 1997.

Moriceau, S; Roth, TL; Okotoghaide, T; Sullivan, RM. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 22(5-6): 415-422. 2004.

Moriceau, S; Sullivan, RM. Corticosterone influences on mammalian neonatal sensitive-period learning. **Behavioral Neuroscience**, 118(2): 274. 2004a.

Moriceau, S; Sullivan, RM. Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning. **The Journal of Neuroscience**, 24(5): 1182-1189. 2004b.

Moriceau, S; Sullivan, RM. Neurobiology of infant attachment. **Developmental psychobiology**, 47(3): 230-242. 2005.

Mullen, RJ; Buck, CR; Smith, AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, 116(1): 201. 1992.

Nakamura, S; Sakaguchi, T. Development and plasticity of the locus coeruleus: a review of recent physiological and pharmacological experimentation. **Progress in neurobiology**, 34(6): 505. 1990.

Numan, M. Maternal Behavior. In: E Knobil e Jd Neill (Ed.). The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994.p.221-302.

Numan, M; Insel, TR. **The neurobiology of parental behavior in the rat**. New York: Springer. 2003

Núñez, JF; Ferré, P; Escorihuela, RM; Tobeña, A; Fernández-Teruel, A. Effects of Postnatal Handling of Rats on Emotional, HPA-Axis, and Prolactin Reactivity to Novelty and Conflict. **Physiology & Behavior**, 60(5): 1355-1359. 1996.

Padoin, MJ; Cadore, LP; Gomes, CM; Barros, HMT; Lucion, AB. Long-Lasting Effects of Neonatal Stimulation on the Behavior of Rats. **Behavioral Neuroscience** 115(6): 1332-1340. 2001.

Papaioannou, A; Dafni, U; Alikaridis, F; Bolaris, S; Stylianopoulou, F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. **Neuroscience**, 114(1): 195-206. 2002.

Pauk, J; Kuhn, CM; Field, TM; Schanberg, SM. Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. **Life sciences**, 39(22): 2081-2087. 1986.

Paxinos, G; Watson, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. London: Academic Press 2007

Plotsky, PM; Meaney, MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, 18(3): 195-200. 1993.

Poeggel, G; Helmeke, C; Abraham, A; Schwabe, T; Friedrich, P; Braun, K. Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(26): 16137. 2003.

Pryce, CR; Feldon, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 27(1-2): 57-71. 2003.

Raineki, C; De Souza, MA; Szawka, RE; Lutz, ML; De Vasconcellos, LFT; Sanvitto, GL; Izquierdo, I; Bevilaqua, LR; Cammarota, M; Lucion, AB. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, 159(1): 31-38. 2009.

Rangel, S; Leon, M. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. **Developmental Brain Research**, 85(2): 187-191. 1995.

Reisbick, S; Rosenblatt, JS; Mayer, AD. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. **Journal of Comparative Physiological Psychology** 89(7): 722. 1975.

Rosenblatt, JS; Hazelwood, S; Poole, J. Maternal behavior in male rats: effects of medial preoptic area lesions and presence of maternal aggression. **Hormones and behavior**, 30(3): 201-215. 1996.

Russell, JA; Douglas, AJ; Ingram, CD. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. **Progress in brain research**, 133: 1-38. 2001.

Saghatelian, A; Carleton, A; Lagier, S; de Chevigny, A; Lledo, P-M. Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. **Journal of Physiology-Paris**, 97(4-6): 517-528. 2003.

Sanchez-Andrade, G; James, BM; Kendrick, KM. Neural encoding of olfactory recognition memory. **The journal of reproduction and developmental**, 51(5): 547-558. 2005.

Sanchez-Andrade, G; Kendrick, KM. The main olfactory system and social learning in mammals. **Behavioural Brain Research**, 200(2): 323-335. 2009.

Sapolsky, RM; Meaney, MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**, 11(1): 65-76. 1986.

Sarnat, HB; Nochlin, D; Born, DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. **Brain and Development**, 20(2): 88-94. 1998.

Schanberg, SM; Eboniuk, G; Kuhn, CM. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 175(2): 135-146. 1984.

Schmitz, C; Hof, P. **Design-based stereology in neuroscience**, v.130. 2005. 813-831 p.

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 females. **Physiology & Behavior**, 81(3): 489-498. 2004.

Shiple, M; McLean, J; Ennis, M. Olfactory system. In: E Paxinos (Ed.). The rat nervous system: Elsevier Academic Presss, 2004.p.923-955.

Slotnick, BM; Hersch, S. A stereotaxic atlas of the rat olfactory system* 1. **Brain Research Bulletin**, 5: 1-55. 1980.

Smythe, JW; McCormick, CM; Rochford, J; Meaney, MJ. The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. **Physiology & Behavior**, 55(5): 971-974. 1994.

Stern, JM; Johnson, SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & behavior**, 47(5): 993-1011. 1990.

Stern, JM. Offspring induced nurturance; Animal–human parallels. **Developmental Psychobiology**, 31(1): 19-37. 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(2): 204-212. 1993.

Sullivan, RM; Leon, M. Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. **Developmental Brain Research**, 27(1): 278-282. 1986.

Sullivan, RM; Wilson, DA; Leon, M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. **The Journal of Neuroscience**, 9(11): 3998. 1989.

Sullivan, RM; Wilson, DA. Dissociation of behavioral and neural correlates of early associative learning. **Developmental psychobiology**, 28(4): 213-219. 1995.

Sullivan, RM; Stackenwalt, G; Nasr, F; Lemon, C; Wilson, DA. Association of an odor with an activation of olfactory bulb noradrenergic α -receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. **Behavioral Neuroscience**, 114(5): 957. 2000.

Sullivan, RM; Wilson, DA. Molecular biology of early olfactory memory. **Learning & Memory**, 10(1): 1. 2003.

Swain, JE; Lorberbaum, JP; Kose, S; Strathearn, L. Brain basis of early parent–infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, 48(3-4): 262-287. 2007.

Todeschin, AS; Winkelmann-Duarte, EC; Jacob, MHV; Aranda, BCC; Jacobs, S; Fernandes, MC; Ribeiro, MFM; Sanvitto, GL; Lucion, AB. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. **Hormones and Behavior**, 56(1): 93-100. 2009.

Van Leengoed, E; Kerker, E; Swanson, HH. Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **Journal of Endocrinology**, 112(2): 275-282. 1987.

Van Oers, HJ; De Kloet, ER; Levine, S. Persistent Effects of Maternal Deprivation on HPA Regulation Can Be Reversed By Feeding and Stroking, But Not By Dexamethasone. **Journal of Neuroendocrinology**, 11(8): 581-588. 1999.

Veyrac, A; Didier, A; Colpaert, F; Jourdan, F; Marien, M. Activation of noradrenergic transmission by α 2-adrenoceptor antagonists counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. **Experimental Neurology**, 194(2): 444-456. 2005.

Veyrac, A; Sacquet, J; Nguyen, V; Marien, M; Jourdan, F; Didier, A. Novelty Determines the Effects of Olfactory Enrichment on Memory and Neurogenesis Through Noradrenergic Mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, 34(3): 786-795. 2008.

Villescas, R; Bell, RW; Wright, L; Kufner, M. Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. **Developmental Psychobiology** 10(4): 323-329. 1977.

Walker, C-D. Maternal touch and feed as critical regulators of behavioral and stress responses in the offspring. **Developmental Psychobiology**, 52(7): 638-650. 2010.

Whitten, W; Champlin, A. The role of olfaction in mammalian reproduction. In: J Field, H Magoun, *et al* (Ed.). Handbook of Physiology - Endocrinology II. Baltimore: Waverly Press, 1959.p.109-123.

Wilson, DA; Sullivan, RM. Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward: II. Norepinephrine mediates a specific component of the bulb response to reward. **Behavioral neuroscience**, 105(6): 843. 1991.

Wilson, DA; Sullivan, RM. Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning*. **Behavioral and neural biology**, 61(1): 1-18. 1994.

Wilson, DA; Fletcher, ML; Sullivan, RM. Acetylcholine and olfactory perceptual learning. **Learning & Memory**, 11(1): 28. 2004.

Winberg, J. Mother and newborn baby: Mutual regulation of physiology and behavior— A selective review. **Developmental Psychobiology**, 47(3): 217-229. 2005.

Winkelmann-Duarte, EC; Todeschin, AS; Fernandes, MC; Bittencourt, LC; Pereira, GAM; Samios, VN; Schuh, AFS; Achaval, ME; Xavier, LL; Sanvitto, GL. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain research**, 1170: 20-30. 2007.

Woo, CC; Leon, M. Early olfactory enrichment and deprivation both decrease adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 360(4): 634-642. 1995.

Zimmerberg, B; Foote, HE; Van Kempen, TA. Olfactory association learning and brain-derived neurotrophic factor in an animal model of early deprivation. **Developmental Psychobiology**, 51(4): 333-344. 2009.

Anexo 1

Os resultados referentes à morfologia do bulbo olfatório em machos e fêmeas aos 11 e 90 dias de idade, apresentados nesta tese, estão em um artigo que foi submetido para publicação na revista *Behavioral Neuroscience*.

Behavioral Neuroscience

Manuscript Submission Portal

Manuscript: Neonatal handling and its effects on the morphology of the olfactory bulb

Dr. de Azevedo:

Your manuscript has been sent to the editorial office. The manuscript coordinator will send an electronic confirmation, with your manuscript number, when the manuscript file is formally opened in the editorial office.

Behavioral Neuroscience Editorial Office

[APPLY for APA membership](#) | [RENEW your APA membership](#)

-FKLDDM%DFN2 11EHMDSURGFVWVWHP HUEGG3 V FKBUEDS VFFDURQI&RS UJKWY 111111
JA FXKDYHTX-MBRCMFLUFFP P HMDERKMMVMWMSBDAHMHGZMFP NMMF# CSDFLJ
4 XHMBRMUHDUBQJNS-FLLEFP DQVFLSMMVKRQIEHGLFFWGVWVW-HGVALDIB11E-HAVW-HKXUDDNZ KIEKIMZ DMVXEP MWK3

Neonatal handling and its effects on the morphology of the olfactory bulb

Márcia Scherem de Azevedo¹, Elisa Cristina Winkelmann-Duarte², Vanise Sebben¹, Simone Mattos Louzada¹, Marilda da Cruz Fernandes³, Márcia Giovenardi³ and Aldo Bolten Lucion¹

¹Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório de Histologia, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

³Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author:

Márcia Scherem de Azevedo

Rua Sarmiento Leite, 500, 2º andar, Laboratório 11

Departamento de Fisiologia – Fone: 55 51 3308-3453/ Fax: 55 51 3308-3656

Instituto de Ciências Básica da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, CEP 90.050-170

Brasil

E-mail: marciascherem@yahoo.com.br

Abstract

Neonatal handling alters maternal behavior and mother-pup inducing physiological and behavioral changes in response to stressors that persist throughout the animal's life. The objective of this study was to analyze the effects of neonatal handling (PND1 to PND10) on the number of cell layers in the olfactory bulb of male and female rats at 11 and 90 days of age. Our results showed a significant reduction in the number of mitral cells and the number of cells in the glomerular layer in male and female manipulated rats at both ages. The number of NeuN-positive neurons is also changed. Neonatal handled females show a reduction in the number of NeuN-positive neurons in adulthood. Alterations in the neonatal environment cause permanent structural changes in the olfactory bulb, which can be one of the causes of changes in social behavior, such as sexual behavior, social interaction and memory, found in animals undergoing neonatal handling.

Key words: neonatal handling, olfactory bulb, cells

Introduction

The development of plasticity as well as its restrictions occur in all organizational levels from the behavior to anatomy, and it is much more difficult to revert an altered development in anatomic levels than in behavioral ones (Macrì *et al.*, 2009; Macrì & Würbel, 2006). Thus, experiences occurring early in the life of the animal may influence the development of central nervous system (CNS) and thereby change behavior, the functioning of the adult brain (Papaioannou, Dafni, Alikaridis, Bolaris, & Stylianopoulou, 2002) as well as the emotional and cognitive functions (Fenoglio, Brunson, & Baram, 2006; Poeggel *et al.*, 2003). Several experimental procedures (maternal separation, prenatal stress, food restriction) are used as a model of study leading to environmental variations, aiming at altering the neonatal environment and evaluate long-lasting effects both in pups and adults (Huot, Plotsky, Lenox, & McNamara, 2002; Meaney, Aitken, Van Berkel, Bhatnagar, & Sapolsky, 1988; Poeggel *et al.*, 2003; Raineke *et al.*, 2009; Van Oers, De Kloet, & Levine, 1999).

Neonatal handling involves brief mother separation and tactile stimulation of pups (Raineke *et al.*, 2009). It also promotes change in maternal behavior and consequently the mother-pup relationship (de Azevedo, de Souza, Donadio, Lucion, & Giovenardi, 2010; Liu *et al.*, 1997). This change in the mother-pup relationship as well as the pup removal from its environment/nest are factors responsible for physiological changes and changes in behavioral patterns that persist throughout the animal's life (Hess, Denenberg, Zarrow, & Pfeifer, 1969; Levine, 1993; Levine, 2001; Levine, Haltmeyer, Karas, & Denenberg, 1967; Liu, Caldji, Sharma, Plotsky, & Meaney, 2000; Meaney *et al.*, 1993; Meaney *et al.*, 1996; Meerlo, Horvath, Nagy,

Bohus, & Koolhaas, 1999; Núñez, Ferré, Escorihuela, Tobeña, & Fernández-Teruel, 1996).

Lucion et al. (2003) showed that neonatal handling reduces the number and volume of cells in the *locus coeruleus* (LC) both in males and females, when compared to the control group. Studies in our laboratory show that neonatal handling causes a reduction in cell density in the medial preoptic area (MPOA) and the posterior-dorsal medial amygdala (MePD) (Camozzato et al., 2009).

Neonatal handling also causes behavioral changes. Previous works had shown that neonatal handling reduces the social interaction behavior in adult male rats (Todeschin et al., 2009), as well as changes the sexual behavior. In females, there is a reduction of the lordosis quotient (Gomes et al., 2005), whereas males have a reduction in the number of mounts (Gomes, Frantz, Sanvitto, Anselmo-Franci, & Lucion, 1999; Padoin, Cadore, Gomes, Barros, & Lucion, 2001), showing a reduced reproductive capacity..

The interactions and social ties are very important for the development and perpetuation of the species. Odor has an essential role in sexual behavior, predator fear, the searching for food, the recognition of new environments and the maternal behavior (Moore, Jordan, & Wong, 1997). From a structural standpoint, the olfactory system differs in: main olfactory bulb (MOB) and accessory olfactory bulb (AOB). The olfactory perception occurs in the sensorial neurons within the olfactory epithelium (OE) and are projected to the MOB, which has a laminar organization, divided into layers formed mainly by cells periglomerulares, mitral, tufted cells and granule cells. The mitral and tufted cells are the major output olfactory bulb (OB) pathways, and they receive input pathways the primary connection dendritic glomeruli. The mitral and tufted cells have their dendrites in the outer plexiform layer, where they form

synapses with dendrodendritic granule cells, which are GABAergic interneurons. The granular cells are responsible for the output control of the mitral cells and inhibitory lateral interaction (Ciombor, Ennis, & Shipley, 1999).

In rodents, the mother recognition by the pup assures that it is fed, cared for and protected. Smell is necessary to mediate the mother-pup interaction and the mother-pup recognition, occurs with the olfactory learning (Sullivan, Wilson, & Leon, 1989). The changes occurring at synapses between the mitral-granular cells are crucial for the olfactory learning (Sanchez-Andrade & Kendrick, 2009). This process produces metabolic and anatomical changes, which is supported by an increase of noradrenaline (NA) in LC (Moriceau & Sullivan, 2004). The NA and the LC have an important role in the behavior and neural plasticity in early development. The association of olfactory learning in pups requires input from the LC to the OB during exposure to an odor, so that the smell memory is formed (Landers & Sullivan, 1999). This paper hypothesizes that neonatal handling alters the morphology of the layers forming the olfactory bulb and, consequently, inducing changes in social behavior observed in offspring and adults. Therefore, the objective of this work was to quantitatively analyze the number of cells in three layers of the OB of male and female rats (at 11 and 90 days of age) suffering neonatal handling.

Methods

Animals

Primiparous pregnant Wistar rats (n=12) were obtained from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Females were individually placed in transparent acrylic boxes, and the day of parturition was monitored and designated day 0. On the day following parturition, the litters were randomly standardized into eight pups each,

without taking into account the sex of the pups. All animals were housed in a temperature-controlled room (22 ± 1 °C) under a 12 h/12 h light/dark cycle, with lights off at 5:00pm. All animals had free access to water and food (Nuvilab Cr2, Colombo, Brazil) for the entire study period. All the experiments were conducted according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. Procedures were approved by the University Research Ethics Committee.

At 21 days of age, the pups were weaned, females and males being housed five per cage until adulthood.

Neonatal intervention

After parturition, the females were divided into two experimental groups according to which intervention was carried out with the pups: nonhandled and handled. The litters undergoing one type of neonatal intervention until postnatal day 10 were allocated in the groups as follows: in the nonhandled group, animals were not touched by the researchers or by the vivarium staff during the first 10 postnatal days. In the handled group, animals were separated from mother and handled 1 min per day for the first 10 postnatal days. The handling procedure consisted of removing mother from the home cage, placing it in a separate room. The pups remained in the colony room, separated from the nest, and were handled for 10 min per day by a latex-gloved researcher as described in previous studies (Gomes *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2005; Padoin *et al.*, 2001; Rainecki *et al.*, 2009; Severino *et al.*, 2004). The pups were then immediately returned to their homecages, and mother to the cage (Severino *et al.*, 2004).

All experimental procedures began on the day following parturition (day 1) and were performed during the light cycle (Severino *et al.*, 2004; Rainekei *et al.*, 2009). Cleaning of the homecages began on postnatal day 11.

Male and female rats were studied at two different ages: 11 days (neonatal period) and 90 days (adult). The rats in each experimental group (nonhandled and handled) and of each age (n=6) were nonsiblings (each subject from a different litter), but male and female came from the same litter. Adult females were studied in diestrus. The estrous cycle was verified by taking vaginal smears over a period of 15 days, and only females with at least three regular cycles were studied.

Histological procedures for cell counting

In the experiment for the cell counting, 11- and 90- day-old males and females were used on both groups (nonhandled and handled). Rats were anesthetized with xilasine (5-10 mg/Kg body weight, i.p.) and Ketamine (75-95 mg/Kg body weight, i.p.), and the 11-day-olds were perfused with phosphate buffered saline (PBS) with heparin (50 ml) and the 90-day-old rats , 100 ml followed by paraformaldehyde 4% diluted in phosphate buffer 0.1M (pH 7.4) at 4°C at the same flow rate and total amount. The perfusion rate was approximately 1 drop (50 µl) in 7 seconds for the 11-day-olds and 1 drop in 5 seconds for the 90-day-olds. After the perfusion, the brain was extracted from the skull, weighed, and placed in the fixing solution for 8h. After fixation, the brain was washed in running water for 1 h and then dehydrated in different concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, 95% and absolute ethanol) and cleared with xylol. They were included in the final position with paraplastic resin (Histosec-Merck). Coronal serial sections (5-µm thick) were obtained with a microtome and serially collected on glued slides. The tissue was stained with cresyl

violet. After staining, the sections were dehydrated through an ethanol series and coverslipped with Entellan (Merck).

Estimation of the numerical density of cells

It was used a light microscope (Zeiss Axioscop2) and a video camera (CCD video camera module) attached to a computer (Apple Macintosh 8600-300) and an image analyzing system (NIH Image 1.62f, Rasband, 1996). Using a 10× lens, the OB was identified according to a rat brain atlas (Paxinos & Watson, 2007; Slotnick & Hersch, 1980). The dissector method used in the present study to estimate the total number of neurons is a three-dimensional probe that samples structures in proportion to their number without regarding the size or shape of the structure (Mandarim-de-Lacerda, 2003). In a dissector, two sections are used to create a sampling volume with an upper, reference section, containing a test frame. Counting was performed on the right and left side inside an 8405 μm^2 frame of for the counting of cells in glomerular layer, mitral and granular and 15,558 μm^2 for mitral cells within the mitral layer. The test frame, the unbiased counting frame, ensures that all objects are counted with equal probability. Sections were viewed with a 100× planachromatic immersion oil objective to identify cell nuclei. For each frame, the thickness of the section was measured by focusing on the upper and lower section surfaces. The neurons with a well focused nucleus in the lookup, but not in the lookdown, were counted. Another condition was that the nucleus of the cell should be inside the test area, but could not touch 2 borderlines of the test area, previously chosen (forbidden lines). The numerical density (N_v) of neurons (number of cells per mm^3) was determined by the use of 10 random dissector pairs for each layer and rat. Each section was used for only one counting.

The same counting procedures were applied for all groups and thus the comparisons may be appropriate to detect the effects of neonatal handling on the development of the nuclei studied.

Immunohistochemistry for NeuN

The males and females of both groups were studied at 11 and 90 days of age. The number of animals in each experimental group (nonhandled and handled) was 6, and they were nonsiblings (each subject from a different litter). Adult females were studied in diestrus to avoid unpredictable variations in the results due to different levels of sex steroids in circulation.

Tissue preparation

Rats were anesthetized with xilasine (5-10 mg/Kg body weight, i.p.) and Ketamine (75-95 mg/Kg body weight, i.p.) and were perfused with phosphate buffered saline (PBS) with heparin (50 ml for the 11-day-olds and 100 ml for the 90-day-old rats) followed by paraformaldehyde 4% diluted in phosphate buffer 0.1M (pH 7.4) at 4°C at the same flow rate and total amount. The perfusion rate was approximately 1 drop (50 µl) in 7 seconds for the 11-day-olds and 1 drop in 5 seconds for the 90-day-olds. After the perfusion, the brain was extracted from the skull, weighed, and placed in the fixing solution for 8h. After fixation, the brain was washed in running water for 1 h, and then dehydrated in different concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, 95% and absolute ethanol) and cleared with xylol. They were included in the final position with paraplastic resin (Histosec - Merck). Coronal serial sections (5-µm thick) were obtained with a microtome and serially collected on glued slides. After collection, the sections were kept in a freezer at -18 °C until immunohistochemistry.

For the immunohistochemistry, slides containing sections have undergone a process of deparaffinization in an oven at 70 °C and subsequent washes in 100% alcohol and xylol. The following procedure was the recovery in sodium citrate (pH 6.0). To block endogenous peroxidase, sections were soaked in a solution of hydrogen peroxide, at 5%, and after 20 min washed with PBS. After this, the procedure was blocked with nonspecific protein bovine serum albumin, 1%, for 1 h. The sections were incubated with primary antibody (anti-NeuN, Chemicon International brand) at a dilution of 1:1000 for 12 h at 4 °C. After the incubation period, the samples were washed in PBS and sections were incubated with secondary antibody anti-mouse/rabbit (Picture Max, HPR Polymer conjugate brand Invitrogen) for 40 min. The material was washed in PBS and was incubated with secondary antibody (Picture Max, HPR Polymer conjugate brand Invitrogen) for 40 min. Sections were washed again in PBS. The immunohistochemical reaction was revealed by incubating with tetrahydrochloride 3-3 'diaminobenzidine (DAB) 0.06% diluted in PBS. The sections were washed in PBS, dehydrated in 100% ethanol and cleared in xylol. After staining, the sections were dehydrated through an ethanol series and coverslipped with Entellan (Merck). For the control of immunohistochemistry, primary antibody was replaced by PBS and the rest of the procedure was identical to the one described above.

The cell body of the positive stained cells for NeuN protein was counted using a 100x-lens microscope (Zeiss Axioscop2) and a video camera (CCD video camera module) coupled to a computer (Apple Macintosh 8600 -300) and a system for image analysis (NIH Image 1.62f). The counting of neurons in each region was performed using the right and left hemispheres (Madruga, Xavier, Achaval, Sanvitto, & Lucion, 2006). Data were expressed as the mean (SEM) number of NeuN-positive stained

cells within an 8.405 μm^2 test-area.. Cells were counted provided that they were inside the previously defined test-area, unless one of the 2 borderlines of the frame was superimposed over them (forbidden lines) (Mandarim-de-Lacerda, 2003). It was counted the neurons within this area and the test that touched the lines of inclusion. Neurons focusing on the exclusion lines were not counted (Camozzato *et al.*, 2009; Howard & Reed, 1998; Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007).

Statistical analysis

The values of the estimated number of cells in the nucleus were expressed as means \pm SEM. Results were compared between groups (nonhandled and handled), ages (11 and 90 days of age) by a two-way ANOVA. In all cases, when appropriate, a post hoc Bonferroni test comparison was used to analyze individual differences. The factors considered were group (handled or unhandled) and age (11 days or 90 days of age). In all cases, the accepted significance level was $p < 0.05$. The GraphPad Prism 5.0 was used as computational tool for statistical analysis of data.

Results

Figure 1A shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of mitral cells, on the mitral layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=37.48$], in which the numerical density of cells in the handled group was lower than that of the nonhandled one. It was detected almost significant main effect for age [$F_{(1,20)}=12.07$], in which the density of cells in 11-days-old was higher than in nonhandled adult. However, no interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=0.007$] was detected. Figure 1B shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of the mitral layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days of age.

Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=0.42$] and non significant difference for main effect age [$F_{(1,20)}=0.009$]. There was no significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=1.92$]. Figure 1C shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of the glomerular layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a significant main effect for the handled group [$F_{(1,20)}=12.11$], in which the numerical density of cells in this group at 11 days old was lower than that of the nonhandled one.

Significant main effect for age [$F_{(1,20)}=6.09$] was detected. There was no significant effect for interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=0.68$]. Figure 1D shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of the granular layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days old. Two-way ANOVA showed a significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=5.99$], and the main effect for age [$F_{(1,20)}=13.05$]. There was no significant handled X age interaction effect [$F_{(1,20)}=0.003$].

Figure 2A shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of mitral cells on the mitral layer of the olfactory bulb of 11- and 90-day-old female rats. Two-way ANOVA showed a significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=6.85$], in which the numerical density of mitral cells in the handled group at 90 days of age was lower than that of the nonhandled one. Furthermore, the numerical density of mitral cells in the nonhandled female at 90 days of age was higher than that of the handled one. There was no significant main effect for age [$F_{(1,20)}=2.52$], but a significant main effect for interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=9.28$]. Figure 2B shows the estimated numerical density (number of cells per mm^3) of the mitral layer of the olfactory bulb of 11- and 90-day-old female rat. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=0.42$] and non significant difference for

main effect age [$F_{(1,20)}=5.28$]. There was no significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=0.03$]. Figure 2C shows the estimated numerical density (number of cells per mm³) of the glomerular layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a significant main effect for the handled [$F_{(1,20)}=6.75$]. There was significant main effect for age [$F_{(1,20)}=14.27$], in which the numerical density of cells in the handled group at 90 days of age was lower than that of the nonhandled one. No significant main effect for interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=9.28$] was detected. Figure 2D shows the estimated numerical density (number of cells per mm³) of the granular layer of the olfactory bulb of females rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for the handled group [$F_{(1,20)}= 1.92$]. There was significant main effect for age [$F_{(1,20)}= 17.03$], in which the numerical density of cells at 90 days of age was higher than that at the 11 days old in both groups. No significant main effect for interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=0.84$] was detected.

—Insert Figures 1 and 2 here—

Figure 3A shows the number of NeuN-positive neurons in the glomerular layer of the olfactory bulb of 11- and 90-day-old male rats. Two-way ANOVA showed a significant main effect for handled group [$F_{(1,20)}=0.36$]. There was significant main effect for age [$F_{(1,20)}=0.20$]. No significant main effect for interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=2.26$] was detected. Figure 3B shows the number of NeuN-positive neurons in the mitral layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled [$F_{(1,20)}= 0.15$] and no significant difference for main effect age [$F_{(1,20)}=2.15$]. There was no significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=1.82$]. Figure 3C shows the number of NeuN-positive neurons in the granular layer of the olfactory bulb of male rats at 11

and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled group [$F_{(1,20)}=0.006$]. There was a significant main effect for age [$F_{(1,20)}=16.5$]. There was no significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=1.35$]. Figure 4A shows the number of NeuN-positive neurons in the granular layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=0.27$] and no significant difference for main effect age [$F_{(1,20)}=1.25$]. There was significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=9.32$], in which the number of NeuN-positives neurons in the handled group was lower than that of the nonhandled one at 90 days of age. Figure 4B shows the number of NeuN-positive neurons in the mitral layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed no significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=0.14$] and no significant difference for main effect age [$F_{(1,20)}=0.72$]. There was significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=7.68$], in which the number of NeuN-positives neurons in the handled group at 11-days-old was lower than that at 90 days of age.

Figure 4C shows the number of NeuN-positive neurons in the granular layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days of age. Two-way ANOVA showed a non significant main effect for handled [$F_{(1,20)}=3.16$]. There was a significant main effect for age [$F_{(1,20)}=13.35$]. There was significant interaction between handled X age [$F_{(1,20)}=12.56$], in which the number of NeuN-positives neurons in the handled group at 11 days of age was lower than that at 90 days.

—Insert Figures 3 and 4 here—

Discussion

Our results showed that the neonatal handling protocol changed the OB morphology both in males and females. Neonatal handling reduced the numerical density of mitral cells in 11-day-old males and this reduction was maintained at adulthood. However, in females, this intervention at the neonatal period promoted a reduction in mitral cells density only at 90 days of age.

Comparing the studied groups, when the total number of cells forming the mitral layer was analyzed, it was not found significant differences in males and females both at 11 and 90 days of age. However, when only the number of NeuN-positive neurons was analyzed, it could be verified that the handled group females at 11-days-old have more cells than at 90 days of age. The NeuN (Neuronal specific nuclear protein) is a regulatory molecule directly involved in the neuronal differentiation, being used in studies of nervous system development (Mullen, Buck, & Smith, 1992). NeuN does not stain immature nervous cells, unless they reach a development phase similar to a mature cell as to its function. Thus, it is an important marker of cellular tissue maturation (Sarnat, Nochlin, & Born, 1998). These results show that although there were not alterations in the total number of cells of this layer, it occurs a reduction in the number of mature neurons.

Our results also show that 11- and 90-day-old neonatal handled males present a reduction in the numerical density of cells at the glomerular layer, but the number of NeuN-positive neurons is not altered. Yet, in females, neonatal handling reduced the numerical density of cells and the number of NeuN-positive neurons in this layer, only at 90 days of age.

Granular layer is another layer compositing OB. In this layer, interneurons, responsible for the mitral cells regulation, are found. Male handled rats, at both ages,

presented a reduction in the numerical cell density in this layer, but the handled females only presented a reduction of NeuN-positive neurons at 90 days of age. It was also observed that handling impedes the normal development of OB, since handled female rats, at adulthood, present the same number of cells in the granular layer as at 11 days old. Then, it can be suggested that handling impeded neurogenesis.

The results obtained in this study are inedit, and literature is scarce as to the OB morphological studies. Furthermore, few studies report structural and ultrastructural aspects of the neonatal handling impact on males CNS. Previous studies (Camozzato *et al.*, 2009; Lucion, Pereira, Winkelman, Sanvitto, & Anselmo-Franci, 2003; Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007) have shown that in female neonatal handling reduces the number of cells in the praventricular and supraoptic nucleus of hypothalamus and medial preoptic area both at 11 and at 90 days of age. Another area affected by neonatal handling is the LC. Males and females handled during the neonatal period show a reduction in the number of cells in the LC 11, 26, 35 and 90 days of age (Lucion *et al.*, 2003).

LC neurons are the main producers of NA of CNS and have NA efferences to OB (Sullivan, Stackenwalt, Nasr, Lemon, & Wilson, 2000). This process induces neural plasticity of the OB, so the NA has great importance for olfactory learning (Sullivan *et al.*, 1989). The release of NA in OB is necessary for the maintenance of the responses of mitral cells to acquire a preference for the odor (Wilson & Sullivan, 1991). In rats, the activity of β -adrenergic receptors of OB occurs in the first weeks of life (Woo & Leon, 1995) and studies show its relationship to preference by odor (Sullivan *et al.*, 2000). Activation of β -adrenergic receptors promotes change in the CREB transcription factor (protein binding to the cAMP response element).

Rangel & Leon, 1995 demonstrated that tactile stimulation with a brush in the neonatal period induces an increase in electrical activity of LC and promotes increased release of NA in OB. Unlike tactile stimulation with a brush, IN neonatal handling Reduced NA activity in the OB at 7 days of age of both male and female pups, as determined by the decreased MHPG levels and MHPG/NA ratio (Rainekei *et al.* 2009). The study developed by (Mandairon, Jourdan, & Didier, 2003) shows that noradrenergic neurons losses of LC may contribute to structural and functional alterations of OB. The NA has been shown to be a positive regulator of neurogenesis on the OB (Veyrac, Didier, Colpaert, Jourdan, & Marien, 2005). Veyrac *et al.*, 2008 suggest that NA exerts its neuroprotective effect also on adult-born neurons in the OB specifically through α_2 -adrenoreceptor. The LC noradrenergic system promoting survival of neurons in areas of the brain where neurogenesis persists in the adult. Veyrac *et al.* (2005) found that NA release in the OB was significantly increased by intraperitoneal injections of the selective α_2 -adrenoreceptor antagonist and reduced neuronal death, glial activation and cell proliferation. Taking into account that neonatal handling reduces the LC cell number and consequently the NA release in OB, it can be inferred that these factors may contribute to the decrease in the number of the OB mitral cells, this way reducing the neuronal survival, as it is shown in our results.

Another factor to be considered that may be involved with the reduction of the number of cells in OB is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). It is involved in the neuronal plasticity from development to neuronal survival, and in maintaining structural and functional changes that occur in the CNS during olfactory learning. BDNF is a protein whose transcription is increased during the olfactory learning and CREB is a transcription factor for BDNF (Zimmerberg, Foote, & Van Kempen, 2009).

Works developed in our laboratory (not published results) show that neonatal handling cause increase in the levels of BDNF in the OB in males.

Na interesting aspect observed in relation to nonhandled group is that males show a reduction in the numerical density of mitral cells in adulthood, unlike the nonhandled females, which present an increase of these cells. These results suggest that cellular proliferation can have occurred in OB of adult nonhandled females. BO is one of the few structures of mammals NS in which neurogenesis occur.

Neurogenesis in adults may represent na adaptation in response to changes imposed by the environment, by the internal status of the animal, circulating hormone levels and estrous cycle phase (Gheusi & Lledo, 2007). It is well established in literature (Carleton *et al.*, 2002) that progenitor cells are originated in the ventricular and subventricular zone of the forebrain and migrate to OB. Progenitors can be functionally modulated and likely contribute to structural plasticity in the OB (Veyrac *et al.*, 2005) .

In short, this study shows that neonatal handling alters the morphology of the OB, reducing the number of cells in the glomerular and mitral layers and prevents the expected growth of mature neurons in these layers. Thus we can conclude that neonatal manipulation acts both in OB cell death and neurogenesis. Together, these factors may account for the behavioral changes observed in adulthood of animals which suffered neonatal handling.

Acknowledgements

The authors would like to thank Rosalva Teresa Meurer, Keli Cristine Reiter and Teresinha Stein by the technical support in performing the immunohistochemistry technique. This study received financial support from CNPq, FAPESP and FAPERGS.

References

- Camozzato, T. S. C., Winkelmann-Duarte, E. C., Padilha, C. B., Miguel, S. P. R., Bonzanini, L., Anselmo-Franci, J. A., Fernandes, M. C., & Lucion, A. B. (2009). Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. *Brain Research*, 1247, 92-99.
- Carleton, A., Rochefort, C., Morante-Oria, J., Desmaisons, D., Vincent, J.-D., Gheusi, G., & Lledo, P.-M. (2002). Making scents of olfactory neurogenesis. *Journal of Physiology-Paris*, 96(1-2), 115-122.
- Ciombor, K. J., Ennis, M., & Shipley, M. T. (1999). Norepinephrine increases rat mitral cell excitatory responses to weak olfactory nerve input via alpha-1 receptors in vitro. *Neuroscience*, 90(2), 595-606.
- de Azevedo, M. S., de Souza, F. L., Donadio, M. V. F., Lucion, A. B., & Giovenardi, M. (2010). Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 73-78.
- Fenoglio, K. A., Brunson, K. L., & Baram, T. Z. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Frontiers in neuroendocrinology*, 27(2), 180-192.
- Gheusi, G., & Lledo, P. M. (2007). Control of early events in olfactory processing by adult neurogenesis. *Chemical Senses*, 32(4), 397.
- Gomes, C. M., Frantz, P. J., Sanvitto, G. L., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (1999). Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1239-1242.

- Gomes, C. M., Rainecki, C., de Paula, P. R., Severino, G. S., Helena, C. V. V., Anselmo-Franci, J. A., Franci, C. R., Sanvitto, G. L., & Lucion, A. B. (2005). Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology*, 184(2), 435-445.
- Hess, J. L., Denenberg, V. H., Zarrow, M. X., & Pfeifer, W. D. (1969). Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. *Physiology and Behavior*, 4(1), 109-111.
- Howard, C. V., & Reed, M. G. (1998). *Unbiased Stereology*: Bios Scientific Publishers.
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, 950(1-2), 52-63.
- Landers, M. S., & Sullivan, R. M. (1999). Norepinephrine and associative conditioning in the neonatal rat somatosensory system. *Developmental Brain Research*, 114(2), 261-264.
- Levine, S. (1993). The Psychoendocrinology of Stressa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697(1), 61-69.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73(3), 255-260.
- Levine, S., Haltmeyer, G. C., Karas, G. G., & Denenberg, V. H. (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior*, 2(1), 55-59.

- Liu, Caldji, Sharma, Plotsky, & Meaney. (2000). Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(1), 5-12.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659.
- Lucion, A. B., Pereira, F. M., Winkelman, E. C., Sanvitto, G. L., & Anselmo-Franci, J. A. (2003). Neonatal Handling Reduces the Number of Cells in the Locus Coeruleus of Rats* 1. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 894-903.
- Macrì, S., Granstrem, O., Shumilina, M., Antunes Gomes dos Santos, F. J., Berry, A., Saso, L., & Laviola, G. (2009). Resilience and vulnerability are dose-dependently related to neonatal stressors in mice. *Hormones and Behavior*, 56(4), 391-398.
- Macrì, S., & Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, 50(5), 667-680.
- Madruga, C., Xavier, L. L., Achaval, M., Sanvitto, G. L., & Lucion, A. B. (2006). Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 241-246.
- Mandairon, N., Jourdan, F., & Didier, A. (2003). Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience*, 119(2), 507-516.

- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(4), 469-486.
- Meaney, M., Aitken, D., Van Berkel, C., Bhatnagar, S., & Sapolsky, R. (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*, 239(4841), 766.
- Meaney, M. J., Bhatnagar, S., Larocque, S., McCormick, C., Shanks, N., Sharma, S., Smythe, J., Viau, V., & Plotsky, P. M. (1993). Individual Differences in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Response and the Hypothalamic CRF Systema. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697(1), 70-85.
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C. H., Sharma, S., Seckl, J. R., & Plotsky, P. M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience*, 18(1-2), 49.
- Meerlo, Horvath, Nagy, Bohus, & Koolhaas. (1999). The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(12), 925-933.
- Moore, C. L., Jordan, L., & Wong, L. (1997). Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. *Physiology & Behavior*, 60(5), 1361-1367.
- Moriceau, S., & Sullivan, R. M. (2004). Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning. *The Journal of Neuroscience*, 24(5), 1182-1189.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201.

- Núñez, J. F., Ferré, P., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (1996). Effects of Postnatal Handling of Rats on Emotional, HPA-Axis, and Prolactin Reactivity to Novelty and Conflict. *Physiology & Behavior*, 60(5), 1355-1359.
- Padoin, M. J., Cadore, L. P., Gomes, C. M., Barros, H. M. T., & Lucion, A. B. (2001). Long-Lasting Effects of Neonatal Stimulation on the Behavior of Rats. *Behavioral Neuroscience*, 115(6), 1332-1340.
- Papaioannou, A., Dafni, U., Alikaridis, F., Bolaris, S., & Stylianopoulou, F. (2002). Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience*, 114(1), 195-206.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press
- Poeggel, G., Helmeke, C., Abraham, A., Schwabe, T., Friedrich, P., & Braun, K. (2003). Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16137.
- Raineki, C., De Souza, M. A., Szawka, R. E., Lutz, M. L., De Vasconcellos, L. F. T., Sanvitto, G. L., Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., & Lucion, A. B. (2009). Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 159(1), 31-38.
- Rangel, S., & Leon, M. (1995). Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Developmental Brain Research*, 85(2), 187-191.
- Sanchez-Andrade, G., & Kendrick, K. M. (2009). The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural Brain Research*, 200(2), 323-335.

- Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain and Development*, 20(2), 88-94.
- Severino, G. S., Fossati, I. A. M., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan, L., Sanvitto, G. L., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (2004). Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior*, 81(3), 489-498.
- Slotnick, B. M., & Hersch, S. (1980). A stereotaxic atlas of the rat olfactory system* 1. *Brain Research Bulletin*, 5, 1-55.
- Sullivan, R. M., Stackenwalt, G., Nasr, F., Lemon, C., & Wilson, D. A. (2000). Association of an odor with an activation of olfactory bulb noradrenergic - receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(5), 957.
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., & Leon, M. (1989). Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *The Journal of Neuroscience*, 9(11), 3998.
- Todeschin, A. S., Winkelmann-Duarte, E. C., Jacob, M. H. V., Aranda, B. C. C., Jacobs, S., Fernandes, M. C., Ribeiro, M. F. M., Sanvitto, G. L., & Lucion, A. B. (2009). Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Hormones and Behavior*, 56(1), 93-100.

- Van Oers, H. J., De Kloet, E. R., & Levine, S. (1999). Persistent Effects of Maternal Deprivation on HPA Regulation Can Be Reversed By Feeding and Stroking, But Not By Dexamethasone. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(8), 581-588.
- Veyrac, A., Didier, A., Colpaert, F., Jourdan, F., & Marien, M. (2005). Activation of noradrenergic transmission by [alpha]2-adrenoceptor antagonists counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. *Experimental Neurology*, 194(2), 444-456.
- Veyrac, A., Sacquet, J., Nguyen, V., Marien, M., Jourdan, F., & Didier, A. (2008). Novelty Determines the Effects of Olfactory Enrichment on Memory and Neurogenesis Through Noradrenergic Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 34(3), 786-795.
- Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (1991). Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward: II. Norepinephrine mediates a specific component of the bulb response to reward. *Behavioral Neuroscience*, 105(6), 843.
- Winkelmann-Duarte, E. C., Todeschin, A. S., Fernandes, M. C., Bittencourt, L. C., Pereira, G. A. M., Samios, V. N., Schuh, A. F. S., Achaval, M. E., Xavier, L. L., & Sanvitto, G. L. (2007). Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research*, 1170, 20-30.
- Woo, C. C., & Leon, M. (1995). Early olfactory enrichment and deprivation both decrease adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 360(4), 634-642.
- Zimmerberg, B., Foote, H. E., & Van Kempen, T. A. (2009). Olfactory association learning and brain-derived neurotrophic factor in an animal model of early deprivation. *Developmental Psychobiology*, 51(4), 333-344.

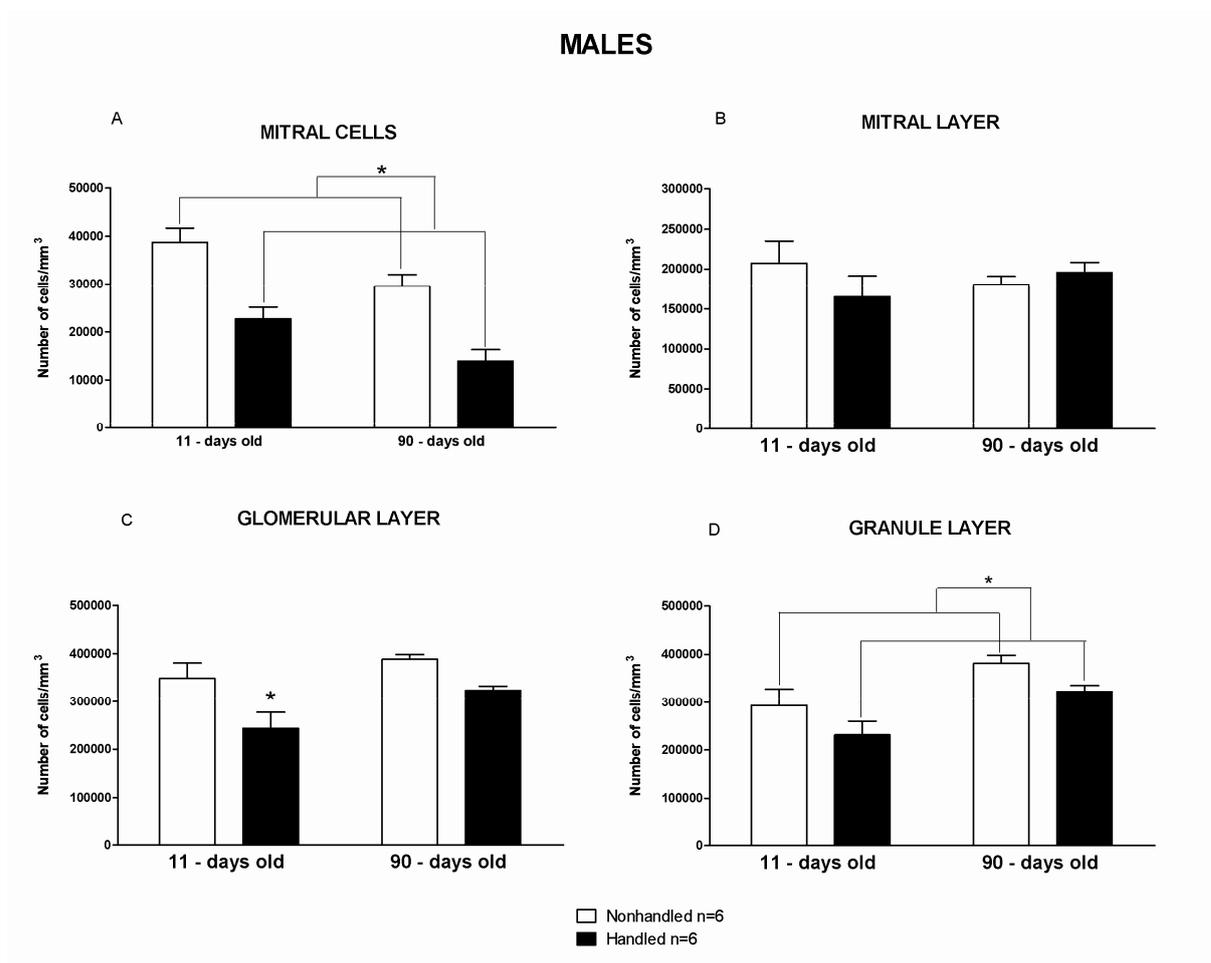


Figure 1 - Effects of neonatal handling of the numerical density (number of cells per mm²) on the (a) mitral cells (b) mitral layer (c) glomerular layer (d) granular layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days of age. The estimated number of cells is reported as mean (\pm SEM). The number of animals was 6 each group. Two-way ANOVA was used, followed by the Bonferroni post hoc test. *Indicates significant main effect for group (NH versus H). # Indicates significant main effect for age (11 days old versus 90 days old). $p < 0.05$.

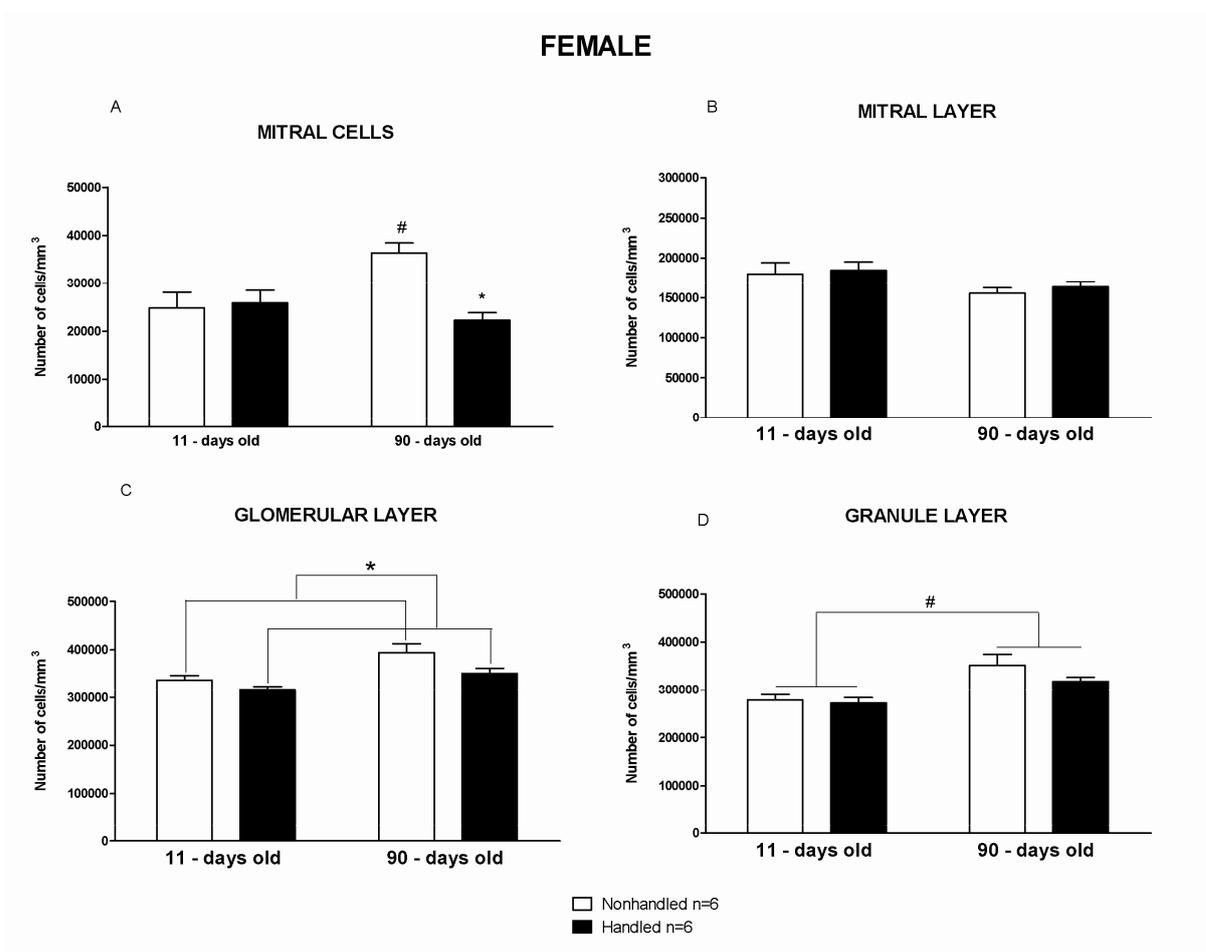


Figure 2 - Effects of neonatal handling of the numerical density (number of cells per mm²) on the (a) mitral cells (b) mitral layer (c) glomerular layer (d) granular layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days of age. The estimated number of cells is reported as mean (\pm SEM). The number of animals was 6 each group. Two-way ANOVA was used, followed by the Bonferroni post hoc test. *Indicates significant main effect for group (NH versus H). # Indicates significant main effect for age (11 days old versus 90 days old). $p < 0.05$.

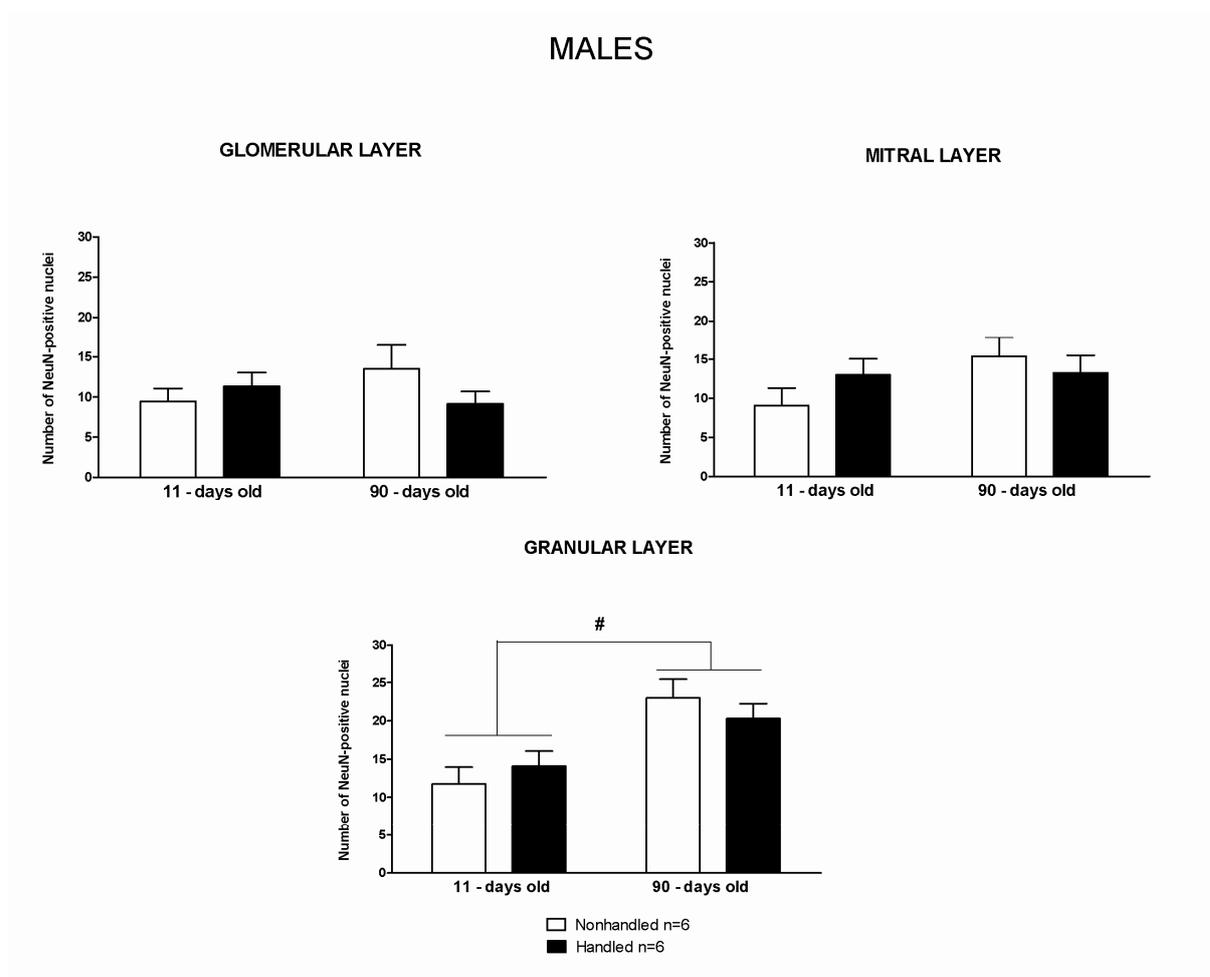


Figure 3 - Effects of neonatal handling of the number of NeuN-positive neurons on the (a) mitral layer (b) glomerular layer (c) granular layer of the olfactory bulb of male rats at 11 and 90 days old. The estimated number of cells is reported as mean (\pm SEM). The number of animals was 6 each group. Two-way ANOVA was used, followed by the Bonferroni post hoc test. *Indicates significant main effect for group (NH versus H). #Indicates significant main effect for age (11 days old versus 90 days old). $p < 0.05$.

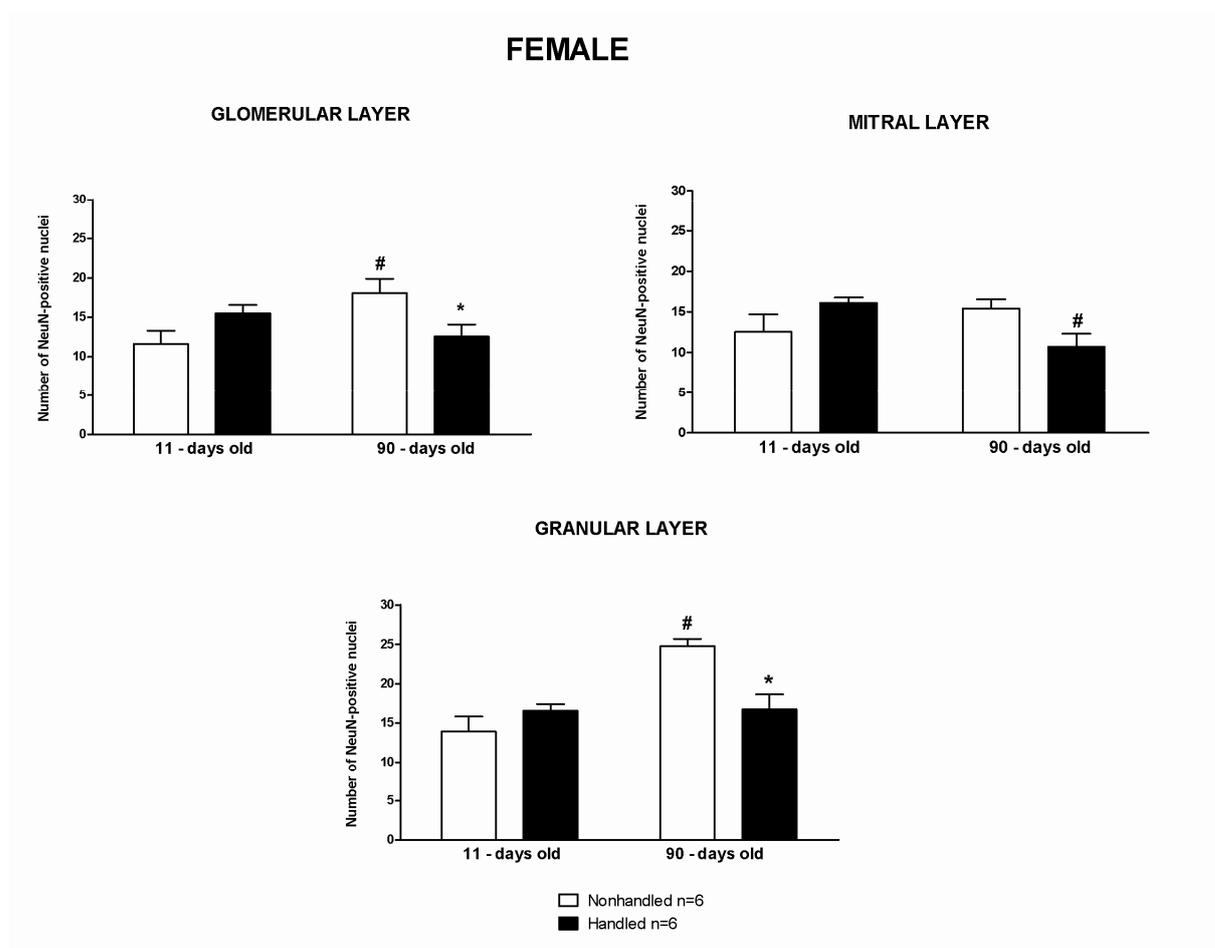


Figure 4 - Effects of neonatal handling of the number of NeuN-positive neurons on the (a) mitral layer (b) glomerular layer (c) granular layer of the olfactory bulb of female rats at 11 and 90 days old. The estimated number of cells is reported as mean (\pm SEM). The number of animals was 6 each group. Two-way ANOVA was used, followed by the Bonferroni post hoc test. *Indicates significant main effect for group (NH versus H). #Indicates significant main effect for age (11 days old versus 90 days old). $p < 0.05$.