

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

**EFEITOS NEUROENDÓCRINOS DA INTERAÇÃO  
ENTRE HORMÔNIOS SEXUAIS E MANIPULAÇÃO NEONATAL  
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS**

**ISABEL AMARAL MARTINS**

**ORIENTADOR:  
Dr. ALDO BOLTEN LUCION**

PORTO ALEGRE

2005

ISABEL AMARAL MARTINS

**EFEITOS NEUROENDÓCRINOS DA INTERAÇÃO ENTRE  
HORMÔNIOS SEXUAIS E MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE  
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas:  
Neurociências, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, como requisito  
parcial à obtenção do grau de doutor.  
Orientador: Dr. Aldo Bolten Lucion**

PORTO ALEGRE

2005

Dedico este trabalho àqueles que me admiram como sou...  
e, por isso mesmo, me inspiram a ser cada vez melhor:  
todas as lindas e preciosas “partes de mim”,  
que compartilham comigo o Bem Maior:  
AMOR...  
... a Única Certeza da Vida...

*“Eu respeito o lugar em você em que reside todo o Universo...  
Eu respeito o lugar em você em que, quando você está nesse lugar em você,  
e eu estou nesse lugar em mim,  
Nós somos UM SÓ...”*

*... Namaste!*

“A existência não é um problema que precisa ser solucionado, mas sim um mistério a ser vivido... Nunca deixe de se maravilhar, se quiser que os mistérios se desvendem pra você.” (Osho)

“Se for preciso um nome, maravilha designa ambos;  
De maravilha a maravilha,  
A existência se manifesta.”  
(Lao Tzu)

“Se o significado da vida deve ser descoberto,  
está intrínseco em cada fase, quando  
assumimos o desafio de realizar cada momento,  
enquanto o vivemos.”  
(Leo Buscaglia)

“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus, ao mar, o perigo e o abismo deu,  
Mas foi nele que espelhou o céu.”  
(Fernando Pessoa)

*Traduzir-se...*

“Uma parte de mim é todo mundo,  
Outra parte ninguém, fundo sem fundo...  
Uma parte de mim é multidão,  
Outra parte estranheza e solidão...  
Uma parte de mim pesa e pondera,  
Outra parte delira...  
Uma parte de mim almoça e janta,  
Outra parte se espanta...  
Uma parte de mim é permanente...  
Outra parte se sabe... de repente...  
Uma parte de mim é só vertigem,  
Outra parte linguagem...  
Traduzir uma parte...  
na outra parte...  
Que é uma questão de vida ou morte...  
Será arte...  
Será arte...”  
(Ferreira Gullar/ Adriana Calcanhotto)

A vida é esse contínuo testar de hipóteses, que nos leva quase sempre a conclusões preliminares... as quais geram, por sua vez, muitas e muitas perspectivas... Enquanto vivo... eu crio e recrio a mim mesma...

## AGRADEÇO

*... aos que partilharam e partilham comigo suas próprias Vidas... momentos... épocas... emoções... sonhos... anseios... alegrias... tristezas... desafios... descobertas... perdas... conquistas...*

*... que trilharam junto comigo, muitas vezes no escuro, e iluminaram meu caminho... me aqueceram o coração... ao dedicarem, sem receios, o que possuem de mais precioso, seus próprios corações...*

*... àqueles que me conhecem... e tantas vezes me entendem muito mais do que eu mesma poderia entender... que me ensinam tanto, me desafiam a ultrapassar obstáculos, a superar minhas falhas, assim como me fazem descobrir e me incentivam a cultivar minhas virtudes... Aqueles que me inspiram com seus exemplos... que possuem o dom inestimável de tornar a minha Vida simplesmente Encantadora...*

*... Preciosas "partes de mim" que desvendam comigo os "Simples Segredos da Vida"... quem já fez, quem faz, e muito aos que, **por Toda a Minha Vida** farão... meu "Coração Vibrar" por experimentar, na plenitude do UNO em **sintonia** com seus VERSOS, o **Sublime AMOR**...*

### **... EU AMO VOCÊS...**

*... Vocês são Amor para mim... eternos, atemporais, infinitos, inestimáveis, incomparáveis e insubstituíveis... Sem vocês, nada sou... Com vocês, por vocês, Sou Tudo... Obrigada!!!*

*... Amor de Minha Vida, Alessa Rangel... só por Amor se Vive... e se ReVive... Sempre!!!*

*... Meus pais, Jurema e Adão; minhas irmãs, Sylvia, Alice e Stella...*

*... Zé, Bina, Lela, Gabi P., Clarice, Márcia R. G., Katya, Ana Cristina, Carol, Lisi, Clauzita, Rita, Tati, Márcia B., Márcia G., Cármen, Charlis, Anelise, Ana Lúcia, Fernando, Zana, Jana, Xico, Cíntia... enfim, partes de mim... e a todos mais que me guardam em seus corações...*

*... Grandes mestres, meus modelos... iluminados guias em meus caminhos... exemplos de entusiasmo, respeito pela vida, competência, dedicação e empenho pela busca contínua por crescimento... Obrigada:*

*... Minha Mãe, Alessa, Elaine, Rosana, Lígia, Célia S., Nicola, Ana Loch, Ana Merck, Sírio Velasco, Ricardo T. de Souza, Ana Baisch, Ricardo Robaldo, Euclides Santos F., Katya V. Rigatto, Gabriela Pereira, Cíntia Freitas, Elisa Winkelmann-Duarte, Márcia Koja B., Márcia Giovenardi, Matilde Achaval E., Carlos Alexandre Neto (Alex), Jorge A. Quilfeldt, Carla Dalmaz, Ivan Izquierdo, Gilberto Sanvitto, Alberto A. Rasia-Filho, Janete A. Franci, Celso R. Franci... entre outros... Meus orientadores anteriores: Robert Betito, Mara Perazzolo, Mário C. Figueiredo, Adalto Bianchini... Meu orientador, no mestrado e no doutorado: Aldo B. Lucion.*

*Agradeço à Sabrina Bronzatto (Bina) e ao Luciano Trevizan, pela dedicação no desenvolvimento desta pesquisa. E, Bina, tua amizade é um dos presentes mais preciosos pra mim, que a vida me trouxe durante o doutorado, e que amo e desejo partilhar contigo a vida toda... Beijo para ti e para o amado Kelvin... Obrigada, partes de mim!!!*

*À Clarice Sandi Madruga, outra maravilha encontrada nesse caminho, uma “alma-gêmea”, amiga grande modelo para mim, que estará para sempre em meu coração.*

*À Márcia Koja Breijeiron, amiga, um anjo, meu “socorro” a qualquer hora! Obrigada, minha querida, por estares sempre de prontidão e de braços abertos!*

*Agradeço à Sônia Zanon, Maristela Poletini, Gelson Genaro e Ariana Fernandes, pelo grande auxílio na realização dos ensaios para as dosagens de todos os hormônios.*

*Agradeço também aos meus colegas, amigos e alunos da ULBRA, por todo seu apoio e motivação, que foram e são muito especiais pra mim, em aspectos que ultrapassam medidas...*

*Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela confiança, pelo apoio e pela paciência! Agradeço à Andrea, secretária do Pós em Neurociências, por toda a atenção, cuidado e apoio dedicados a mim. Agradeço à CAPES e à Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), pelo auxílio.*

*Agradeço a todos os animais que, involuntariamente e em essência, participaram dos processos inerentes a essa “incessante” busca por satisfação da curiosidade humana pelos grandes “mistérios da vida”...*

## RESUMO

Influências de secreções endógenas e estímulos ambientais durante o período neonatal parecem ser determinantes para programar a atividade neuroendócrina e comportamental na vida adulta. O propósito do presente trabalho foi estudar a interação entre os hormônios gonadais e a manipulação durante o período neonatal sobre a concentração plasmática de corticosterona, gonadotrofinas (hormônios luteinizante e folículo estimulante), e hormônios gonadais (estradiol, progesterona e testosterona) em ratos adultos machos e fêmeas. Para alguns grupos experimentais, filhotes de ratos Wistar foram gonadectomizados, ou submetidos à cirurgia fictícia, antes de 6 horas após o nascimento, ou foram mantidos sem cirurgia. Metade destes animais foram estimulados diariamente, ou foram mantidos sem a manipulação neonatal, durante os primeiros 10 dias de vida. Para outros grupos experimentais, machos foram manipulados diariamente durante o período dos 10 primeiros e gonadectomizados aos 80 dias de vida. Somente a manipulação neonatal não provocou diferenças na concentração plasmática de corticosterona e gonadotrofinas, tanto em machos quanto em fêmeas, mas reduziu a secreção de hormônios gonadais em fêmeas. Enquanto a manipulação em fêmeas gonadectomizadas logo após o nascimento induziu um menor aumento na resposta de corticosterona comparada com às fêmeas não-manipuladas, em machos, a ausência de hormônios gonadais aboliu a redução da resposta ao estresse induzida pela gonadectomia neonatal no grupo não-manipulado. A manipulação aumentou a responsividade do feedback negativo para as gonadotrofinas em machos e fêmeas gonadectomizados no período neonatal. Mas a gonadectomia na idade adulta, em ratos machos manipulados no período neonatal induziu a um menor aumento no LH, comparado aos machos não-manipulados. Deve-se considerar que a castração realizada logo após o nascimento provoca a ausência dos hormônios gonadais durante todo o restante da vida do animal. Em fêmeas, a estimulação ambiental atuou sobre um sistema que não estava sob a influência dos hormônios gonadais. Mas em machos, além dos efeitos pré-natais dos esteróides gonadais, uma interação entre a estimulação neonatal e os efeitos destes hormônios durante o período neonatal provavelmente ocorreu. A estimulação ambiental durante o período neonatal e os hormônios gonadais interagem exercendo um profundo impacto a longo-prazo sobre a atividade do sistema de estresse hipotálamo-hipófise-adrenais e também sobre os mecanismos de controle neuroendócrino do sistema reprodutivo na vida adulta.

Palavras: estresse, manipulação neonatal, gonadectomia, ratos machos e fêmeas, corticosterona, LH, FSH.

## ABSTRACT

Endogenous hormones and environmental stimuli during the neonatal period appear to be determinant to program the behavioral and neuroendocrine profile in adult life. The purpose of the present study was to analyze the interaction between gonadal hormones and handling stimulation during the neonatal period on plasma corticosterone, gonadotrophins (luteinizing and follicle stimulating hormones), and gonadal hormones (estradiol, progesterone and testosterone) in adult male and female rats. For experimental groups, newborn Wistar pups were gonadectomized, or submitted to sham surgery or kept without surgery, at up to 6 hours after delivery. These pups were or stimulated daily by experimental handling, or kept without handling, during the first 10 postnatal days. For another experimental groups, males were stimulated daily on neonatal period (until 10 postnatal days) and gonadectomized at 80 days. Only neonatal handling shows no differences on plasma corticosterone and gonadotrophins, both in male or female rats, but reduced gonadal hormones in female rats. While handling in neonatal gonadectomized females induced a lesser increase in corticosterone response compared with the non-handled ones, in males, the absence of the gonadal hormones abolished the reduction of the stress response induced by neonatal gonadectomy in the non-handled group. Handling increased the negative feedback responsiveness to gonadotrophins of neonatal gonadectomized male and female rats. But, adult gonadectomy of neonatal handled males induced a lesser increase in LH compared with the non-handled ones. It is noteworthy that those castration performed just after birth, provoked the absence of the hormones occurred throughout the life of the animal. In females, early life environmental stimulation occurred upon a nervous system that has not been under the influence of gonadal hormones. In males, besides pre-natal effects of gonadal steroids, an interaction between environmental stimulation and hormonal effects during the neonatal period probably occurred. Environmental stimulation during the neonatal period and gonadal hormones interact and exert a profound long-lasting impact on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress system and also on the reproductive neuroendocrine control mechanisms in adulthood.

Key words: stress, neonatal handling, gonadectomy, male, female rats, corticosterone, LH, FSH

# SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b> .....	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xii</b>
<b><i>Introdução</i></b> .....	<b>01</b>
O Eixo Endócrino Hipotálamo-Hipófise-Gônadas .....	<b>02</b>
O Eixo Endócrino Hipotálamo-Hipófise-Adrenais .....	<b>09</b>
<b><i>Hipótese</i></b> .....	<b>15</b>
<b><i>Objetivos Gerais</i></b> .....	<b>16</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b><i>Material e Métodos</i></b>	
Animais e Grupos Experimentais .....	<b>19</b>
Especificação dos Grupos .....	<b>20</b>
Especificação dos Procedimentos	
Manipulação Neonatal .....	<b>22</b>
Gonadectomia (Ovariectomia e Orquidectomia) Neonatal .....	<b>23</b>
Gonadectomia e Cirurgia Fictícia em Ratos Adultos .....	<b>24</b>
Verificação do Ciclo Estral .....	<b>24</b>
Coleta de sangue e radioimunoensaio	
Corticosterona .....	<b>25</b>
Hormônios sexuais - LH, FSH e hormônios gonadais .....	<b>25</b>
Confirmação do Sucesso das Cirurgias de Castração.....	<b>26</b>

Seqüência Experimental Básica	
Experimento 1 .....	32
Experimento 2 .....	34
Experimento 3 .....	36
Análise Estatística .....	38
<b>Resultados</b> .....	<b>40</b>
Experimento 1 (Manipulação neonatal & Fases do ciclo)	
Experimento 1.a (Corticosterona) .....	40
Experimento 1.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais) .....	42
Experimento 2 (Manipulação & Castração Neonatal)	
Experimento 2.a (Corticosterona) .....	51
Experimento 2.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais).....	55
Experimento 3 (Manipulação Neonatal & Castração em Idade Adulta)	
Experimento 3.a (Corticosterona).....	61
Experimento 3.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais) .....	63
<b>Discussão</b> .....	<b>66</b>
Experimento 1 (Manipulação neonatal & Fases do ciclo)	
Experimento 1.a (Corticosterona).....	67
Experimento 1.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais) .....	71
Experimento 2 (Manipulação & Castração Neonatal)	
Experimento 2.a (Corticosterona).....	73
Experimento 2.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais) .....	77
Experimento 3 (Manipulação Neonatal & Castração em Idade Adulta)	
Experimento 3.a (Corticosterona).....	80
Experimento 3.b (Gonadotrofinas e hormônios gonadais) .....	82
Discussão Geral - Interações entre Manipulação e Gonadectomia .....	84

<b>Conclusões</b> .....	<b>86</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>89</b>
<b>Algumas Perspectivas</b> .....	<b>101</b>
<b>Anexo - Artigo</b> .....	<b>102</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo Experimental de Manipulação Neonatal (A); Esquema dos grupos básicos de manipulação neonatal (B).....	27
<b>Figura 2.</b> Ratos Wistar. Filhotes gonadectomizados logo após o nascimento (antes de 6 horas vida): macho (A.1); fêmea (A.2). Adultos gonadectomizados ou submetidos à cirurgia fictícia logo após o nascimento: machos da mesma ninhada (B.1); fêmeas da mesma ninhada (B.2).....	28
<b>Figura 3.</b> Esquemas de grupos básicos do experimento 1. Grupos de ratos machos (A); Grupos de fêmeas (B).....	29
<b>Figura 4.</b> Esquemas de grupos básicos do Experimento 2. Grupos de ratos machos (A); Grupos de fêmeas (B).....	30
<b>Figura 5.</b> Esquema de grupos básicos do Experimento 3. Grupos de ratos machos.....	31
<b>Figura 6.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C).....	41
<b>Figura 7.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de LH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C).....	43
<b>Figura 8.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de FSH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C).....	45
<b>Figura 9.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Estradiol (pg/ml) (A) e de Progesterona (ng/ml) (B) em ratas adultas em diestro ou em estro.....	47

<b>Figura 10.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Prolactina (ng/ml) em ratas adultas em diestro ou em estro.....	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Testosterona (ng/ml) (A) e de Prolactina (ng/ml) (B) em ratos machos adultos.....	<b>50</b>
<b>Figura 12.</b> Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e da castração antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratas adultas.....	<b>52</b>
<b>Figura 13.</b> Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos adultos.....	<b>54</b>
<b>Figura 14.</b> Efeito da interação entre castração manipulação neonatal (1 min/ dia durante 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 h após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de LH(ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas (B).....	<b>56</b>
<b>Figura 15.</b> Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 min/dia durante 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de FSH(ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas (B) .....	<b>58</b>
<b>Figura 16.</b> Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos machos.....	<b>62</b>
<b>Figura 17.</b> Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática basal de hormônio luteinizante - LH (ng/ml) (A) e de hormônio folículo estimulante - FSH (ng/ml) (B) em ratos machos.....	<b>64</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resumo da seqüência temporal dos experimentos.....	<b>37</b>
<b>Tabela 2.</b> Efeito da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de Estradiol (E <sub>2</sub> ) (pg/ml) e Progesterona (P) (ng/ml) em ratas fêmeas adultas.....	<b>59</b>
<b>Tabela 3.</b> Efeitos da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de Testosterona (T) (ng/ml) em ratos machos adultos.....	<b>60</b>
<b>Tabela 4.</b> Efeitos da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia após a puberdade (aos 80 dias de idade) sobre a concentração plasmática basal de Testosterona (T) (ng/ml) em ratos machos de 120 dias de vida.....	<b>65</b>

## INTRODUÇÃO

O período neonatal de algumas espécies caracteriza-se por intensas transformações no sistema nervoso (Berreby et al., 1988; Denenberg et al., 1991; Becú-Villallobos et al., 1997; Fitch and Denenberg, 1998). Durante esse período, o sistema nervoso ainda está se diferenciando, e essa diferenciação é sensível à influência tanto de fatores internos quanto de fatores ambientais (Levine, 1994). Considerando-se fatores internos, vários sistemas e eixos funcionais estão se desenvolvendo, dentre esses o eixo *hipotalâmico-hipofisário* (Levine & Alpert, 1959; McCormick et al, 1998) e sua interação, por exemplo, com as glândulas adrenais estabelecendo circuitos básicos para dinâmica de secreção de glicocorticóides, basais e em respostas a estresse (Ader et al., 1968), e com as gônadas, constituindo o dimorfismo sexual e as vias do sistema reprodutivo (McLusky & Naftolin, 1981; Breedlove, 1992; Cooke et al., 1998). Vários destes sistemas reguladores podem ter seu desenvolvimento modificado por estímulos apresentados pelo ambiente no período perinatal, e os efeitos dessas alterações podem ser observados a longo-prazo, sob a forma de modificações no comportamento, de diferenças em respostas neuroendócrinas, assim como em variações estruturais na vida adulta (Levine, 1962; Denenberg, 1964; Meaney, 1993; Plotsky & Meaney, 1993; Meerlo et al., 1999; Severino et al., 2004).

## **O Eixo Endócrino Hipotálamo-Hipófise-Gônadas:**

### **A Diferenciação e o Dimorfismo Sexual**

Algumas espécies sexualmente dimórficas apresentam repertórios básicos de comportamentos diferenciados de acordo com o gênero. Machos e fêmeas, revelam condutas distintas no que se refere não somente ao comportamento sexual, mas também em atitudes não relacionadas à reprodução. Isso ocorre devido à diferenciação sexual do sistema nervoso, responsável, em primeira instância pelos comportamentos (para uma revisão ver Pilgrim e Reisert, 1992).

Para alguns autores, o conceito de “diferenciação sexual do sistema nervoso”, pode distinguir uma fase “organizacional” de uma “ativacional” dos esteróides sexuais: a primeira é o período crítico durante o qual circuitos neurais específicos de cada sexo são determinados, e a segunda é quando, no adulto, esses hormônios são necessários para ativar aqueles circuitos (Kelly, 1991; Pilgrim & Reisert, 1992; McCormick et al., 1998).

Os hormônios sexuais são importantes responsáveis pela diferenciação sexual do sistema nervoso, exercendo efeitos determinantes tanto no plano estrutural e de neuroquímica de áreas e circuitos sexualmente dimórficos, quanto de comportamentos e de reações neuroendócrinas. Suas ações se iniciam ainda no período embrionário e fetal e se consolidam no período crítico pós-natal, ou neonatal, o qual pode variar de espécie para espécie, perdurando, em algumas, até o desmame. Essas alterações promovidas pelos hormônios gonadais são mantidas até a vida adulta, determinando características permanentes e específicas de cada sexo. (Pfeiffer, 1936; Götz & Dörner, 1976; Haseltine & Ohno, 1981; MacLusky & Naftolin, 1981; McEwen, 1981; Naftolin, 1981; Foy et al. 1984; Denenberg et al., 1991; Kelly, 1991; Pilgrim & Reisert, 1992; Roof & Havens, 1992; Gorski, 1993; Handa et al, 1994; Litteria, 1994; Fitch & Denenberg, 1998; Rasia-Filho et al., 1999).

Esses hormônios são esteróides produzidos predominantemente pelas gônadas, testículos e ovários, e uma pequena parte de andrógenos é sintetizada nas adrenais (mas essa não é suficiente para a diferenciação sexual), e atuam sobre a diferenciação do cérebro através da ligação a receptores específicos para testosterona, estrógeno e progesterona,

presentes em diversas regiões do sistema nervoso (Simerly et al., 1990; Kelly, 1991; Gorski, 1993; Fitch & Denenberg, 1998). Dentre essas regiões estão a amígdala medial (Rasia-Filho et al, 1999), a área pré-óptica medial (McCarthy et al, 1997), o corpo caloso, (Berreby et al, 1988; Denenberg et al, 1991), dentre outras.

Durante o período pré-natal, inicialmente, as gônadas tanto de machos quanto de fêmeas, são tecidos indiferenciados. A secreção dos hormônios sexuais depende de fatores genéticos, como no caso machos, o Fator determinante dos testículos (TDF), que é um conjunto de genes ligados ao cromossomo Y, e promove a diferenciação da gônada em testículo. Na ausência do cromossomo Y, e portanto, desses fatores, o desenvolvimento “padrão” da gônada é em ovário, o que ocorre com as fêmeas (Haseltine & Ohno, 1981; para uma revisão ver Kelly, 1991).

Em machos, a testosterona, o andrógeno predominante da secreção pelos testículos, ou é metabolizada até dihidrotestosterona (pela enzima 5 alfa- redutase), ou é em maior parte convertida em estradiol (por ação da enzima aromatase), o qual constitui o principal responsável pela masculinização do sistema nervoso, com ação sobre receptores amplamente distribuídos pelas células nervosas, e por diversas regiões do sistema nervoso, por exemplo a área pré-óptica, núcleos hipotalâmicos, amígdala, mesencéfalo, medula espinhal (Kelly, 1991; Simerly et al. 1990). Nas fêmeas, os ovários secretam o estrógeno e a progesterona (Freeman, 1994; Ganong citado por Nelson, 1995, p. 273).

A ação dos andrógenos, aromatizados ou não, sobre a diferenciação do sistema nervoso dos machos se inicia desde antes do nascimento. Em mamíferos placentários, o feto é continuamente exposto ao estrógeno transmitido via placenta e circulação maternal. Esse hormônio agiria de modo determinante sobre a diferenciação do cérebro de todos os fetos, mas estes são protegidos da ação do estrógeno circulante por um sistema de “binding”. Uma proteína ligadora de estrógeno (a alfa-fetoproteína), se liga e efetivamente “seqüestra” muito do estrógeno presente na circulação fetal e neonatal. O complexo formado é uma molécula muito grande, que não passa ao sistema nervoso, impedindo a ação do estrógeno sobre a diferenciação precoce do sistema nervoso. Essa proteína está presente até um certo período

após o nascimento, que em ratos pode chegar até em torno de 7 a 10 dias de vida (para uma revisão ver MacLusky & Naftolin, 1981).

No período fetal, os andrógenos aumentam nos ratos machos nos dias fetais 18 e 19, quando são significativamente maiores em machos do que em fêmeas. Nesse período, por volta do 18º dia gestacional, inicia-se a diferenciação do sistema nervoso dos machos, distinguindo-os das fêmeas (Weisz e Ward, 1980). Em outras fases do desenvolvimento fetal (dias 16, 17, 20 e 21), não há diferenças entre machos e fêmeas quanto ao conteúdo de andrógeno no corpo. Entre vários grupos de fetos fêmeas, de diversas posições na localização intra-uterina, não há diferença no conteúdo de andrógenos independente da maior ou menor proximidade dos machos (Baum et al., 1991). O conteúdo de andrógenos no corpo dos machos a 1 ou 3 horas após o nascimento é maior do que em fêmeas, mas imediatamente, 6, 12 e 24 horas após, não há diferenças entre ambos os sexos. O conteúdo de andrógeno testicular é significativamente elevado em 24 horas após o nascimento (Baum et al., 1988). Esses resultados sugerem que os andrógenos podem contribuir para a diferenciação sexual do sistema nervoso dos machos em um relativamente breve período durante a vida fetal, mas também estão presentes em alguns momentos após o nascimento. Becker e Iles, em 1985, encontraram um padrão de desenvolvimento para uma proteína ligadora de andrógeno (do inglês, *Androgen Binding Protein - ABP*), presente na circulação e nos tecidos dos fetos e ratos neonatos. A ABP plasmática de fetos machos e fêmeas está aumentada aos 18 dias, e diminui até o nascimento. No nascimento os níveis aumentam, e vão reduzindo continuamente durante o período neonatal. Comparando-se com os resultados anteriormente mostrados, isso pode sugerir que a ABP tenha a função de proteção contra excessivas concentrações de andrógenos livres durante o desenvolvimento dos fetos e neonatos.

Resultados de experimentos revelaram que a gonadectomia em ratos machos recém-nascidos pode levar à desmasculinização e feminilização de vários comportamentos do adulto, tanto na atividade sexual quanto em outras respostas comportamentais (Lucion et al, 1996; Rasia-Filho & Lucion, 1996), assim como da estrutura e morfologia de vários núcleos sexualmente dimórficos do sistema nervoso (Rasia-Filho et al, 1999; Fitch & Denenberg, 1998). A orquiectomia precoce também pode modificar reações neuroendócrinas,

promovendo liberação cíclica de hormônio luteinizante LH (para uma revisão, ver Becú-Villalobos et al, 1997), e resposta de retroalimentação positiva ao estrógeno, que depende da hora da castração no nascimento (Corbier, 1985). A ausência dos esteróides andrógenos no período crítico também leva a permanentes alterações no conteúdo de dopamina do sistema límbico no rato macho (Leret et al., 1987).

A maioria dos experimentos com manipulação hormonal neonatal em fêmeas envolve estudos de efeitos da injeção de hormônio sexual (testosterona ou estrógeno) no período crítico logo após o nascimento, em geral do primeiro ao quinto dia de vida. Esse procedimento pode levar a uma masculinização de áreas sexualmente dimórficas do sistema nervoso e desenvolve nessas fêmeas, quando adultas, uma fisiologia endócrina semelhante a dos machos, com liberação tônica de LH e perda da resposta ao estrógeno (para uma revisão, ver Becú-Villalobos et al, 1997), masculinizando também alguns comportamentos, inclusive melhorando o desempenho de memória espacial na tarefa de navegação, e o aprendizado no labirinto (Roof & Havens, 1992; Joseph et al, 1978; Para uma revisão ver Fitch & Denenberg, 1998).

Uma estrutura cortical sexualmente dimórfica envolvida nos processos de lateralização, o corpo caloso, é maior em ratos machos do que em ratas fêmeas (Berrebi et al., 1988; Denenberg et al., 1991). Algumas experiências precoces podem influenciar o desenvolvimento dessa estrutura, e um exemplo seria o efeito da manipulação neonatal aumentano a área do corpo caloso em ratos machos, mas não em fêmeas (Denenberg et al, 1991). Essa manipulação neonatal consiste em procedimentos diários que envolvem separar os filhotes da mãe, retirá-los do ninho, segurá-los na mão ou colocá-los em um recipiente (aquecido ou não), e aí mantê-los durante alguns minutos. Após esse período, os filhotes são devolvidos à mãe, no ninho (Denenberg, 1964; Levine et al, 1967; Hess et al. 1969). Essa manipulação neonatal, como o próprio nome sugere é realizada durante o período neonatal, que pode se estender até por volta da época do desmame (Sapolsky e Meaney, 1986; Levine, 1994). A injeção de hormônios masculinos em ratas fêmeas jovens que também foram diariamente manipuladas (separadas da mãe, retiradas do ninho, mantidas na mão do experimentador por 3 minutos e após devolvidas ao ninho, para a mãe), provoca efeitos de

masculinização sobre o desenvolvimento dessa estrutura, mas em fêmeas não-manipuladas, a testosterona não teve efeito (Denenberg et al., 1991). Esses resultados revelam que deve haver interação entre a manipulação neonatal e os efeitos dos hormônios sexuais sobre a diferenciação do sistema nervoso.

Até pouco tempo atrás, a diferenciação sexual do sistema nervoso era considerada resultante apenas da ação dos hormônios masculinos, que transformariam o sistema nervoso “indiferenciado” em um sistema nervoso masculinizado, e na ausência de tais hormônios, o desenvolvimento normal, ou padrão, seria o de um sistema nervoso feminino. Alguns estudos recentes sugerem possíveis influências dos hormônios sexuais femininos para a diferenciação do sistema nervoso central, não somente a partir dos processos de puberdade, mas também desde o final do período pós-natal, ainda que não no período intra-uterino ou pós-natal muito precoce (Leret et al., 1987; Litteria, 1994), e pré-púbere (Becú-Villalobos et al, 1997; Fitch & Denenberg, 1998).

Alguns resultados com castração de ratas fêmeas antes da puberdade e injeção de hormônios em diferentes períodos do desenvolvimento revelam também evidências para um período sensitivo mais tardio para a feminilização por secreções ovarianas do que comparado com a masculinização por andrógenos (Gorski, 1993; Fitch & Denenberg, 1998). A castração de ratas aos 12 dias de vida reduz, na idade adulta, a resposta do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona ao ambiente novo, e provoca aumento do tempo para retornar às concentrações basais (Fitch et al, 1992).

Muito poucos experimentos foram realizados com ovariectomia em ratas recém-nascidas (no primeiro dia de vida). Pfeiffer, em 1936, castrando machos e fêmeas no primeiro dia de vida e realizando transplantantes cruzados das gônadas, sugeriu que todos os ratos ao nascer são fisiologicamente fêmeas, mas são capazes de diferenciação em machos se os testículos estiverem presentes; o que foi verificado pelas mudanças permanentes na função reprodutiva e pela ausência de ciclo estral na fase adulta das fêmeas intactas ou castradas, com transplantes de testículos, enquanto transplantes de ovários em machos não-manipulados não provocaram efeitos na função reprodutiva. Mas, a castração em fêmeas no dia do nascimento promove alteração da morfologia do cerebelo, o que aponta para a

importância dos hormônios ovarianos na diferenciação do sistema nervoso feminino (Litteria, 1994).

O núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica medial (SDN-POA) é cerca de cinco a sete vezes maior em machos do que em fêmeas, e participa do desenvolvimento e expressão do comportamento sexual específico dos machos na vida adulta (McCarthy et al., 1997). McCarthy e colegas, em 1997, mostraram através da expressão de células Fos-imunorreativas, que o comportamento materno de lambem a região anogenital dos filhotes, durante o período neonatal, induz rápida ativação das células na área pré-óptica medial ventral de ratos machos e fêmeas. Há também uma maior incidência de morte celular no e ao redor do SDN-POA em fêmeas do que em machos durante o período neonatal, particularmente próximo ao final do período crítico sensitivo aos hormônios. E as ratas mães lambem com maior frequência os machos do que as fêmeas. Esses resultados sugerem que o comportamento da mãe pode ter influência determinante na diferenciação sexual do sistema nervoso do filhote.

Sob outro aspecto, existem interações entre a ciclicidade dos hormônios gonadais em fêmeas adultas e efeitos sobre aspectos comportamentais de memória e aprendizagem, que se diferenciam entre as diversas fases do ciclo estral. As diferentes fases do ciclo estral estão associadas com performances diferenciadas em várias tarefas de memória. Na memória espacial no labirinto aquático, as fêmeas apresentam melhor performance na fase de diestro, do que em estro (Frye, 1995). Na tarefa de memória de esquiva condicionada, as respostas também são facilitadas na fase de diestro, praticamente abolidas na fase de estro, e a ovariectomia melhora a performance, com resposta contrária em caso de reposição diária de benzoato de estradiol, sugerindo uma ação inibitória do estrógeno sobre esse comportamento (Diaz-Veliz et al, 1989, 1991). Em 1995, Constanzo e colaboradores mostraram que o estro produz uma retenção dependente de estado em ratas, que não é verificada no anestro, revelando outra influência das fases do ciclo estral sobre a memória. De modo geral, vários resultados indicam que a memória espacial em fêmeas é melhor quando o nível de estrógeno circulante é baixo, ou seja, principalmente na fase de diestro/anestro (Warren & Juraska, 1997), mas as respostas dependem da tarefa espacial

específica (Berry et al, 1997). Outros estudos revelam também que a LTP e a plasticidade sináptica variam com a fase do ciclo estral (Sfikakis et al, 1978; Warren et al, 1995). O estrógeno possui efeitos sobre a densidade e as propriedades sinápticas no hipocampo, e esses efeitos são influenciados pelo ciclo estral, de modo que o aumento nos níveis de estrógeno está diretamente relacionado ao aumento da densidade sináptica, e vice-versa (Wong & Moss, 1992; Woolley & McEwen, 1992).

A ovariectomia em ratas adultas têm efeitos sobre a memória (Diaz-Veliz et al, 1989, 1991, 1994, 1995; Mora et al, 1998), sobre a reação hormonal ao estresse (Ramaley, 1976; Viau & Meaney, 1991), sobre respostas comportamentais (Mora et al, 1996). Isso revela a importância dos hormônios ovarianos na manifestação das características sexualmente dimórficas depois da puberdade (Fitch & Denenberg, 1998).

Além de efeitos sobre comportamentos, a diferenciação sexual do cérebro leva a padrões diferenciados de respostas endócrinas, não só relativas ao aspecto reprodutivo, mas também de reações hormonais ao estresse. As secreções hormonais, cíclicas em fêmeas e tônicas em machos provocam mudanças estruturais e comportamentais específicas de cada sexo, que espelham as funções endócrinas (Naftolin, 1981).

Fêmeas em geral apresentam uma liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em resposta ao estresse mais robusta do que machos (Handa et al., 1994). A fase do ciclo estral em fêmeas também influencia a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), de modo a aumentar a sua sensibilidade ao estresse durante o proestro (Viau e Meaney, 1991). As reações ao estresse podem ser modificadas pela castração. A castração de ratos machos adultos aumenta a resposta de ACTH e de corticosterona a estressores físicos ou psicológicos (Handa et al., 1994; Bingaman et al., 1995), mas atenua a resposta de prolactina ao estresse (Bingaman et al., 1995). A castração em ratas fêmeas adultas reduz os níveis de corticosterona basais e em resposta ao estresse, assim como rompe o ritmo circadiano normal de liberação do hormônio (Ramaley, 1976). A ovariectomia em ratas pré-púberes também pode ter profundos efeitos deprimindo a reatividade do eixo HPA ao estresse na idade adulta (Fitch et al., 1992).

## **Eixo Endócrino Hipotálamo-Hipófise-Adrenais: Estresse, Estimulação Neonatal e Conseqüências**

A resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) ao estresse é um mecanismo adaptativo básico nos mamíferos. A responsividade do HPA é, em parte, determinada pela habilidade dos glicocorticóides, produzidos pelas adrenais, em regular a liberação do ACTH, pela hipófise (ou seja, fazer o “*feedback negativo*”). Além da ligação em sítios hipofisários e também hipotalâmicos (onde é secretado o hormônio liberador da corticotropina - CRH, que estimula a liberação do ACTH da hipófise), os glicocorticóides também podem regular o “*feedback*” pela ação em receptores específicos no córtex frontal e no hipocampo, que daí envia projeções para o hipotálamo (para uma revisão Francis et al., 1994).

Nos mamíferos, a manutenção ou a recuperação da homeostasia depende, em grande parte, da atividade secretora do eixo HPA, regula respostas hormonais frente a variações nas condições do meio ambiente (Levine, 1994).

Os glicocorticóides promovem grandes mudanças no metabolismo, que se resumem em aumentar o catabolismo e suprimir os processos anabólicos, visando disponibilizar as reservas energéticas do animal para este lidar com a situação estressante. A prolongada exposição ao estresse leva à exacerbação dos efeitos dos glicocorticóides provocando um crescente gasto metabólico que pode se tornar prejudicial e conduzir ao desenvolvimento de doenças, pois também induz à imunossupressão (Sapolsky, 1994). Por isso, é importante para o organismo limitar as respostas ao estresse.

Considerando-se respostas ao estresse, as experiências com situações de estresse podem modular nossas reações subseqüentes, promovendo aumento ou, por outras vezes, até reduzindo a habilidade de lidar com novos estressores. Hennessy e Levine (1979) propuseram que há no mínimo três diferentes tipos de experiências prévias que parecem afetar a responsividade a um dado estressor: experiência prévia com o mesmo estressor, experiência prévia com outros tipos de estressores (efeitos de transferência), e considerações comportamentais ontogenéticas sobre as conseqüências a longo-prazo da experiência precoce

com estressores. Essas experiências precoces podem constituir diversas formas de estimulação neonatal.

Vários sistemas reguladores têm seu desenvolvimento modificado por estímulos apresentados pelo ambiente no período neonatal, os quais promovem alterações marcadas pela plasticidade do sistema nervoso central, possibilitando sua manifestação a longo-prazo. Por esses motivos, a estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas até a vida adulta (Levine, 1962; Denenberg, 1964; Meaney, 1993; Plotsky & Meaney, 1993).

Os hormônios presentes durante o período perinatal podem exercer ação direta sobre o sistema nervoso central, basicamente modificando o funcionamento e a responsividade de cada conjunto de núcleos ou região específica, produzindo profundas e permanentes mudanças nos subseqüentes processos fisiológicos e comportamentais do organismo (Levine & Mullins Jr., 1966). A castração precoce, assim como injeções de hormônios sexuais, hormônios adrenais, hormônio da tireóide, etc., alteram o *status* hormonal do neonato, promovendo grandes efeitos sobre o posterior funcionamento dos sistemas biológicos do animal. Isso pode depender em grande parte do período do desenvolvimento no qual é administrado o tratamento ao filhote (Levine e Mullins, 1966).

Em ratos, a estimulação neonatal provoca muitos efeitos sobre o adulto e consiste da “manipulação” dos animais por alguns minutos por dia, ou apenas separação da mãe por períodos variados de tempo, ou também separação da mãe com aplicação de outros estímulos como frio ou choque, em geral durante as duas primeiras semanas de vida.

Mesmo o procedimento de simples manipulação, aparentemente não nocivo aos indivíduos, tem como conseqüência, na vida adulta, uma série de alterações. A manipulação no período neonatal modifica respostas comportamentais básicas desses animais na fase adulta, tanto relacionadas ao aumento da locomoção (Levine et al., 1967; Hess et al., 1969; Padoin et al., 2001), quanto a redução da reação de dor (Smythe et al., 1994), diminuição do comportamento sexual (Padoin et al., 2001), melhora do desempenho em alguns testes de

aprendizagem e memória (Núñez et al., 1995); e também alterações nas reações endócrinas de resposta ao estresse, de modo geral reduzindo a liberação de corticosterona frente a estímulos estressantes, e acelerando o retorno a níveis basais. Isso sugere uma diminuição da atividade do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal, e uma retroalimentação negativa mais eficaz (Hess et al., 1969; Levine et al, 1967; Levine 1993; Meaney et al. 1993; Francis et al., 1994).

Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (Levine, 1994). Foi demonstrado que ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo (Francis et al., 1994; Meaney et al. 1994; Sapolsky, 1994). Postula-se que essa seria a causa das diferenças entre animais estimulados e não estimulados na infância quando submetidos ao estímulo estressor na vida adulta (Meaney et al, 1994; Bhatnagar and Meaney, 1995). Desse modo, animais manipulados no período neonatal, quando adultos, apresentariam “feedback” mais rápido, cessando antes as secreções do eixo HPA.

No rato, durante as primeiras duas semanas após o nascimento, a glândula adrenal produz níveis hormonais muito baixos, que aumentam e atingem níveis de adulto até a puberdade (Walker et al, 1986). Quando submetidos aos mesmos estímulos que provocam reações clássicas de estresse em animais adultos (aumento dos níveis de ACTH e corticosterona), os filhotes em geral não apresentam essas respostas. Alguns desses procedimentos, como por exemplo expor os filhotes ao frio (0° C), o que seria considerado um estímulo estressor para um rato adulto, no animal neonato provoca apenas discreta ou nenhuma alteração daqueles hormônios clássicos do estresse (Walker et al, 1986; Gould, 1994; Levine, 1994, 2001).

Ou seja, existe uma inibição da atividade de secreção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta a estresse durante o período neonatal, que por esse motivo, passou a ser denominado “período hiporresponsivo ao estresse” (do inglês “*Stress Hyporesponsive Period*” - SHRP) (Sapolsky & Meaney, 1986, Levine, 2001).

Essa inibição na resposta adrenal durante o período neonatal parece depender basicamente de aspectos da regulação maternal (seja a constante presença da mãe, o tempo em que essa permanece com os filhotes, a temperatura, a própria amamentação, etc). Os filhotes privados da mãe apresentam aumentos nos níveis de corticosterona, tanto basais como de resposta ao estresse, diretamente relacionados ao comprimento do tempo em que ficaram privados. Essa resposta é aumentada com a idade durante o período neonatal, quando o próprio eixo HPA está amadurecendo. E há um tempo crítico de separação da mãe, durante esse período, que provoca alterações na responsividade do eixo HPA as quais persistem por até alguns dias, mesmo com o retorno da mãe, sendo que curtos períodos não apresentam esse efeito cumulativo (Rosenfeld et al., 1992; Suchecki et al., 1993, para uma revisão Levine, 1994).

Em ratos estimulados duas vezes por dia pelas três primeiras semanas de vida, a resposta à manipulação no final do dia é atenuada, um efeito que não ocorre quando usado o eletro-choque como estressor (similar a adultos). Isso sugere que a habituação, medida pela resposta da adrenal, pode ocorrer no neonato, e que os efeitos de diferentes estresses podem ser diferentes entre si (Ader et al., 1968). Quando submetidos a estímulos na idade adulta, ambos os grupos (manipulação ou eletro-choque na infância) respondem com menor elevação da corticosterona, do que o grupo não tratado (Ader & Grotta, 1969).

O estresse crônico no período neonatal pode aumentar a resistência dos ratos nas respostas comportamentais e endócrinas, induzindo a uma relativa subsensibilidade ao estresse crônico aleatório no adulto (González et al., 1990).

Existe uma considerável quantidade de trabalhos (para uma revisão ver Levine, 1994) mostrando que a manipulação, ou qualquer outro tipo de estimulação do animal no período neonatal provoca um distúrbio da relação mãe-filhote (Francis et al., 1994). As mães de filhotes manipulados lambem mais sua prole do que mães de filhotes não manipulados. Sabe-se, por outro lado, que o comportamento da mãe em relação ao filhote (lamber o corpo do filhote, por exemplo) afeta o desenvolvimento do sistema nervoso deste (Meaney, 1993; Sapolsky, 1997, McCarthy, 1997). Assim, postula-se que a perturbação da relação mãe-filhote seria, pelo menos, um dos mais importantes fatores que induziriam a muitas das alterações

comportamentais e neuroendócrinas observadas na vida adulta do rato manipulado no período neonatal.

A privação da presença da mãe, por 4 horas e meia, diariamente, nas três primeiras semanas de vida leva a uma redução dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse de restrição em ratos pós-adolescência (6-7 semanas), sem aumento da densidade de receptores para glicocorticóides no hipocampo; e reduz também o número de ambulações e respostas de orientação no campo aberto. Os autores sugerem que a essa deprivação maternal periódica leva os ratos a uma insensibilidade a estímulos ambientais na idade adulta (Ogawa et al., 1994). A separação maternal por 180 minutos, diariamente, nas duas primeiras semanas de vida eleva os níveis de RNAm do CRH, assim como o conteúdo de CRF na eminência mediana, e a manipulação diária por 15 minutos reduz ambos os níveis, nos adultos. O CRF liberado em resposta ao estresse é maior em animais separados e não-manipulados, do que em manipulados (Plotsky & Meaney, 1993). A separação da mãe por 180 minutos diariamente, do terceiro ao décimo dia pós-natal aumentou as respostas relacionadas à ansiedade, testadas no labirinto em cruz elevado, em ambos os sexos, mas essas respostas foram mais evidentes em machos, assim como a reação de liberação de ACTH à exposição ao labirinto foi aumentada nos machos, mas não nas fêmeas (Wigger & Neumann, 1999).

Considerando-se esses e outros resultados, vários pesquisadores propõem que interferências provocadas sobre a relação normal mãe-filhote (como a estimulação neonatal) podem modificar o comportamento da mãe em relação aos filhotes (Meaney et al., 1993; Francis et al., 1994; Levine, 1994; Sapolsky, 1997). Em alguns casos, sob a influência da manipulação da ninhada, a mãe passa a lamber mais a prole, em outros reduz o tempo em contato com estes (para uma revisão, ver Levine, 1994). As estimulações neonatais de modo geral afetam o desenvolvimento do sistema nervoso, assim como as respostas neuroendócrinas e comportamentais dos filhotes. Esses efeitos sobre o sistema nervoso podem ser observados ainda no período basicamente hiporresponsivo, onde a presença da mãe é essencial para o seu desenvolvimento, e podem perdurar inclusive até a vida adulta da prole.

Essas alterações comportamentais que diferenciam animais manipulados e não manipulados são, na maioria, manifestadas após a puberdade; e, se a estimulação é administrada em animais neonatos ou em animais adultos, apresenta conseqüências diferentes (para uma revisão ver Denenberg, 1964).

Alguns estudos revelam que efeitos a longo-prazo tanto do estresse pré-natal quanto da manipulação neonatal podem apresentar componentes diferenciados em relação ao sexo do animal (Smythe et al, 1994, Wigger & Neumann, 1999), de modo geral mostrando maior efeito da manipulação neonatal sobre fêmeas do que sobre machos (Fernández-Teruel et al., 1991), revelando que deve haver influência dos hormônios sexuais sobre manifestações tardias da estimulação infantil. Fêmeas de ratos Wistar manipuladas no período neonatal apresentam ciclos estrais com fases de estro anovulatórias (Gomes et al, 1999). A administração de hormônios sexuais no período neonatal, principalmente estrógeno, mas também andrógeno, tem profundos efeitos sobre comportamentos não-sexuais no adulto, de modo geral, reduzindo a emocionalidade em ambos os sexos. A injeção de placebo, nos grupos controle, também apresentou alguns efeitos significativos com relação ao grupo não-tratado (Gray et al, 1965), o que sugere a influência do estresse neonatal sobre a diferenciação do sistema nervoso, o que acarretaria alterações comportamentais no adulto.

Esses resultados sugerem importantes interações entre as ações dos hormônios sexuais sobre o sistema nervoso e a ativação, manifestação ou modulação de efeitos da estimulação neonatal.

## HIPÓTESE

Considerando-se que, tanto a castração, quanto a manipulação no período crítico de desenvolvimento provocam modificações estruturais e funcionais sobre o sistema nervoso, é razoável supor que castração logo após o nascimento possa modular os mecanismos pelos quais a manipulação neonatal “imprime” suas alterações sobre os processos de diferenciação do sistema nervoso. Considerando-se que os hormônios gonadais circulantes influenciam o funcionamento do sistema nervoso em adultos, modulando a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais e promovendo diferenças observadas entre machos e fêmeas, sugere-se que a castração na idade adulta poderia afetar a manifestação dos efeitos da manipulação neonatal sobre a secreção de corticosterona em ratos adultos. Assim como a retirada dos hormônios gonadais deve promover importantes alterações na atividade de secreção de gonadotrofinas, LH, FSH, nesses animais, os efeitos tardios da manipulação neonatal sobre esses sistemas poderiam também ser afetados pela ausência dos hormônios gonadais em ratos adultos. Sugere-se, portanto, que exista interação entre os efeitos da manipulação neonatal e da gonadectomia, seja neonatal ou em idade adulta, sobre a secreção de hormônios sexuais e também de corticosterona em ratos adultos, ou seja, sobre a atividade dos eixos hipotálamo-hipófise-gônadas e hipotálamo-hipófise-adrenais.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar efeitos da manipulação neonatal ou da interação entre manipulação neonatal e diferentes fases do ciclo estral, sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais e do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, em ratos machos e fêmeas adultos.

Avaliar efeitos da interação entre a manipulação neonatal e a gonadectomia em fases distintas do desenvolvimento sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais e sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, em ratos machos e fêmeas adultos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A presente tese está dividida em 3 experimentos, de acordo com os seguintes objetivos específicos:

### Experimento 1 -

1.a) Observar efeitos da manipulação neonatal, ou da interação entre manipulação neonatal e diferentes fases do ciclo estral, sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, através da avaliação das concentrações plasmáticas de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou estro.

1.b) Observar efeitos manipulação neonatal, ou da interação entre manipulação neonatal e diferentes fases do ciclo estral, sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, através da avaliação da concentração plasmática de gonadotrofinas, LH e FSH, de hormônios gonadais, estradiol, progesterona e testosterona, e de prolactina, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou em estro.

### Experimento 2 -

2.a) Avaliar efeitos da interação entre a manipulação e a gonadectomia neonatal sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, através da verificação das concentrações plasmáticas de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos machos e fêmeas adultos.

2.b) Avaliar efeitos da interação entre a manipulação e a gonadectomia neonatal sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, através da análise concentração de gonadotrofinas, LH e FSH, e de hormônios gonadais, estradiol, progesterona e testosterona, em ratos machos e fêmeas adultos.

**Experimento 3 -**

3.a) Investigar influências da interação entre a manipulação neonatal e a gonadectomia na idade adulta sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, observando as concentrações plasmáticas de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos machos.

3.2) Investigar influências da interação entre a manipulação neonatal e a castração na idade adulta sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, observando a concentração plasmática de gonadotrofinas, LH e FSH, e de testosterona, em ratos machos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, obtidos a partir de ratas prenhas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os animais utilizados eram da mesma linhagem. As fêmeas prenhas, aproximadamente 1 semana antes do parto, foram mantidas individualmente em caixas-padrão (41 x 34 x 17 cm), até o desmame dos filhotes. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado e o número de filhotes padronizado em 8 por ninhada. Após o desmame (dia 21), os filhotes foram separados da mãe e colocados em grupos de 2 a 4 do mesmo sexo, por caixa. A temperatura da sala era de  $22 \pm 1$  °C e o ciclo claro-escuro de 12C:12E (início da fase clara 6:00). Em todo o experimento, as caixas foram mantidas com serragem, água e ração (Nutrilab, Brasil) *ad libitum*.

### GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram realizados 3 experimentos principais e os grupos, em cada experimento, estão representados em esquemas, a seguir. Cada grupo testado foi constituído por ratos(as) não-irmãos(ãs) (o número entre parênteses ao lado de cada grupo abaixo representa; portanto, o número de animais em diferentes ninhadas utilizadas). Em todas as ninhadas, a idade do desmame dos filhotes foi entre 21 e 23 dias, quando estes foram colocados em caixas com 2 a 4 irmãos do mesmo sexo.

O procedimento de Manipulação (Figura 1), animais submetidos à Gonadectomia Neonatal (Figura 2), e esquemas dos Grupos (Figuras 3, 4 e 5) serão mostrados adiante.

#### ESPECIFICAÇÃO DOS GRUPOS

##### Grupos do Experimento 1 (Figura 3):

Machos sem cirurgia/ não-manipulados (N=40)

Machos sem cirurgia/ manipulados (N=30)

Fêmeas sem cirurgia/ não-manipuladas/ diestro (N=30)

Fêmeas sem cirurgia/ não-manipuladas/ estro (N=30)

Fêmeas sem cirurgia/ manipuladas/ diestro (N=28)

Fêmeas sem cirurgia/ manipuladas/ estro (N=35)

OBS: Todos os grupos do experimento 1 foram subdivididos para as coletas de amostras independentes nos testes de concentração basal e resposta de corticosterona ao estresse.

##### Grupos do Experimento 2 (Figura 4):

Machos sem cirurgia / não-manipulados (N=18)

Machos cirurgia fictícia 6h/ não-manipulados (N=18)

Machos castrados 6h/ não-manipulados (N=16)

Machos sem cirurgia / manipulados (N=18)

Machos cirurgia fictícia 6h/ manipulados (N=17)

Machos castrados 6h/ manipulados (N=15)

Fêmeas sem cirurgia / não-manipuladas (N=18)

Fêmeas cirurgia fictícia 6h/ não-manipuladas / diestro (N=13)

Fêmeas castradas 6h/ não-manipuladas (N=12)

Fêmeas sem cirurgia / manipuladas (N=18)

Fêmeas cirurgia fictícia 6h/ manipuladas / diestro (N=16)

Fêmeas castradas 6h/ manipuladas (N=14)

**Grupos do Experimento 3 (Figura 5):**

Machos cirurgia fictícia adulto/ não-manipulados (N=20)

Machos castrados adulto/ não-manipulados (N=18)

Machos cirurgia fictícia adulto/ manipulados (N=20)

Machos castrados adulto/ manipulados (N=24)

OBS: Todos os grupos do experimento 2 e 3 foram subdivididos para as coletas de amostras independentes nos testes de concentração basal e resposta de corticosterona ao estresse.

Os números entre parênteses, ao lado dos grupos, se referem ao número total de animais diferentes testados em cada grupo. Para as análises, foram calculadas as médias do desempenho entre os irmãos, caso tenham sido estudados nas mesmas condições.

## ESPECIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

### *Manipulação Neonatal (Figura 1)*

A manipulação neonatal foi realizada a partir do dia seguinte ao nascimento (dia 1) e ocorreu durante os primeiros 10 dias após o nascimento, uma vez ao dia, em horários diferentes. Esse procedimento foi realizado em uma sala que se conecta com o biotério, onde a temperatura e fotoperíodo eram mantidos os mesmos.

O procedimento denominado Manipulação Neonatal, consistiu em: (1) Retirar a rata mãe da caixa, e colocá-la em uma outra caixa ao lado; (2) Em seguida, retirar os filhotes do ninho, e segurá-los todos juntos nas mãos, acima do próprio ninho, utilizando-se luvas látex finas; (3) Todos os filhotes foram tocados pelo experimentador, para isso se movimentava o grupo suavemente entre os dedos, até que se fizesse contato direto com cada filhote; (4) Após essa “manipulação”, todos os filhotes eram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho e logo era recolocada a mãe. O procedimento de manipular os filhotes durava 1 minuto, sendo que o tempo total entre a separação da mãe e a devolução dos filhotes à mesma, levava em torno de 2 a 2,5 minutos.

O procedimento de manipulação neonatal foi definido do modo como descrito acima com base em trabalhos clássicos sobre estimulação neonatal por manipulação (Denenberg et al, 1964; Levine et al, 1967; Ader et al, 1968; Hess et al, 1969). A figura 1 mostra o procedimento de manipulação neonatal utilizado nesse experimento.

### **Gonadectomia (Ovariectomia e Orquidectomia) Neonatal (Figura 2)**

A cirurgia de castração neonatal em machos (orquidectomia) foi desenvolvida a partir de uma adaptação do protocolo de cirurgia utilizado por Rasia-Filho *et al* (1995), substituindo-se o éter pela crioanestesia, devido ao menor índice de mortalidade obtido com

essa anestesia (Pfeiffer, 1936; Litteria, 1994). Em fêmeas, a cirurgia foi desenvolvida a partir de um experimento piloto em que as estruturas envolvidas (ovários e útero) foram comparadas em algumas idades, 18 dias, 12 dias, 5 dias, 2 dias e recém-nascidas; para verificação da localização destas estruturas. É uma cirurgia de difícil visualização devido ao tamanho reduzido do animal no dia do nascimento.

Os animais foram retirados da caixa-moradia a partir do nascimento (antes de completarem 6 horas de vida), e levados individualmente para a crioanestesia (-18°C, durante 20 minutos para machos, e durante 18 minutos para fêmeas), dentro de recipientes plásticos abertos, forrados com papel-toalha. Para a cirurgia, os animais foram colocados sobre placas de gel congelado, forradas com fina camada de gaze.

O material cirúrgico (pinças, tesouras, agulhas e linhas de sutura) foi desinfetado com álcool iodado (2% de iodo), logo antes de cada cirurgia. A figura 2 mostra filhotes castrados logo após o nascimento.

#### *Gonadectomia e Cirurgia Fictícia em Ratos Machos Recém-Nascidos*

Em machos recém-nascidos (antes de 6 horas após o nascimento), a orquiectomia foi realizada através de incisão transversal bilateral entre o umbigo e o pênis. O peritônio foi perfurado com uma pinça de ponta romba e os testículos foram localizados próximos da linha mediano-lateral, mais próximo do pênis do que do umbigo. Os testículos foram separados por corte logo abaixo do feixe vaso-nervoso, e, a seguir, feita sua retirada. A sutura peritoneal não foi realizada. A seguir, a incisão da pele foi unida por sutura simples, utilizando-se fio para cirurgia ocular 6.0 não absorvível. Na cirurgia de orquidectomia fictícia, foi feita a mesma incisão entre umbigo e pênis, até a perfuração do peritônio, e a seguir foi feita a sutura, sem a retirada dos testículos.

#### *Gonadectomia e Cirurgia Fictícia em Fêmeas Recém-Nascidas*

A técnica de ovariectomia antes de 6 horas após o nascimento consistiu em incisão transversal bilateral na porção látero-dorsal do abdômen, entre a última costela e o íleo. O

peritônio foi perfurado e o ovário encontrava-se logo abaixo do rim, preso à porção caudal deste, através do ligamento suspensor do ovário. Para remoção total do ovário, o ligamento suspensor foi cortado assim como parte do corno uterino. A sutura peritoneal não foi realizada, sendo feito somente sutura de pele com três pontos simples utilizando-se fio para cirurgia ocular 6.0 não absorvível. Na cirurgia de ovariectomia fictícia, foi realizada a incisão no abdômen, desde as camadas superficiais, até a perfuração do peritônio, mas os ovários não foram retirados, sendo feita a sutura em seguida, do mesmo modo que na ovariectomia.

#### *Gonadectomia e Cirurgia Fictícia em Ratos Machos Adultos*

Para a cirurgia de castração em pré-púberes ou adultos, os ratos foram anestesiados com Ketamina (anestésico geral) e Xilazina (relaxante muscular) à dose de 100 mg/Kg. Foi realizada no saco escrotal uma incisão transversal única de cerca de 2 cm caudal ao pênis, estando o animal em decúbito dorsal. Após, através de um corte único foi feita a extrusão dos testículos. Os ramos vasculares foram então vigorosamente atados, para se prosseguir a orquiectomia. A seguir, foram suturadas as camadas internas e então a pele do escroto. Na cirurgia de castração fictícia, não foi feita a completa extrusão dos testículos, os quais não foram retirados, e a seguir foi feita a sutura. As suturas cirúrgicas em ratos adultos, foram realizadas com o uso de fio seda 4,0.

#### *Verificação da fase do ciclo estral em fêmeas adultas*

A partir de 75 dias de idade, as fêmeas foram submetidas a uma seqüência de esfregaços vaginais diários, com conta-gotas, para os quais se utilizou solução salina a 0,9% NaCl (26±2°C). Essa seqüência durava no mínimo 10 dias, sempre pela manhã, para selecionar as fêmeas com ciclo regular, de 4-5 dias (Freeman, 1994), e a fase do ciclo a ser testada. Nas fêmeas castradas, foi observada a ausência da abertura vaginal do tipo que aparece nas fêmeas não castradas. O procedimento de coleta de esfregaço vaginal foi realizado pelo menos 45 minutos antes do teste específico.

### *Coleta de Sangue para Dosagem de Hormônios*

#### *Corticosterona*

Aos 100 dias de idade, os animais de cada grupo experimental foram, aleatoriamente, distribuídos em um dos novos grupos experimentais: um grupo para coleta de sangue sem novo estresse (Basal), e outro grupo para coleta de sangue após estresse (Resposta ao Éter). Este último grupo ainda foi subdividido em dois grupos: 15 minutos e 40 minutos. Para o grupo de coleta basal, os animais eram retirados, individualmente, de sua caixa-moradia e imediatamente decapitados. Os animais do grupo de coleta após estresse eram retirados de sua caixa e colocados em um frasco de vidro de volume de 2L onde eram submetidos a vapores de éter durante 1 minuto. Em seguida, retornavam à outra caixa, onde permaneciam, individualmente, até a sua retirada. Para o experimento 1, metade destes permaneceu na caixa por 14 e metade por 39 minutos após o término do estresse, totalizando, respectivamente 15 ou 40 minutos até o momento da coleta do sangue. Para os experimentos 2 e 3, a coleta de sangue dos animais submetidos a vapores de éter ocorreu aos 15 minutos após o início da exposição. De todos os animais, o sangue foi coletado por decapitação, entre 10:00 e 12:00 horas do ciclo claro (início do período claro 06:00), em tubos de ensaio contendo 0,02 ml de solução de heparina (como anticoagulante), mantidos no gelo picado. As amostras foram centrifugadas e o plasma foi separado e conservado em freezer - 70°C até a dosagem dos hormônios por radioimunoensaio.

#### *Radioimunoensaio para Corticosterona:*

A corticosterona plasmática foi determinada por RIA utilizando-se um kit Amerlex™ RPA 548 (Amersham, Buckinghamshire, UK) com sensibilidade de 0.06 ng/tubo e erro intraensaio de 5%.

#### *Hormônios Sexuais - LH, FSH e Hormônios Gonadais:*

Aos 100 dias de idade, animais de todos os grupos experimentais, foram retirados da caixa e as coletas de sangue foram realizadas imediatamente, por decapitação, entre 10:00 e 12:00 do ciclo claro, em tubos contendo 0,02ml de solução de heparina e mantidos no gelo. As amostras foram centrifugadas e o plasma coletado e conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o processamento do radioimunoensaio.

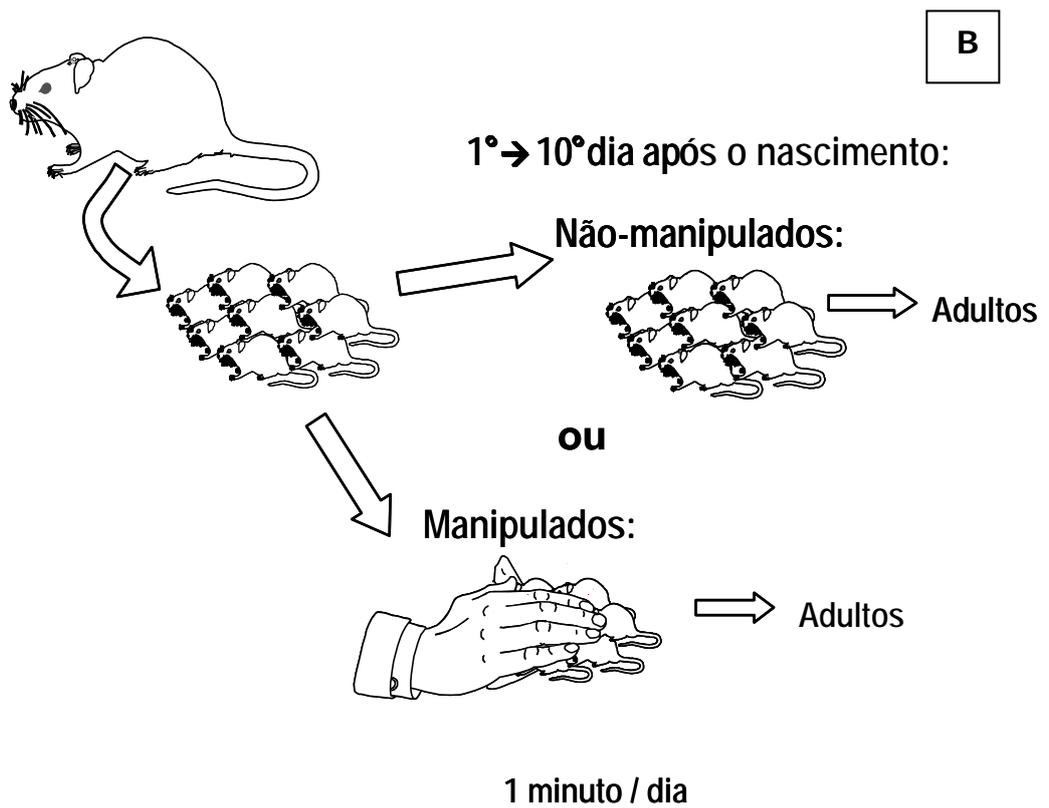
*Radioimunoensaio para Hormônios sexuais:*

A concentração plasmática de LH e de FSH foi obtida através do uso de kits específicos do Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais (NIDDK, Baltimore, MD, USA). Os anti-corpos utilizados foram LH-S10 e FSH-S11 anti-rato; os padrões utilizados foram LH-RP3 e FSH-RP2. O mínimo valor detectável foi de 0.04 ng/mL para o LH e de 0.09 ng/mL para o FSH. As concentrações plasmáticas de E<sub>2</sub> e P foram determinadas por RIA de duplo anti-corpo, utilizando-se Kits específicos MAIA® (BioChem ImmunoSystems, Bologna, Italy). O mínimo valor detectável foi de 7.5 pg/mL para E<sub>2</sub> e de 0.075 ng/mL para P.

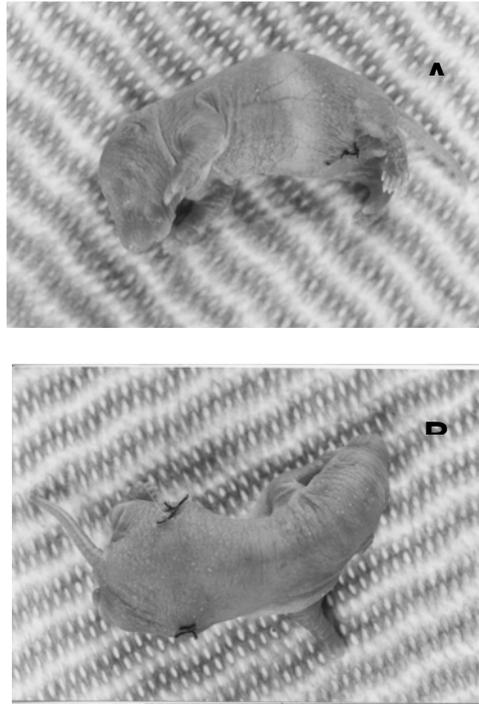
## **CONFIRMAÇÃO DO SUCESSO DAS CIRURGIAS DE CASTRAÇÃO**

Para confirmar que os ovários haviam sido corretamente retirados, além esfregaços vaginais nas fêmeas adultas (que deveriam apresentar células características de diestro constante, ou seja, predominantemente leucócitos), também fora realizada a inspeção visual da cavidade abdominal após a decapitação para a coleta de sangue, o que confirmou a ausência dos ovários e o tamanho reduzido do útero, quando comparadas às fêmeas submetidas à cirurgia fictícia. Em machos, a inspeção visual indicou a ausência dos testículos, assim como regressão do saco escrotal e redução do tamanho de glândulas anexas, como as vesículas seminais, quando comparados a machos submetidos à cirurgia fictícia.

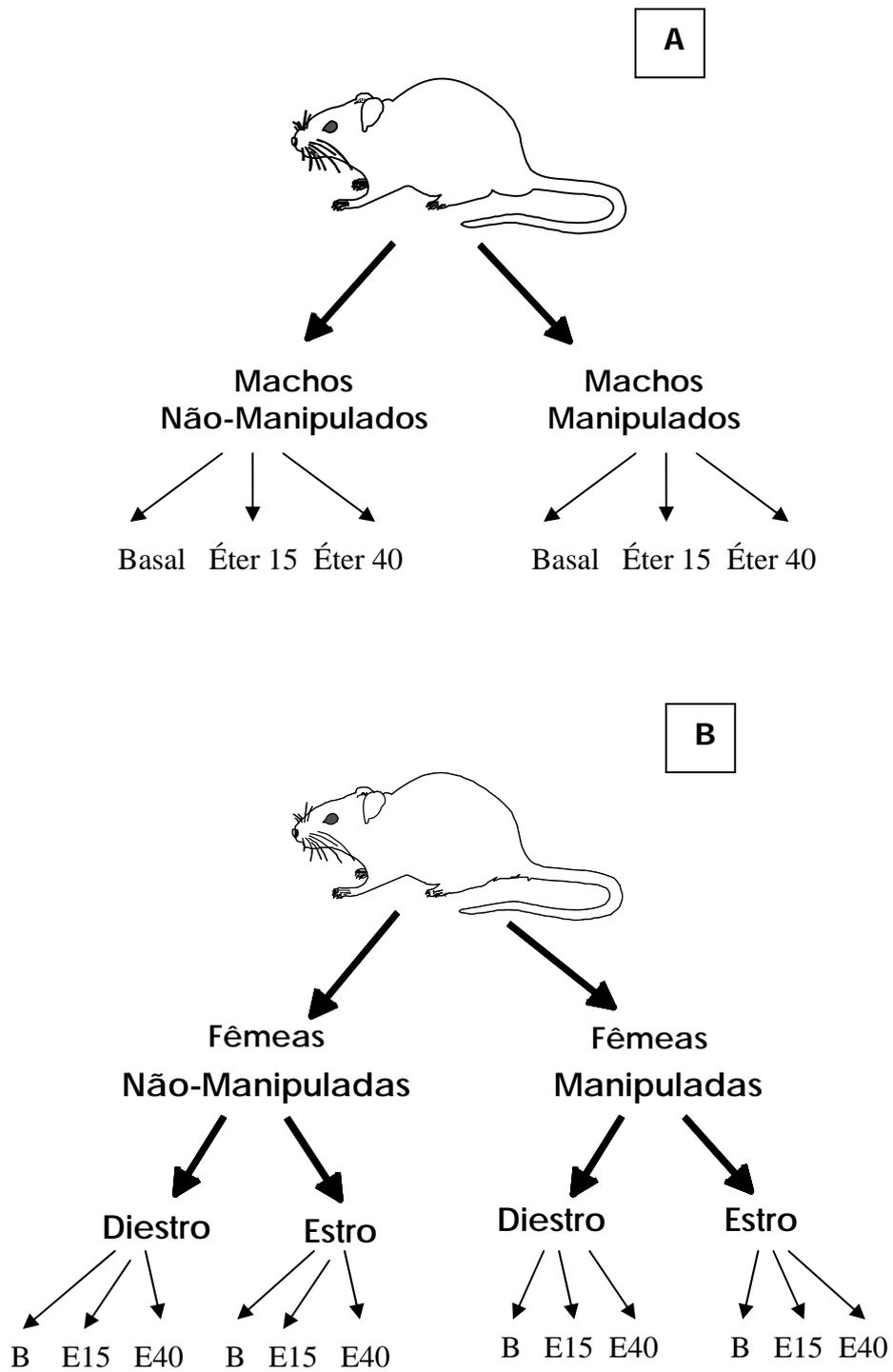




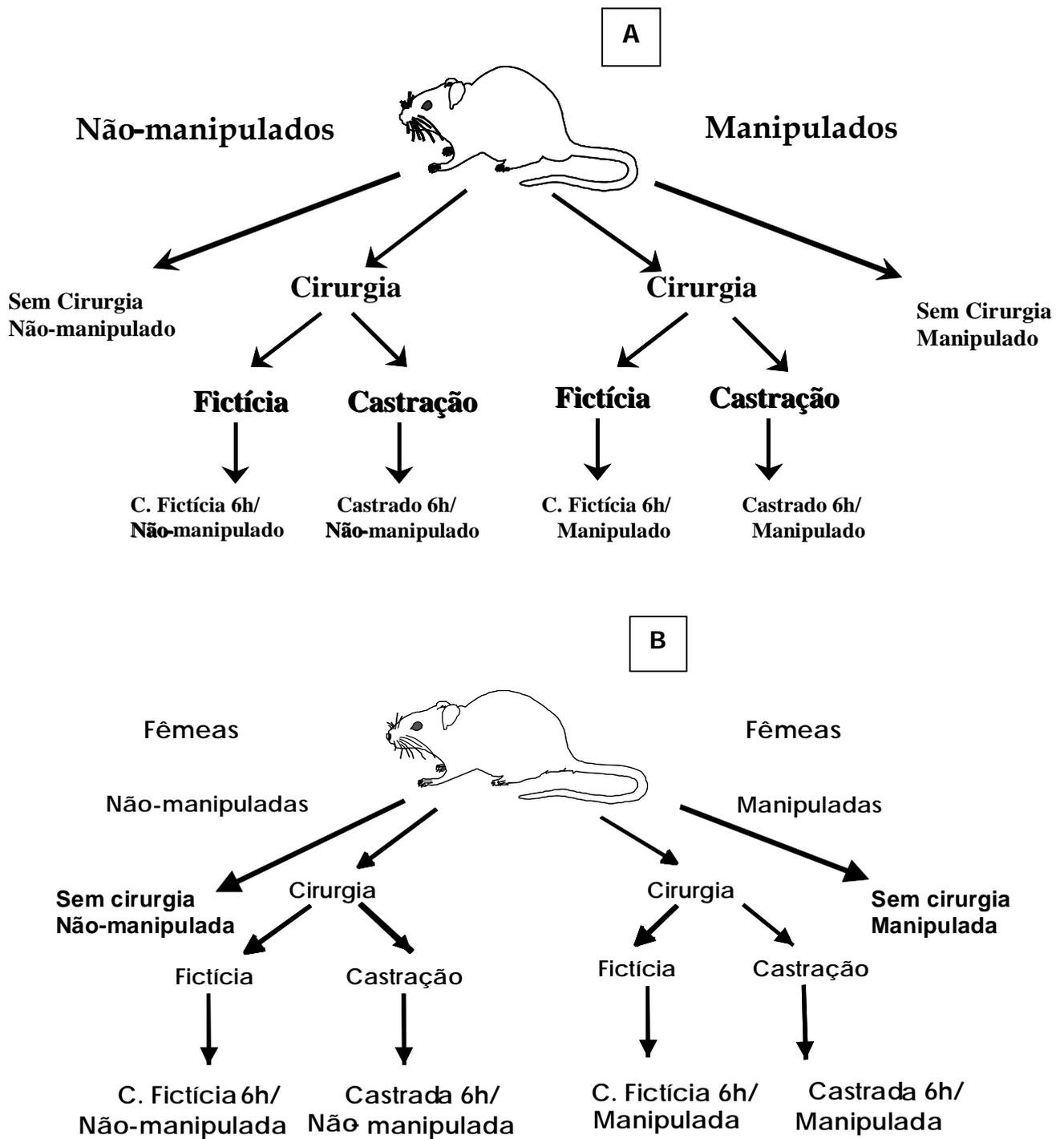
**Figura 1.** Modelo Experimental de Manipulação Neonatal (A); Esquema dos grupos básicos de manipulação neonatal (B).



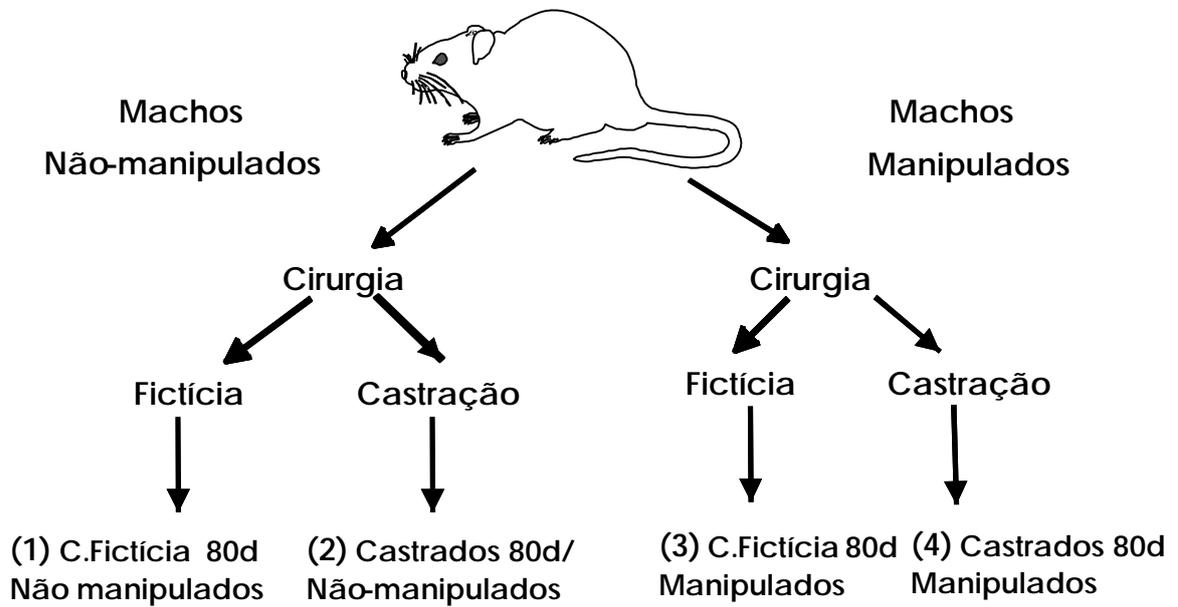
**Figura 2.** Filhotes Wistar gonadectomizados logo após o nascimento. Filhote macho (A); filhote fêmea (B).



**Figura 3.** Esquemas de grupos básicos do experimento 1. Grupos de ratos machos (A); Grupos de fêmeas (B). Coleta de sangue em Condições Basais = B; ou após 1 minuto de exposição a vapores de éter (+14 minutos = E15; +39 minutos = E40).



**Figura 4.** Esquemas de grupos básicos do Experimento 2: Grupos de ratos machos (A); Grupos de fêmeas (B). Cada grupo final apresentado foi ainda subdividido em Basal e Éter 15.



**Figura 5.** Esquema de grupos básicos do Experimento 3: Grupos de ratos machos. Cada grupo final foi ainda subdividido em Basal e Éter 15.

## SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL BÁSICA

### Experimento 1 –

**Efeitos da Manipulação neonatal e da interação entre Manipulação neonatal e Diferentes fases do ciclo estral sobre as concentrações plasmáticas de Corticosterona e de Gonadotrofinas (LH e FSH), basais e em resposta ao estresse por éter, e sobre as concentrações plasmáticas basais de hormônios gonadais (Estradiol, Progesterona e Testosterona) em ratos machos adultos e em fêmeas em estro e em diestro.**

#### **1.1) Objetivos do experimento 1:**

a) Observar efeitos da manipulação neonatal, ou da interação entre manipulação neonatal e diferentes fases do ciclo estral, sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, através da avaliação da concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou estro.

b) Observar efeitos da manipulação neonatal, ou da interação entre manipulação neonatal e diferentes fases do ciclo estral, sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, através da avaliação da concentração plasmática de gonadotrofinas (LH e FSH), de hormônios gonadais (estradiol, progesterona e testosterona) e de prolactina, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou em estro.

#### 1.2) Listagem dos grupos:

Machos

1. Macho não-manipulado / basal
2. Macho não-manipulado / éter 15 min
3. Macho não-manipulado / éter 40 min
4. Macho manipulado / basal

5. Macho manipulado / éter 15 min
6. Macho manipulado / éter 40 min

Fêmeas

7. Fêmea não-manipulada / diestro - basal
8. Fêmea não-manipulada / diestro - éter 15 min
9. Fêmea não-manipulada / diestro - éter 40 min
10. Fêmea não-manipulada / estro - basal
11. Fêmea não-manipulada / estro - éter 15 min
12. Fêmea não-manipulada / estro - éter 40 min
13. Fêmea manipulada / diestro - basal
14. Fêmea manipulada / diestro - éter 15 min
15. Fêmea manipulada / diestro - éter 40 min
16. Fêmea manipulada / estro - basal
17. Fêmea manipulada / estro - éter 15 min
18. Fêmea manipulada / estro - éter 40 min

1.3) Seqüência do experimento 1:

Obtenção das ratas prenhas. Água e ração *ad libitum*, temperatura em torno de 22°C, fotoperíodo 12 horas de luz, 12 horas de escuro.

Observação do dia do parto: dia 0.

Dia 0: Distribuição das ninhadas em não-manipuladas ou manipuladas. Retirada dos filhotes que excedem ao número de 8.

Dia 1 até dia 10: Manipulação Neonatal.

Aos 21 dias de idade: Desmame dos filhotes.

A partir de 70 dias: Verificação dos esfregaços vaginais diários (Ciclo Estral).

Aos 90-100 dias: Seleção das ratas com ciclo estral regular e dos ratos machos adultos. Um terço dos animais retirados da caixa para coleta imediata de sangue para a dosagem da concentração plasmática basal de corticosterona. Estresse agudo por 1 minuto de éter. Coleta de sangue de um grupo de animais depois 14 minutos pós-estresse (Grupo 15 minutos) e de outro grupo de animais somente 44 minutos pós-estresse (Grupo 45 minutos).

## **Experimento 2 -**

**Efeitos da interação entre Manipulação neonatal e Gonadectomia antes de 6 horas de vida sobre as concentrações plasmáticas de Corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo, e sobre as concentrações plasmáticas basais de Gonadotrofinas (LH e FSH) e de hormônios gonadais (Estradiol, Progesterona e Testosterona) em ratos machos e fêmeas adultos.**

### **2.1) Objetivos do experimento 2:**

**a) Avaliar efeitos da interação entre a manipulação neonatal e a gonadectomia logo após o nascimento sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, através da verificação da concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos machos e fêmeas adultos.**

**b) Avaliar efeitos da interação entre a manipulação neonatal e a gonadectomia logo após o nascimento sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, através da verificação da concentração de gonadotrofinas (LH e FSH) e de hormônios gonadais (estradiol, progesterona e testosterona) em ratos machos e fêmeas adultos.**

### **2.2) Listagem dos grupos:**

Machos

19. Macho sem cirurgia/ não-manipulado/basal
20. Macho cirurgia fictícia 6h/ não-manipulado/ basal
21. Macho castrado 6h/ não-manipulado/ basal
22. Macho sem cirurgia/ manipulado/ basal
23. Macho cirurgia fictícia 6h/ manipulado/ basal
24. Macho castrado 6h/ manipulado/ basal
25. Macho sem cirurgia/ não-manipulado/éter 15 min
26. Macho cirurgia fictícia 6h/ não-manipulado/ éter 15 min
27. Macho castrado 6h/ não-manipulado/ éter 15 min
28. Macho sem cirurgia/ manipulado/éter 15 min
29. Macho cirurgia fictícia 6h/ manipulado/ éter 15 min
30. Macho castrado 6h/ manipulado/ éter 15min

Fêmeas

31. Fêmea sem cirurgia/ não-manipulada/ diestro/ basal
32. Fêmea cirurgia fictícia 6h/ não-manipulada/ diestro/ basal
33. Fêmea castrada 6h/ não-manipulada/ basal
34. Fêmea sem cirurgia/ manipulada/ diestro/ basal
35. Fêmea cirurgia fictícia 6h/ manipulada/ diestro/ basal
36. Fêmea castrada 6h/ manipulada/ basal
37. Fêmea sem cirurgia/ não-manipulada/ diestro/ éter 15 min
38. Fêmea cirurgia fictícia 6h/ não-manipulada/ éter 15 min
39. Fêmea castrada 6h/ não-manipulada/ éter 15 min
40. Fêmea sem cirurgia/ manipulada/ diestro/ éter 15 min
41. Fêmea cirurgia fictícia 6h/ manipulada/ éter 15 min
42. Fêmea castrada 6h/ manipulada/ éter 15min

2.3) Seqüência do experimento 2:

Obtenção das ratas prenhas. Água e ração *ad libitum*, temperatura em torno de 22°C, fotoperíodo 12 horas de luz, 12 horas de escuro.

Observação do dia do parto: dia 0.

Dia 0: antes de 6 horas após o nascimento → cirurgia de castração ou cirurgia fictícia em machos e fêmeas. Distribuição das ninhadas em não-manipuladas ou manipuladas. Retirada dos filhotes que excedem ao número de 8.

Dia 1 até dia 10: Manipulação Neonatal.

Aos 21 dias de idade: Desmame dos filhotes.

A partir de 70 dias: Verificação dos esfregaços vaginais diários (Ciclo Estral).

Aos 90-100 dias: Seleção das ratas castradas, das ratas castradas, e daquelas sem cirurgia ou submetidas à cirurgia fictícia que apresentavam ciclo estral regular, e dos ratos machos adultos. Metade dos animais retirados da caixa para coleta imediata de sangue para a dosagem da concentração plasmática basal de corticosterona e para a dosagem de hormônios sexuais. Metade dos animais: Estresse agudo por 1 minuto de éter. Coleta de sangue por decapitação após 14 minutos depois do estresse (Grupo 15 minutos).

### **Experimento 3 -**

**Efeitos da interação entre Manipulação neonatal e da Castração na idade adulta sobre as concentrações plasmáticas de Corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo, e sobre as concentrações plasmáticas basais de Gonadotrofinas (LH e FSH) e de hormônios gonadais (Testosterona) em ratos machos.**

#### **3.1) Objetivos do experimento 3:**

a) Investigar influências da interação entre a manipulação neonatal e a gonadectomia na idade adulta sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, através da avaliação da concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse agudo por éter, em ratos machos.

b) Investigar influências da interação entre a manipulação neonatal e a castração na idade adulta sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, através da avaliação da concentração plasmática de gonadotrofinas (LH e FSH) e de testosterona, em ratos machos.

#### **3.2) Listagem dos grupos:**

Machos

43. Macho cirurgia fictícia 80d/ não-manipulado/ basal
44. Macho castrado 80d/ não-manipulado/ basal
45. Macho cirurgia fictícia 80d/ manipulado/ basal
46. Macho castrado 80d/ manipulado/ basal
47. Macho cirurgia fictícia 80d/ não-manipulado/ éter 15 min
48. Macho castrado 80d/ não-manipulado/ éter 15 min
49. Macho cirurgia fictícia 80d/ manipulado/ éter 15 min
50. Macho castrado 80d/ manipulado/ éter 15min

#### **3.3) Seqüência do experimento 3:**

Obtenção das ratas prenhas. Água e ração *ad libitum*, temperatura em torno de 22°C, fotoperíodo 12 horas de luz, 12 horas de escuro.

Observação do dia do parto: dia 0.

Dia 0: Distribuição das ninhadas em não-manipuladas ou manipuladas. Retirada dos filhotes que excedem ao número de 8.

Dia 1 até dia 10: Manipulação Neonatal.

Aos 21 dias de idade: Desmame dos filhotes.

Aos 80 dias de idade: Cirurgia de castração (orquidectomia) e cirurgia de castração fictícia em ratos machos.

Aos 120 dias: Metade dos ratos retirados da caixa para coleta imediata de sangue para a dosagem da concentração plasmática basal de corticosterona e para a dosagem de hormônios sexuais. Metade dos ratos: Estresse agudo por 1 minuto de éter. Coleta de sangue por decapitação após 14 minutos depois do estresse (Grupo 15 minutos).

**Tabela 1.** Resumo da seqüência temporal dos experimentos

<i>Idade dos Animais (dias)</i>	<i>Procedimentos utilizados</i>
0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distribuição das ninhadas em não-manipuladas ou manipuladas.</li> <li>- Gonadectomia antes das 6 h após o nascimento.</li> <li>- Cirurgia fictícia antes das 6 horas após o nascimento.</li> </ul>
1-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulação diária, por 1 min. nos grupos de manipulados.</li> </ul>
75-até último dia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verificação das fases do ciclo estral em fêmeas, através de esfregaços vaginais diários.</li> </ul>
80	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gonadectomia em machos adultos.</li> <li>- Cirurgia fictícia em machos adultos.</li> </ul>
90-120	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sacrifício dos animais, coleta de sangue e observação da presença/ausência das gônadas.</li> </ul>

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de corticosterona plasmática (ng/ml) foram expressos em média ( $\pm$ EPM), e comparados entre grupos (não-manipulado e manipulado) e entre diferentes fases do ciclo estral (diestro e estro) em fêmeas (Experimento 1), ou diferentes procedimentos cirúrgicos (sem cirurgia, cirurgia fictícia ou castração) (Experimentos 2 e 3), em condições basais e em resposta a estresse por éter.

As concentrações plasmáticas de hormônio luteinizante (LH)(ng/ml), de hormônio folículo estimulante (FSH)(ng/ml), estradiol ( $E_2$ )(pg/ml), de progesterona (P)(ng/ml), de testosterona (T)(ng/ml) e de prolactina (PRL)(ng/ml) foram todas expressas em médias ( $\pm$ EPM) e comparadas também entre grupos (não-manipulado e manipulado) e, conforme o experimento, entre diferentes fases do ciclo estral (diestro e estro) (Experimento 1) ou entre diferentes procedimentos cirúrgicos (sem cirurgia, cirurgia fictícia e gonadectomia) (Experimento 2 e 3), em condições basais ou também em resposta a estresse por éter.

Os resultados de efeitos da manipulação neonatal em fêmeas adultas em diferentes fases do ciclo estral foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (efeitos da manipulação e da fase do ciclo). No caso das análises de efeitos da manipulação neonatal em ratos machos adultos, dependendo do protocolo utilizado, foi realizada ANOVA (quando comparadas concentrações basais e em resposta a estresse), ou teste *t* de Student (quando comparados somente dois grupos). Os resultados de efeitos da manipulação neonatal e da castração antes de 6 horas após o nascimento, em ratos machos ou fêmeas adultos, foram analisados por ANOVA de duas vias (efeitos da manipulação e da gonadectomia 6h). Semelhante foi realizado para as análises de efeitos da manipulação neonatal e da castração aos 80 dias de idade em machos (efeitos da manipulação neonatal e da gonadectomia aos 80 dias).

Em todas as análises, quando detectado efeito significativo para manipulação, gonadectomia, fase do ciclo, ou interações, foi realizado o teste *post hoc* de comparação de médias Newman-Keuls, para observar possíveis diferenças individuais em função do efeito avaliado. Em todos os casos, as comparações foram feitas entre animais do mesmo sexo, e o nível de significância aceito foi de  $p < 0.05$ . Não foram realizadas comparações entre machos e fêmeas (efeitos de gênero/sexo).

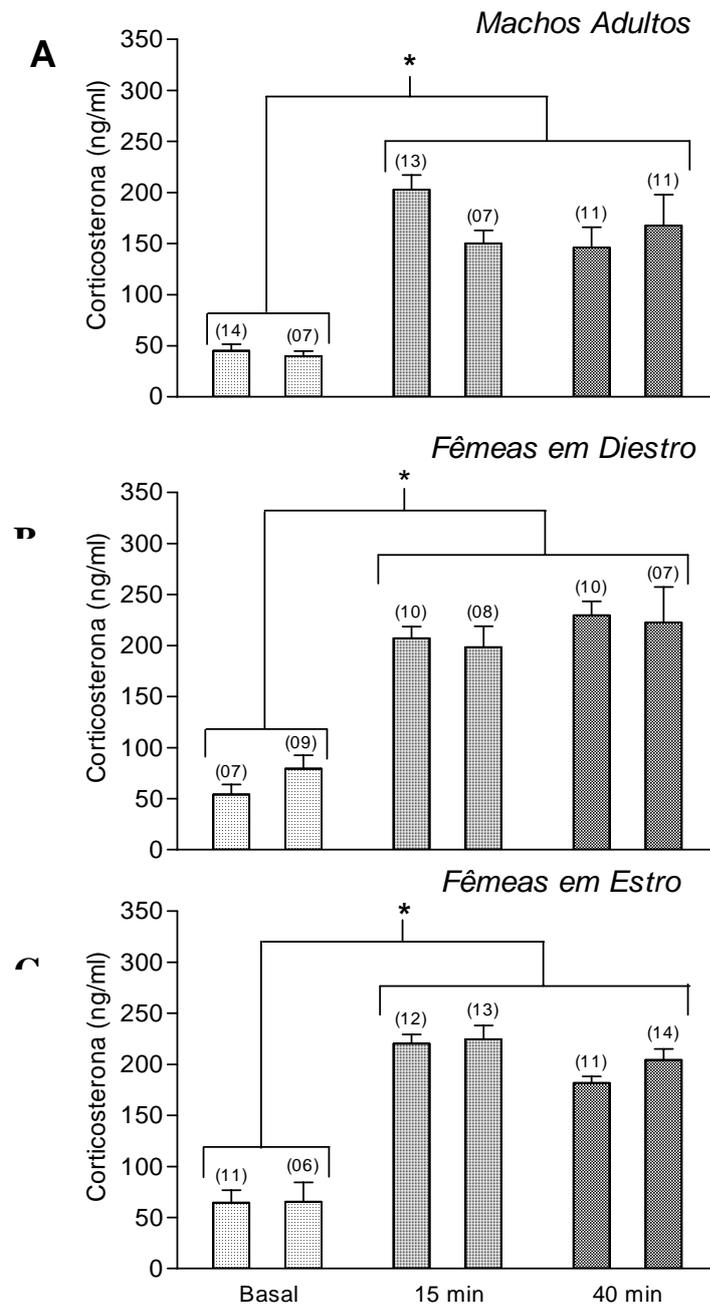
## RESULTADOS

### Experimento 1:

#### **1.a) Efeitos da Manipulação Neonatal sobre a Concentração Plasmática de Corticosterona - Basal e em Resposta ao Estresse por Éter - em Ratos Machos Adultos e Fêmeas em Diestro ou em Estro:**

A **figura 6** mostra o efeito da manipulação neonatal de 1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida sobre a *concentração plasmática de corticosterona* (ng/ml) em ratos adultos: Machos – 6A, Fêmeas em Diestro: 6B e fêmeas em Estro: 6C. Foi observado um efeito principal significativo para o fator estresse (Basal x éter 15 min x éter 40 min) (Fig 6A:  $F(2,57)= 29.88$ ,  $p<0.0001$ ; Fig 6B:  $F(2,45)= 45.17$ ,  $p<0.0001$ ; Fig 6C:  $F(2,61)= 51.03$ ,  $p<0.0001$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para o fator estresse revelou uma significativamente maior concentração plasmática de corticosterona em ambos os grupos de ratos submetidos ao estresse por 1 minuto de vapores de éter (15 min e 40 min), quando comparados aos ratos machos que não foram submetidos ao éter (Basal). Não foram observados efeitos significativos para o fator manipulação neonatal, assim como não houve interação significativa entre manipulação neonatal e estresse por éter sobre a concentração plasmática de corticosterona ( $p> 0,05$ ) nesses grupos.

**Efeito da manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta a estresse por éter em ratos machos adultos e em fêmeas em diestro ou em estro**



**Figura 6** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C). As amostras de sangue foram coletadas por decapitação antes (*Basal*) ou após *estresse* de exposição por 1 minuto a vapores de éter: +14 minutos (*15 min*); ou +39 minutos (*40 min*), às 10:00h do ciclo claro.

Números entre parênteses representam o *n* de cada grupo, e cada par de barras se refere ao grupo não-manipulado e ao grupo manipulado, respectivamente. \* A análise estatística por ANOVA de 2 vias (manipulação x estresse) revelou diferença significativa apenas para o fator estresse ( $p < 0,001$ ).

**1.b) Efeitos da Manipulação Neonatal sobre a secreção de Hormônios Sexuais em ratos Machos adultos e em Fêmeas testadas em Diestro ou em Estro →**

**1.b.1) Gonadotrofinas Plasmáticas (LH e FSH):**

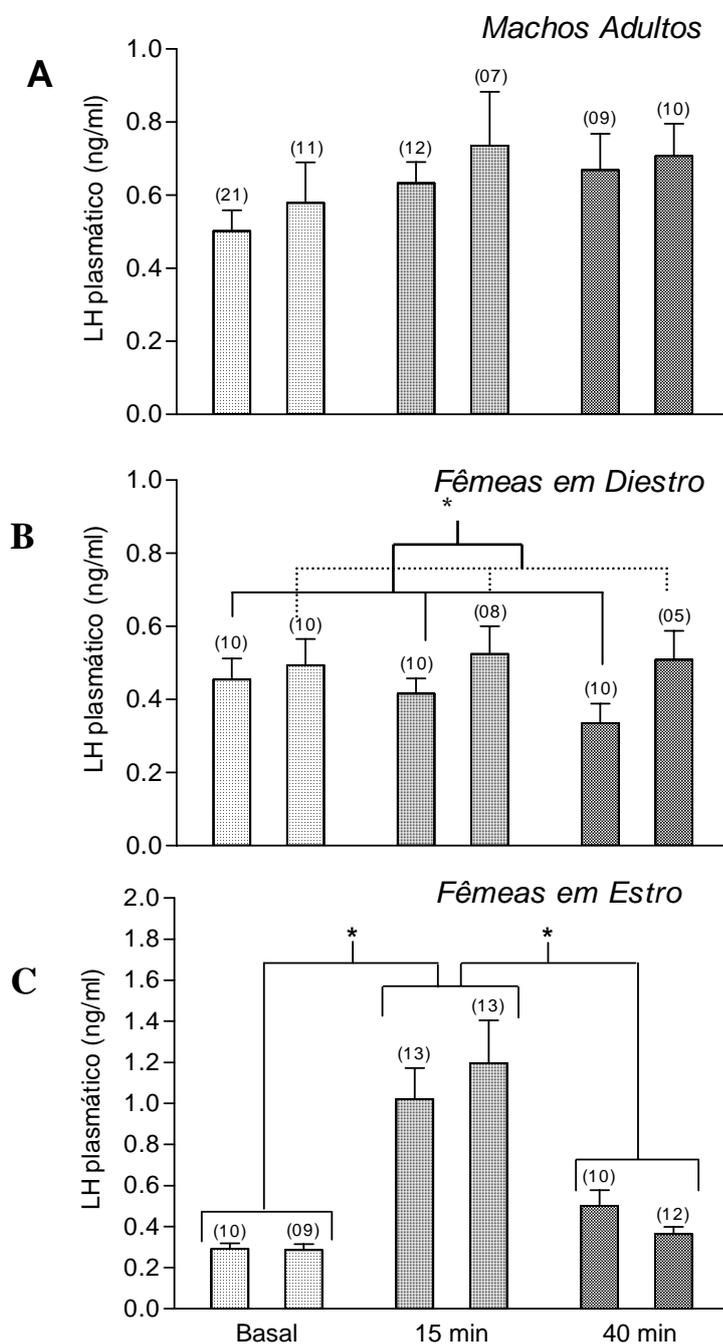
**Concentração Basal e em Resposta ao Estresse por éter**

**LH →**

A **figura 7** mostra o efeito da manipulação neonatal de 1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida sobre a *concentração plasmática de Hormônio Luteinizante (LH) basal e em resposta ao estresse por éter (ng/ml)* em ratos machos adultos e fêmeas testadas em diestro ou em estro.

Não foram observados efeitos significativos para o fator manipulação neonatal (Fig 7A:  $F(1,64) = 0.95, p = 0.33$ ; Fig 7C: , nem para o fator estresse por éter em machos (Fig 7A:  $F(2,64) = 2.00, p = 0.14$ ) ou em fêmeas em diestro (Fig 7B:  $F(2,47) = 0.37, p = 0.69$ ). Em ratas testadas em Diestro, foi observado efeito da manipulação neonatal elevando a concentração de LH em ratas manipuladas (Fig 7B:  $F(1,47) = 4.13, p = 0.048$ ). Em ratas testadas em estro, foi observado efeito principal significativo para o fator estresse por éter (Fig 7C:  $F(2,61) = 24.82, p < 0.0001$ ). Não houve interação significativa entre manipulação neonatal e estresse por éter sobre a concentração plasmática de LH em ratos machos adultos (Fig 7A:  $F(2,64) = 0.06, p = 0.94$ ), em fêmeas em diestro (Fig 7B:  $F(2,47) = 0.53, p = 0.59$ ) ou em fêmeas em estro ( $F(2,61) = 0.81, p = 0.45$ ).

**Efeitos da manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de LH, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratos machos adultos e fêmeas em diestro ou estro**



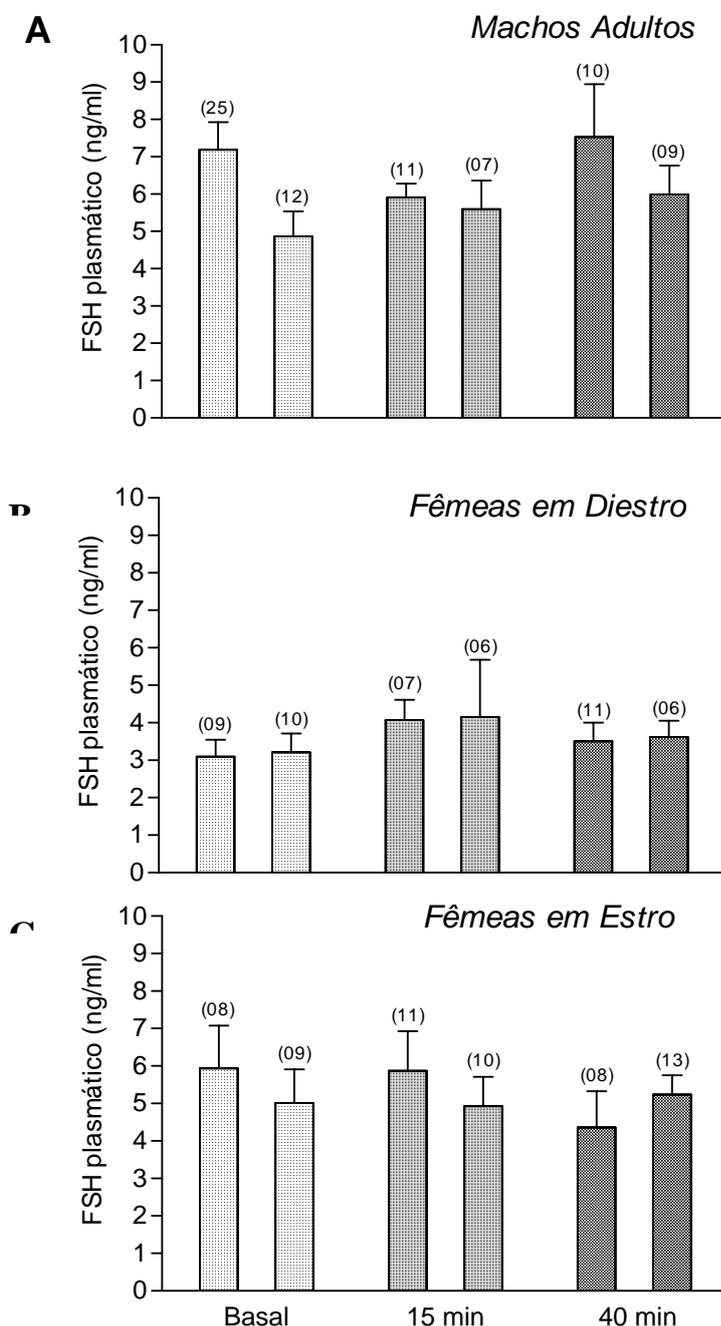
**Figura 7** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de LH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C). As amostras de sangue foram coletadas por decapitação antes (Basal) ou após estresse por exposição por 1 minuto a vapores de éter: +14 minutos (15 min); ou +39 minutos (40 min), às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo, e cada par de barras se refere ao grupo não-manipulado e ao grupo manipulado, respectivamente. A análise estatística por ANOVA de 2 vias (manipulação x estresse) revelou efeito principal significativo para o fator manipulação (B\*) e para o fator estresse (C\*) ( $p < 0.05$ ).

**FSH →**

A **figura 8** mostra o efeito da manipulação neonatal de 1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida sobre a *concentração plasmática de Hormônio Folículo- Estimulante (FSH) basal e em resposta ao estresse por éter (ng/ml)* em ratos machos adultos e fêmeas testadas em diestro ou em estro.

Não foram observados efeitos significativos, nem para para o fator manipulação neonatal (Fig 8A:  $F(1,68) = 3.22, p=0.08$ ; Fig 8B:  $F(1,43) = 0.04, p=0.85$ ; Fig 8C:  $F(1,53) = 0.205, p=0.65$ ), nem para o fator estresse (Fig 8A:  $F(2,68) = 0.53, p=0.59$ ; Fig 8B:  $F(2,43) = 0.99, p=0.38$ ; Fig 8C:  $F(2,53) = 0.34, p=0.71$ ). Não houve interação significativa entre manipulação neonatal e estresse por éter sobre a concentração plasmática de FSH em ratos machos adultos (Fig 8A:  $F(2,68) = 0.59, p=0.55$ ; Fig 8B:  $F(2,43) = 0.0004, p=0.9996$ ; Fig 8C:  $F(2,53) = 0.69, p=0.50$ ).

**Efeitos da manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de LH, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratos machos adultos e em fêmeas em diestro ou em estro**



**Figura 8** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de FSH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas em diestro (B) ou em estro (C). As amostras de sangue foram coletadas por decapitação antes (*Basal*) ou após *estresse* por exposição por 1 minuto a vapores de éter: +14 minutos (*15 min*); ou +39 minutos (*40 min*), às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o *n* de cada grupo, e cada par de barras se refere ao grupo não-manipulado e ao grupo manipulado, respectivamente. ANOVA de 2 vias (manipulação x estresse;  $p > 0,05$ ).

#### 1.b.2) Hormônios Gonadais e Prolactina: Concentração Basal

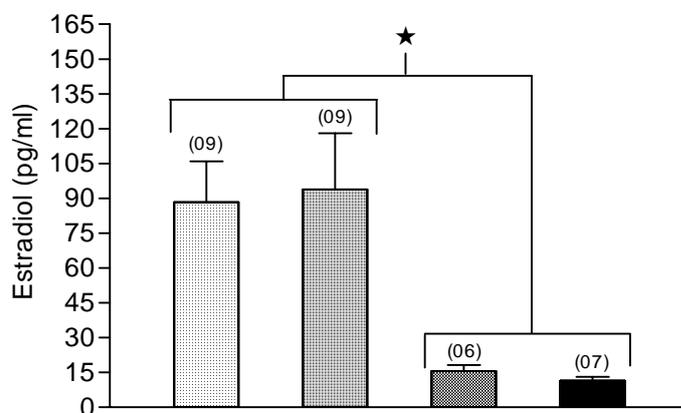
**→ Hormônios Gonadais (Estradiol, Progesterona) e Prolactina em Fêmeas adultas:*****Estradiol (Fig 9A) →***

Foi observado efeito principal significativo para o fator manipulação neonatal ( $F(1,27)=18.87, p=0.0002$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para o fator manipulação revelou uma concentração plasmática basal de Estradiol menor nos grupos de ratas que foram submetidas à manipulação neonatal quando comparadas aos grupos de ratas não manipuladas. Não foram observadas diferenças significativas em função da fase do ciclo testada (diestro x estro) ( $F(1,27)=0.002, p=0.97$ ). Não houve interação significativa entre manipulação neonatal e fase do ciclo sobre a concentração plasmática basal de estradiol em ratas fêmeas adultas ( $F(1,27)=0.07, p=0.79$ ).

**Progesterona (Fig 9B)→**

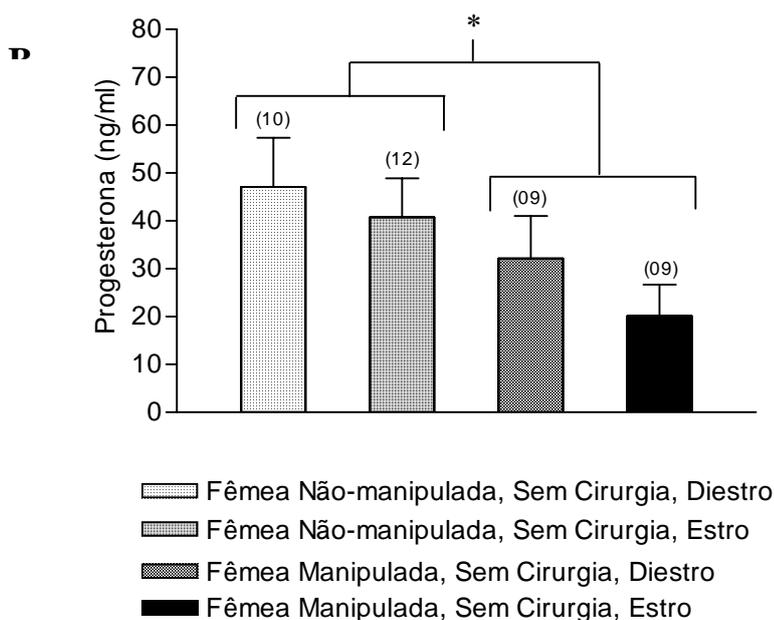
Foi observado efeito principal significativo para o fator manipulação neonatal ( $F(1,36)=4.15, p=0.048$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para o fator manipulação revelou uma concentração plasmática basal de progesterona menor nos grupos de ratas que foram submetidas à manipulação neonatal quando comparadas aos grupos de ratas não manipuladas. Não foram observadas diferenças significativas em função da fase do ciclo testada (diestro x estro) ( $F(1,36)=1.09, p=0.30$ ). Não houve interação significativa entre manipulação neonatal e fase do ciclo sobre a concentração plasmática basal de progesterona em ratas fêmeas adultas ( $F(1,36)=0.10, p=0.75$ ).

### Efeitos da manipulação neonatal sobre a concentração plasmática basal de Estradiol e de Progesterona em ratas fêmeas adultas em diestro ou estro



**A**

**Figura 9** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Estradiol (pg/ml) (A) e de Progesterona (ng/ml) (B) em ratas adultas em diestro ou em estro. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o *n* de cada grupo. A análise estatística por ANOVA de 2 vias (manipulação x fase do ciclo) revelou efeito principal significativo para a manipulação ( $p < 0,05$ ).

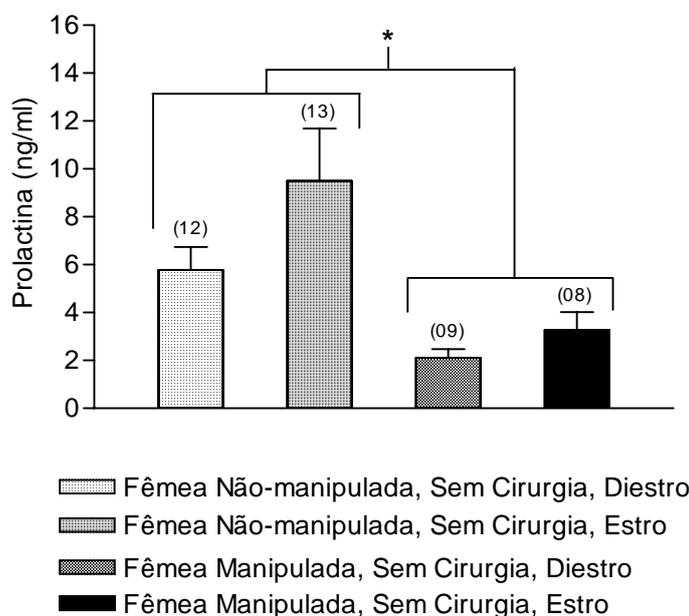


**B**

□ Fêmea Não-manipulada, Sem Cirurgia, Diestro  
 ▨ Fêmea Não-manipulada, Sem Cirurgia, Estro  
 ▩ Fêmea Manipulada, Sem Cirurgia, Diestro  
 ■ Fêmea Manipulada, Sem Cirurgia, Estro

**Prolactina (Fig 10)→**

Foi observado efeito principal significativo para o fator manipulação neonatal ( $F(1,38)=10.37$ ,  $p=0.0026$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para o fator manipulação revelou uma concentração plasmática basal de prolactina menor nos grupos de ratas que foram submetidas à manipulação neonatal quando comparadas aos grupos de ratas não manipuladas. Não foram observadas diferenças significativas em função da fase do ciclo testada (diestro x estro) ( $F(1,38)=2.51$ ,  $p=0.12$ ). Não houve interação significativa entre manipulação neonatal e fase do ciclo sobre a concentração plasmática basal de prolactina em ratas fêmeas adultas ( $F(1,38)=0.69$ ,  $p=0.41$ ).



**Figura 10** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Prolactina (ng/ml) em ratas adultas em diestro ou em estro. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o  $n$  de cada grupo. \*A análise estatística por ANOVA de 2 vias (manipulação x fase do ciclo) revelou efeito principal significativo para a manipulação ( $p < 0,001$ ).

**→ Hormônio Gonadal (Testosterona) e Prolactina em Ratos Machos Adultos:**

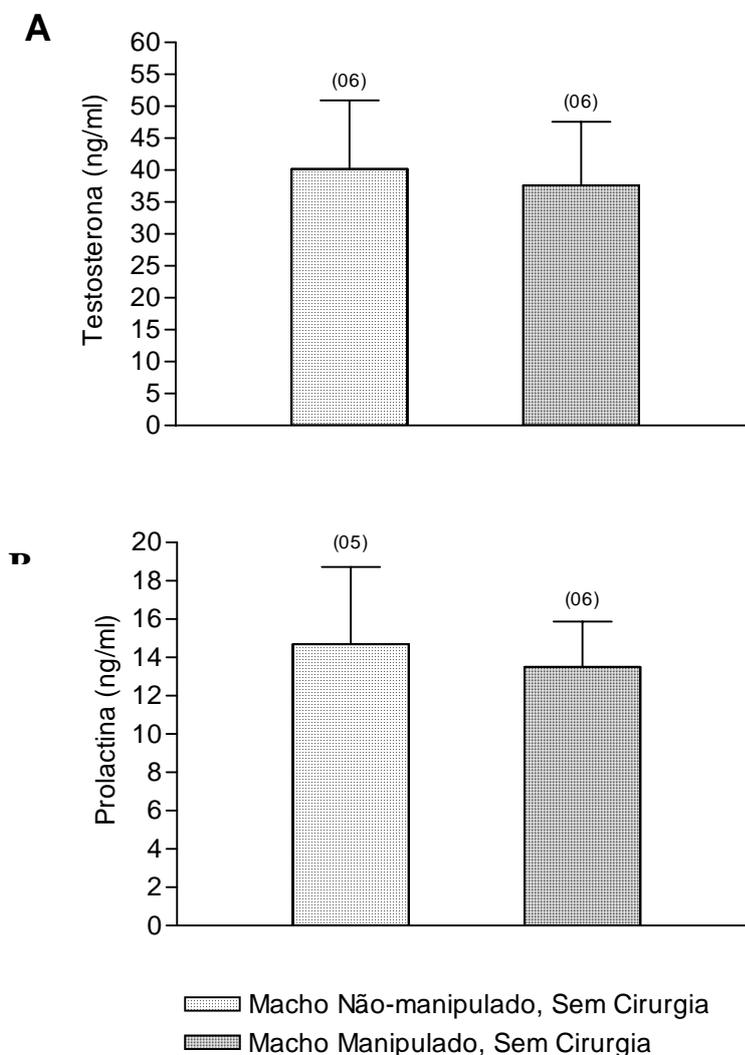
**Testosterona (Fig 11A)→**

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de ratos controle e o grupo de ratos manipulados no período neonatal através da análise do teste *t* de Student ( $p=0.87$ ).

**Prolactina (Fig 11B)→**

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de ratos controle e o grupo de ratos manipulados no período neonatal através da análise do teste *t* de Student ( $p=0.80$ ).

### Efeitos da manipulação neonatal sobre a concentração plasmática basal de Testosterona e de Prolactina em ratos machos adultos



**Figura 11** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) sobre a concentração plasmática de Testosterona (ng/ml) (A) e de Prolactina (ng/ml) (B) em ratos machos adultos. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o  $n$  de cada grupo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Teste  $t$  de Student;  $p > 0,05$ ).

## RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2:

### 2.a) Corticosterona Plasmática - Basal e em Resposta ao Estresse por Éter - Ratos Machos e Fêmeas Adultos:

#### *Efeitos da Gonadectomia antes de 6h e da Manipulação neonatal*

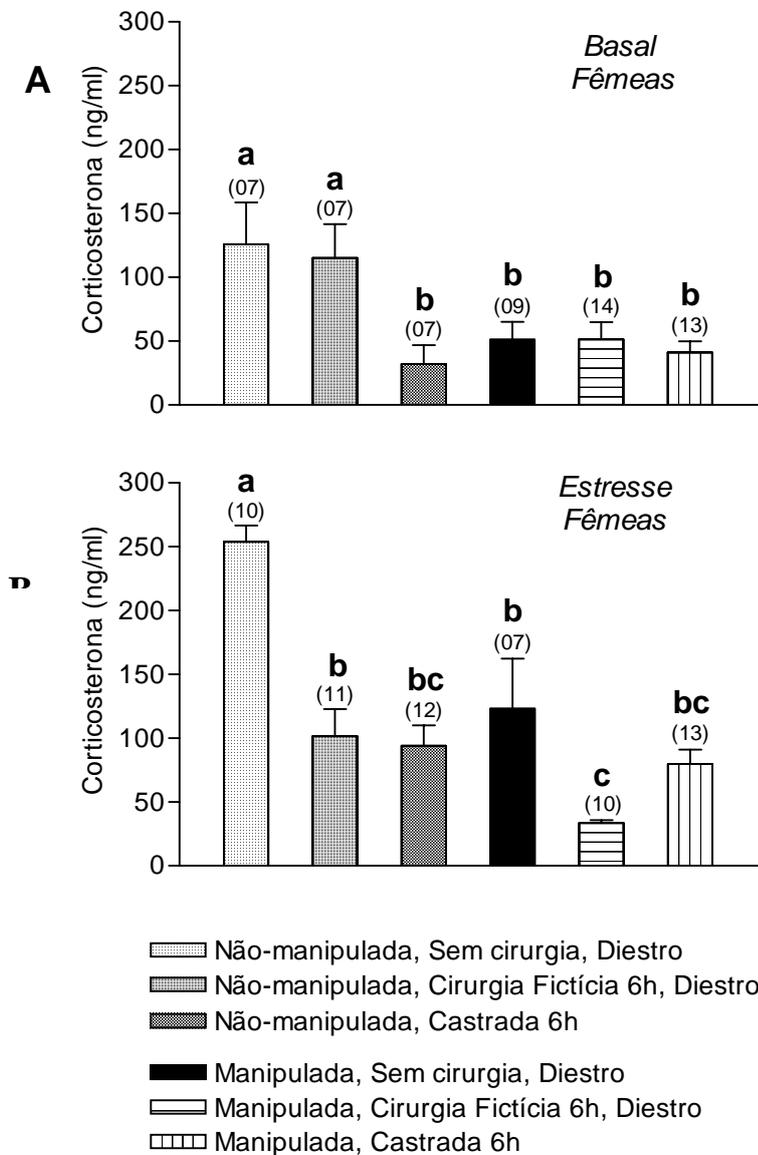
##### Corticosterona Basal em fêmeas (Fig 12A)

Efeitos principais significativos foram observados em função do grupo: *manipulação* (não-manipuladas x manipuladas) ( $F(1,51)=8.68, p<0.01$ ); da *cirurgia* (sem cirurgia, cirurgia fictícia 6h e gonadectomia 6h) ( $F(2,51)=5.15, p<0.01$ ); assim a *interação* entre manipulação e cirurgia ( $F(2,51)=3.26, p<0.05$ ) foram observados. A análise post hoc mostrou que o efeito principal para grupo/manipulação revelou uma concentração plasmática basal de corticosterona significativamente menor em ratas manipuladas comparadas a fêmeas não-manipuladas. O efeito principal para cirurgia revelou uma menor concentração plasmática basal de corticosterona em ratas gonadectomizadas 6h comparadas a fêmeas sem cirurgia ou com cirurgia fictícia 6h.

##### Resposta de Corticosterona ao Estresse por Éter em fêmeas (Fig 12B)

Efeitos principais significativos foram observados para grupo: *manipulação* ( $F(1,57)=23.65, p<0.01$ ); *cirurgia* ( $F(2,57)=23.51, p<0.01$ ); e *interação* entre grupo e cirurgia ( $F(2,57)=5.27, p=0.01$ ) foram observados. A análise post hoc mostrou que o efeito principal para grupo/manipulação revelou uma significativamente menor concentração plasmática de corticosterona em resposta ao estresse em ratas manipuladas comparadas a não-manipuladas. O efeito principal para cirurgia revelou menor concentração de corticosterona em resposta ao éter em ratas submetidas à cirurgia (fictícia ou gonadectomia 6h) quando comparadas a fêmeas sem cirurgia. A interação entre manipulação e cirurgia revelou significativamente menor concentração plasmática de corticosterona em resposta ao estresse em ratas submetidas à cirurgia fictícia e manipuladas quando comparadas às fêmeas manipuladas que não sofreram cirurgia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). A recuperação da resposta de corticosterona em ratas manipuladas gonadectomizadas, comparadas às fêmeas também manipuladas, mas submetidas à cirurgia fictícia, foi praticamente significativo.

**Efeitos da interação entre Manipulação neonatal e Gonadectomia antes de 6h de vida sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratas adultas**



**Figura 12** - Efeito da manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e da castração antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratas adultas. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação, sem (*Basal*) (A) ou após estresse (*Estresse*: 14 minutos após exposição durante 1 minuto a vapores de éter) (B), às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o *n* de cada grupo. Letras diferentes representam médias

estatisticamente diferentes. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Gonadectomia 6h), seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

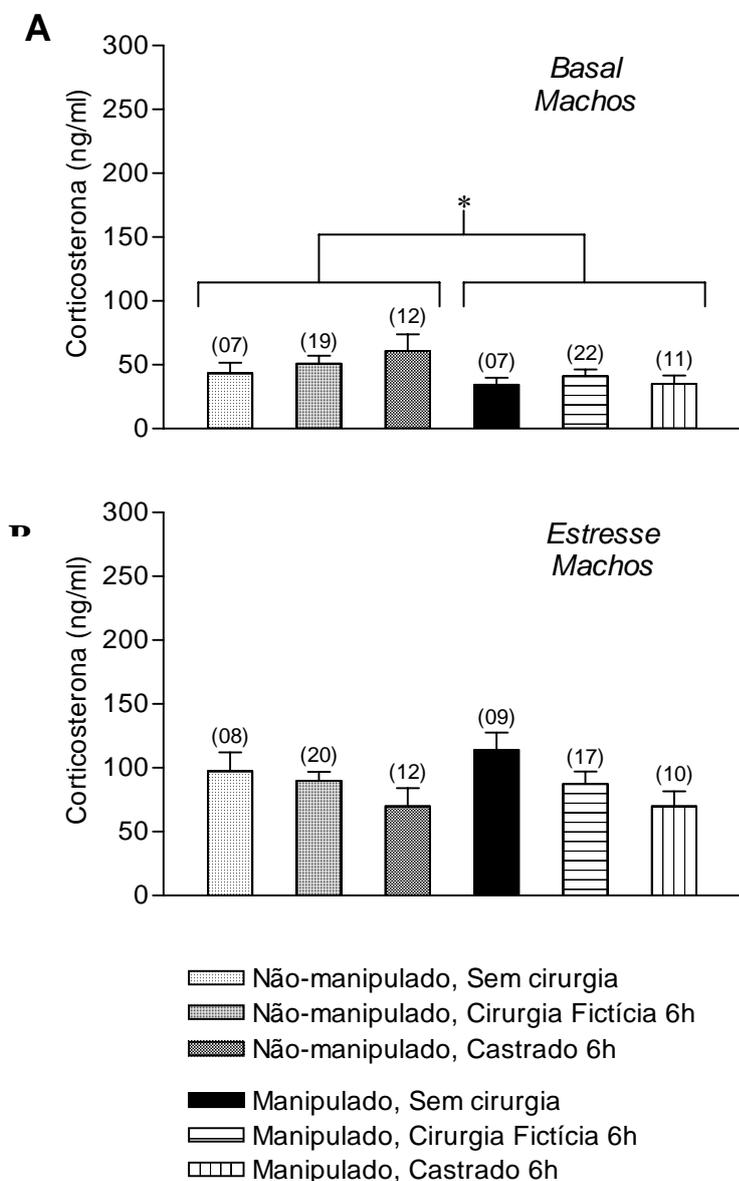
***Corticosterona Plasmática em Machos →******Corticosterona Basal em machos (Fig 13)***

Efeito principal significativo foi observado para grupo: *manipulação* (não-manipulados x manipulados) ( $F(1,72)=4.52, p=0.049$ ), mas não para cirurgia ( $F(2,52)=0.505$ ) foi observado. A análise post hoc mostrou que o efeito principal para manipulação revelou uma redução significativa da concentração plasmática de corticosterona em condições basais em ratos manipulados quando comparados aos não-manipulados. Não foram detectadas interações significativas entre manipulação e cirurgia ( $F(2,52)=0.68$ ).

***Resposta de Corticosterona ao Estresse por Éter em machos (Fig 13B)***

Não foram observados efeitos principais significativos para manipulação ( $F(1,71)=1.08$ ) ou cirurgia ( $F(2,71)=1.37$ ). Não foram detectadas interações significativas entre grupo e cirurgia ( $F(2,71)=0.52$ ).

**Efeitos da interação entre Manipulação neonatal e Gonadectomia antes de 6 h de vida sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratos machos adultos**



**Figura 13** - Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos adultos. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação, sem (Basal) (A) ou após estresse (Estresse: 14 minutos após exposição durante 1 minuto a vapores de éter) (B), às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo. \* Efeito principal para manipulação neonatal ( $p=0,049$ ). Não foram observadas interações significativas (ANOVA de 2 vias: Manipulação neonatal x Gonadectomia 6h;  $p>0,05$ ).

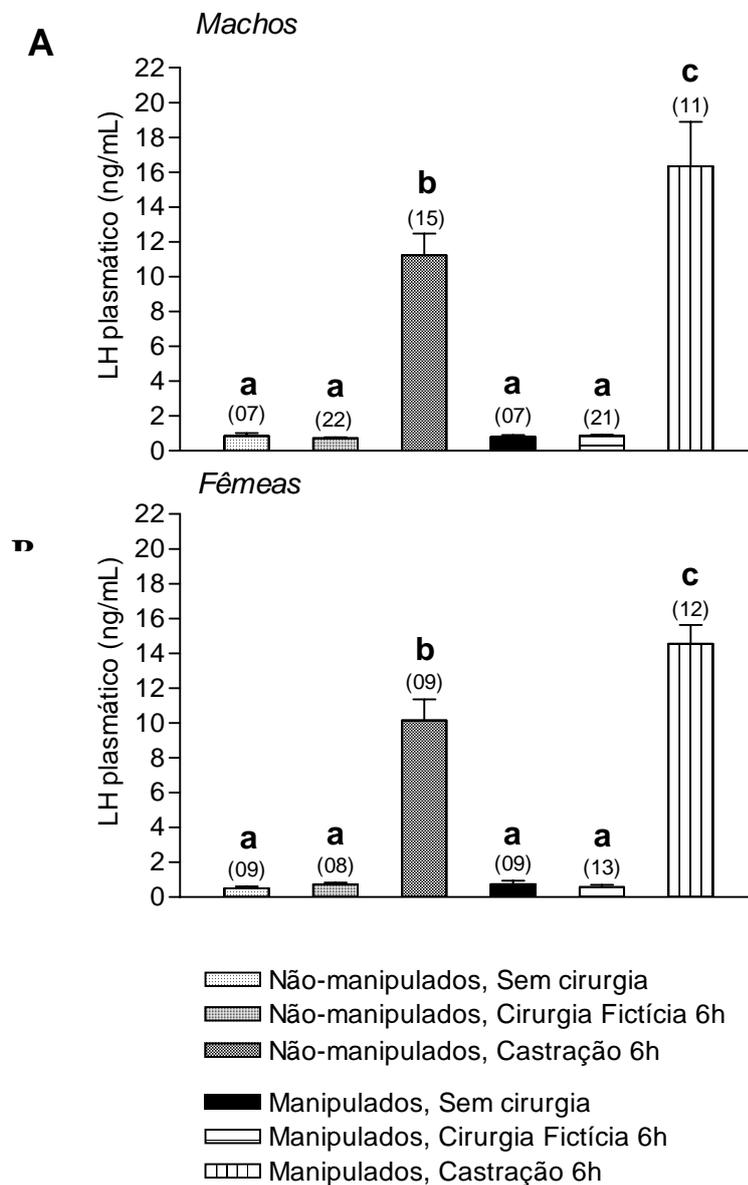
**2.b) Concentração Plasmática Basal de Gonadotrofinas (LH e FSH) e de Hormônios Gonadais (Estradiol, Progesterona e Testosterona) em Ratos Machos e Fêmeas Adultos: Efeitos da Gonadectomia antes de 6h e da Manipulação neonatal**

Concentração plasmática de LH em machos (Fig 14A)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia (sem cirurgia x cirurgia fictícia x gonadectomia antes de 6 h de vida) ( $F(2,77)=107.96$ ,  $p<0.0001$ ) e quase significativos para o fator manipulação (não-manipulados x manipulados) ( $F(1,77)=3.66$ ,  $p=0.059$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de LH significativamente maior em ratos gonadectomizados antes de 6 horas de vida, quando comparados aos machos submetidos à cirurgia fictícia ou mantidos sem cirurgia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Foi detectada interação significativa entre manipulação e cirurgia neonatal sobre a concentração de LH em ratos machos adultos ( $F(2,77)=4.04$ ,  $p=0.021$ ). A análise post hoc revelou aumento significativo do LH plasmático em ratos machos adultos que foram submetidos a ambos os procedimentos, castração e manipulação neonatal, quando comparados aos machos castrados, não-manipulados (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p=0.0018$ ).

Concentração plasmática de LH em fêmeas (Fig 14B)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia (sem cirurgia x cirurgia fictícia x gonadectomia antes de 6 h de vida) ( $F(2,54)=187.88$ ,  $p<0.0001$ ) e para o fator manipulação (não-manipuladas x manipuladas) ( $F(1,54)=6.75$ ,  $p=0.012$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de LH significativamente maior em ratas gonadectomizadas antes de 6 horas de vida, quando comparadas às fêmeas submetidas à cirurgia fictícia ou mantidas sem cirurgia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). E o efeito principal para manipulação mostrou concentração plasmática de LH significativamente maior em ratas manipuladas quando comparadas às fêmeas não-manipuladas (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Interação significativa foi detectada entre manipulação e cirurgia neonatal em fêmeas adultas ( $F(2,54)=6.54$ ,  $p=0.0028$ ). A análise post hoc revelou concentração plasmática de LH significativamente mais elevada em ratas submetidas tanto à ovariectomia quanto à manipulação neonatal, quando comparadas às fêmeas ovariectomizadas mantidas sem a manipulação neonatal (Newman-Keuls,  $p=0.00016$ ).



**Figura 14** - Efeito da interação entre castração manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de LH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas (B). As amostras de sangue foram coletadas por decapitação às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Gonadectomia 6h), seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

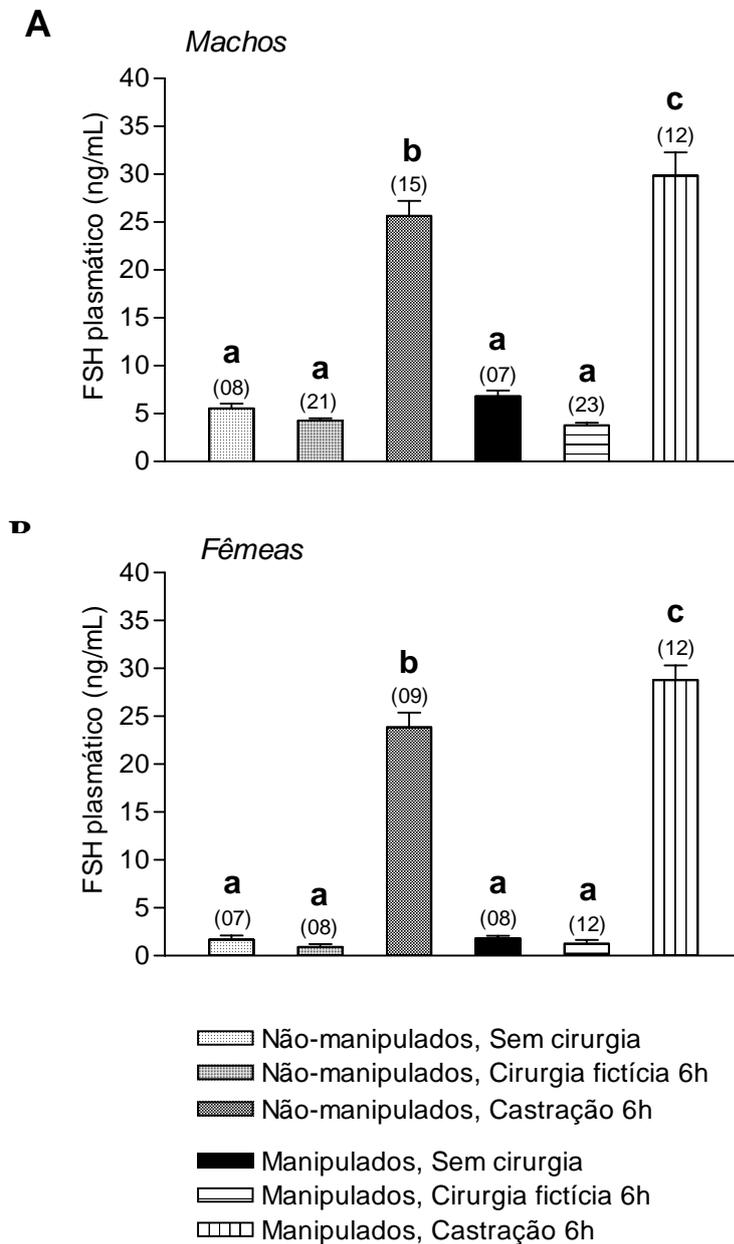
### Concentração plasmática de FSH em machos (Fig 15A)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia ( $F(2,78)=314.55$ ,  $p<0.0001$ ) e para o fator manipulação neonatal ( $F(1,78)=6.19$ ,  $p=0.015$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de FSH significativamente maior em ratos gonadectomizados antes de 6 horas de vida, quando comparados aos machos submetidos à cirurgia fictícia ou mantidos sem cirurgia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Foi detectada interação significativa entre manipulação e cirurgia neonatal sobre a concentração de FSH em ratos machos adultos ( $F(2,78)=6.02$ ,  $p=0.0037$ ). A análise post hoc revelou aumento significativo do FSH plasmático em ratos machos adultos que foram submetidos a ambos os procedimentos, castração e manipulação neonatal, quando comparados aos machos castrados, não-manipulados (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p=0.00036$ ).

### Concentração plasmática de FSH em fêmeas (Fig 15B)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia (sem cirurgia x cirurgia fictícia x gonadectomia antes de 6 h de vida) ( $F(2,49)=372.15$ ,  $p<0.0001$ ) e para o fator manipulação neonatal (não-manipuladas x manipuladas) ( $F(1,49)=4.08$ ,  $p=0.049$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de FSH significativamente maior em ratas gonadectomizadas antes de 6 horas de vida, quando comparadas às fêmeas submetidas à cirurgia fictícia ou mantidas sem cirurgia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). E o efeito principal para manipulação mostrou concentração plasmática de FSH significativamente maior em ratas manipuladas quando comparadas às fêmeas não-manipuladas (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Interação significativa foi detectada entre manipulação e cirurgia neonatal em fêmeas adultas ( $F(2,49)=3.29$ ,  $p=0.045$ ). A análise post hoc revelou concentração plasmática de FSH significativamente mais elevada em ratas submetidas tanto à ovariectomia quanto à manipulação neonatal, quando comparadas às fêmeas ovariectomizadas mantidas sem o procedimento de manipulação neonatal (Newman-Keuls test,  $p=0.0027$ ).

**Efeitos da interação entre Manipulação neonatal e Gonadectomia antes de 6h de vida sobre a concentração plasmática basal de FSH em ratos machos e fêmeas adultos**



**Figura 15** - Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de FSH (ng/ml) em ratos adultos machos (A) e fêmeas

(B). As amostras de sangue foram coletadas por decapitação às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Gonadectomia 6h), seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### Efeitos da interação entre Manipulação Neonatal e Gonadectomia antes de 6h de vida sobre a concentração plasmática basal de Estradiol e de Progesterona em ratas adultas

**Tabela 2** . Efeito da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de Estradiol ( $E_2$ ) (pg/ml) e Progesterona (P) (ng/ml) em ratas fêmeas adultas.

Grupos de Fêmeas	Estradiol (pg/mL)	Progesterona (ng/mL)
Não-manipulada, Sem cirurgia, Diestro ( $n=8;10$ )	13,82±5,19 <sup>a</sup>	8,48±1,99 <sup>a</sup>
Não-manipulada, Cirurgia Fictícia 6h, Diestro ( $n=10;11$ )	14,22±3,97 <sup>a</sup>	7,82±2,12 <sup>a</sup>
Não-manipulada, Ovariectomia 6h ( $n=10;8$ )	<i>Valor não-detectado</i>	0,64±0,25 <sup>b</sup>
Manipulada, Sem cirurgia, Diestro ( $n=10;10$ )	7,61±1,23 <sup>a</sup>	6,12±0,92 <sup>a</sup>
Manipulada, Cirurgia Fictícia 6h, Diestro ( $n=14;17$ )	10,63±1,63 <sup>a</sup>	7,66±1,19 <sup>a</sup>
Manipulada, Ovariectomia 6h ( $n=10;10$ )	<i>Valor não-detectado</i>	0,58±0,18 <sup>b</sup>

Amostras de sangue coletadas às 10h. Dados expressos como média±EPM. Letras iguais representam medias estatisticamente semelhantes ( $P > 0,05$ ). O número entre parênteses representa o ( $n$ ) de animais em cada grupo. ANOVA de 2 vias (ManipulaçãoXCirurgia) seguida de teste post hoc de Newman-Keuls. Nível de significância estabelecido de  $P < 0,05$ .

### Efeitos da interação entre Manipulação Neonatal e Gonadectomia antes de 6h de vida sobre a concentração plasmática basal de Testosterona em ratos adultos

**Tabela 3 .** Efeitos da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento sobre a concentração plasmática basal de Testosterona (T) (ng/ml) em ratos machos adultos.

Grupos de Machos	Testosterona (ng/mL)
Não-manipulado, Sem cirurgia (n=6)	40,15±10,77 <sup>a</sup>
Não-manipulado, Cirurgia Fictícia 6h (n=21)	39,29±06,70 <sup>a</sup>
Não-manipulado, Orquidectomia 6h (n=12)	<i>Valor não-detectado</i>
Manipulado, Sem Cirurgia (n=6)	37,65±09,94 <sup>a</sup>
Manipulado, Cirurgia Fictícia 6h (n=18)	37,49±06,68 <sup>a</sup>
Manipulado, Orquidectomia 6h (n=10)	<i>Valor não-detectado</i>

Amostras de sangue coletadas às 10h. Dados expressos como média±EPM. Letras iguais representam medias estatisticamente semelhantes ( $P > 0,05$ ). O número entre parênteses representa o (*n*) de animais em cada grupo. ANOVA de 2 vias (ManipulaçãoXCirurgia) seguida de teste post hoc de Newman-Keuls. Nível de significância estabelecido de  $P < 0,05$ .

**RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3:****3.a) Corticosterona plasmática - Basal e em Resposta ao Estresse por Éter:**

*Ratos Machos testados aos 120 dias de vida:*

*Efeitos da Manipulação neonatal e da Gonadectomia aos 80 dias de idade*

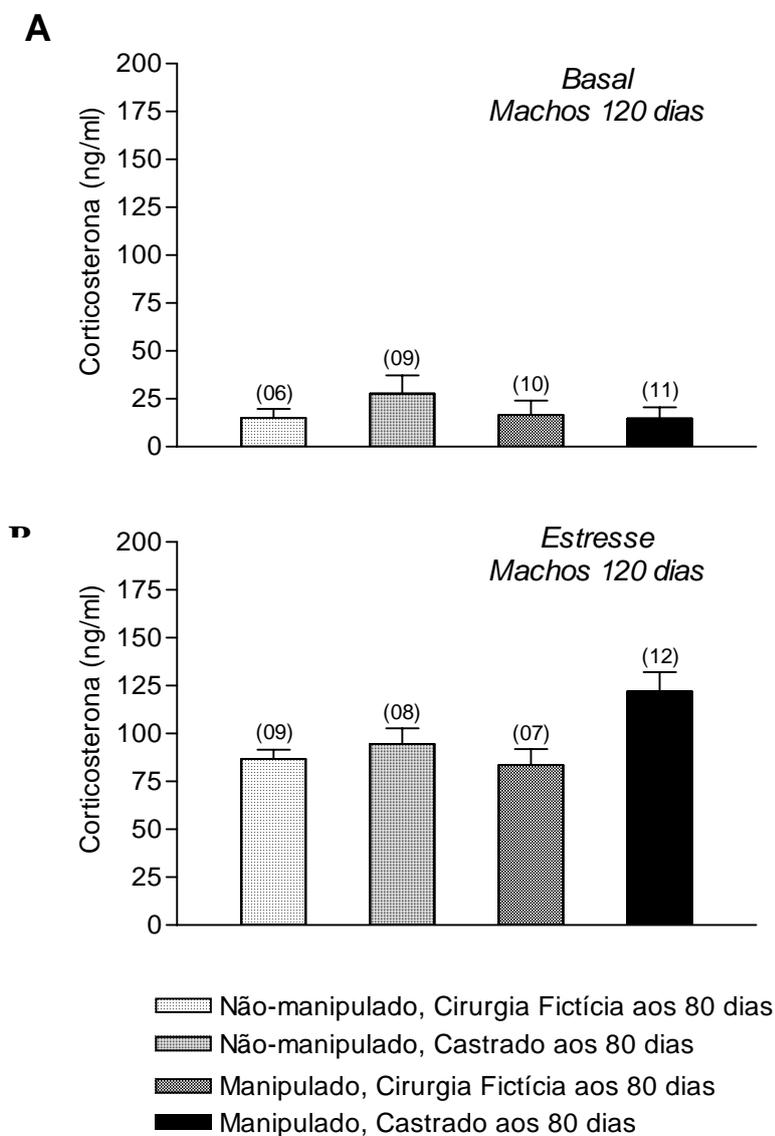
Corticosterona Basal em ratos machos adultos (cirurgia aos 80 dias) (Fig 16A)

Não foram observados efeitos principais nem para manipulação neonatal ( $F(1,29)=0.63$ ,  $p=0.43$ ), nem para cirurgia (cirurgia fictícia x castração aos 80 dias) ( $F(1,29)=0.38$ ,  $p=0.54$ ). Não foram detectadas interações significativas entre os fatores testados (manipulação x cirurgia em adulto) ( $F(1,29)=0.74$ ,  $p=0.40$ ).

Corticosterona em resposta ao estresse por éter em ratos machos adultos (cirurgia aos 80 dias) (Fig 16B)

Foi observado efeito principal significativo para cirurgia (cirurgia fictícia x castração aos 80 dias) ( $F(1,33)=6.27$ ,  $p=0.017$ ), mas não para manipulação neonatal ( $F(1,33)=0.02$ ,  $p=0.90$ ). Não foram detectadas interações significativas entre os fatores testados (manipulação x cirurgia em adulto) ( $F(1,33)=0.12$ ,  $p=0.72$ ).

**Efeitos da interação entre Manipulação Neonatal e Gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter em ratos machos**



**Figura 16** - Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) em ratos machos. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação, sem (Basal) (A) ou após estresse (Estresse: 14 minutos após exposição durante 1 minuto a vapores de éter) (B), às 10:00h do ciclo claro. Os números

entre parênteses representam o n de cada grupo. Não foram observadas interações significativas entre os fatores testados, em cada condição. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Gonadectomia aos 80 dias)  $p > 0,05$ .

### 3.b) Concentração Plasmática Basal de Gonadotrofinas (LH e FSH) e de Testosterona

*Ratos Machos aos 120 dias de vida:*

#### *Efeitos da Manipulação neonatal e da Gonadectomia aos 80 dias de idade*

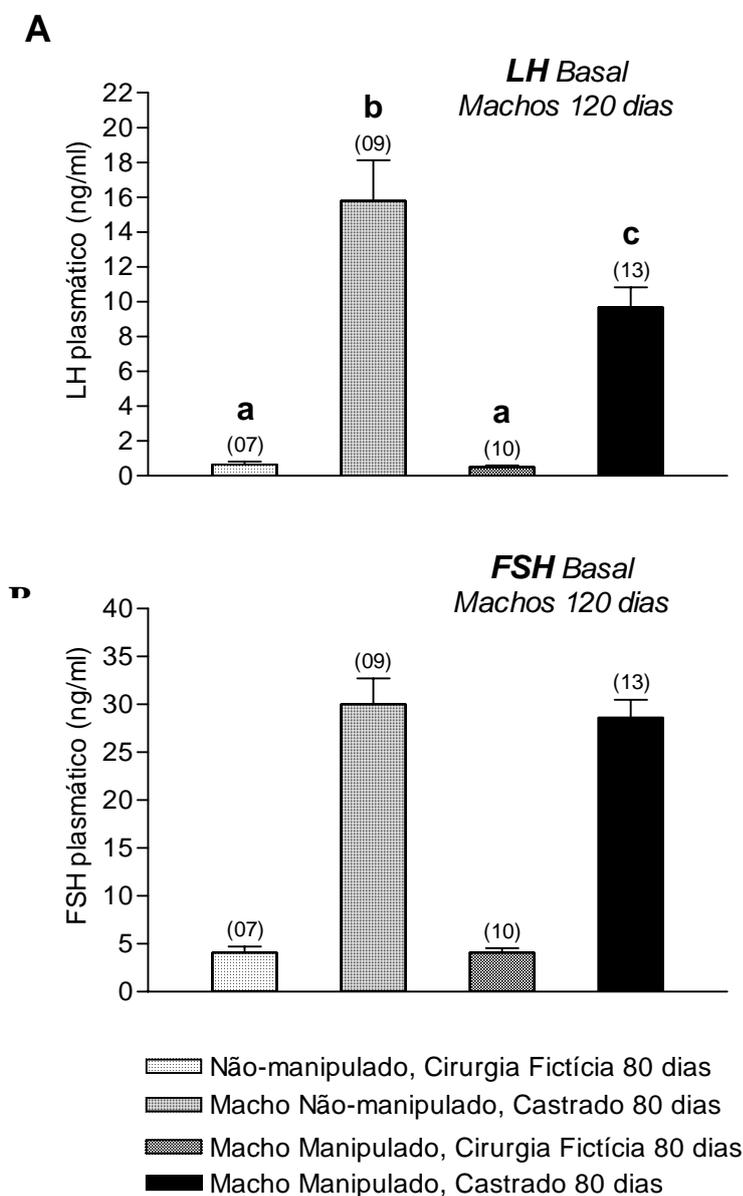
##### Concentração plasmática de LH em machos (Fig 17A)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia (cirurgia fictícia x gonadectomia aos 80 dias de vida) ( $F(1,35)=78.96, p<0.0001$ ) e para o fator manipulação neonatal (não-manipulados x manipulados) ( $F(1,35)=5.25, p=0.028$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de LH significativamente maior em ratos gonadectomizados aos 80 dias de vida, quando comparados aos machos submetidos à cirurgia fictícia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Foi detectada interação significativa entre manipulação neonatal e cirurgia em adulto sobre a concentração de LH em ratos machos ( $F(1,35)=4.75, p=0.036$ ). A análise post hoc revelou aumento significativamente menor do LH plasmático de ratos machos adultos submetidos a ambos os procedimentos, manipulação neonatal e castração aos 80 dias de idade, quando comparados aos machos castrados que não haviam sido manipulados no período neonatal (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p=0.0022$ ).

##### Concentração plasmática de FSH em machos (Fig 17B)

Foram observados efeitos principais significativos para o fator cirurgia ( $F(1,35)=188.87, p<0.0001$ ), mas não para o fator manipulação neonatal ( $F(1,35)=0.14, p=0.71$ ). A análise post hoc mostrou que o efeito principal para cirurgia revelou concentração plasmática de FSH significativamente maior em ratos gonadectomizados aos 80 dias, quando comparados aos machos submetidos à cirurgia fictícia (Teste post hoc de Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Não foi observada interação significativa entre manipulação neonatal e cirurgia em adulto sobre a concentração de FSH em ratos machos ( $F(1,35)=0.15, p=0.70$ ).

**Efeitos da interação entre Manipulação Neonatal e Gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática basal de Gonadotrofinas em ratos machos**



**Figura 17** - Efeito da interação entre manipulação neonatal (1 minuto por dia durante os 10 primeiros dias de vida) e gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática basal de hormônio luteinizante - LH (ng/ml) (A) e de hormônio folículo estimulante - FSH (ng/ml) (B) em ratos machos. As amostras de sangue foram coletadas por decapitação, às 10:00h do ciclo claro. Os números entre parênteses

representam o n de cada grupo. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Gonadectomia aos 80 dias), seguida de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### Efeitos da interação entre Manipulação Neonatal e Gonadectomia aos 80 dias de idade sobre a concentração plasmática de Testosterona (T) em ratos machos

**Tabela 4 .** Efeitos da interação entre manipulação neonatal (do 1° ao 10° dia) e gonadectomia após a puberdade (aos 80 dias de idade) sobre a concentração plasmática basal de Testosterona (T) (ng/ml) em ratos machos de 120 dias de vida.

Grupos de Machos	Testosterona (ng/mL)
Não-manipulado, Cirurgia Fictícia 80 dias ( $n=07$ )	30,45±8,72 <sup>a</sup>
Não-manipulado, Orquidectomia 80 dias ( $n=09$ )	Valor não-detectado
Manipulado, Cirurgia Fictícia 80 dias ( $n=08$ )	29,09±6,02 <sup>a</sup>
Manipulado, Orquidectomia 80 dias ( $n=13$ )	Valor não-detectado

Amostras de sangue coletadas aos 120 dias, às 10h do ciclo claro. Dados expressos como média±EPM. Letras iguais representam medias estatisticamente semelhantes ( $P > 0,05$ ). O número entre parênteses representa o ( $n$ ) de animais em cada grupo. ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal x Cirurgia aos 80 dias). Nível de significância estabelecido de  $P < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Nesta parte, serão discutidos primeiro os resultados obtidos no **Experimento 1**: Efeitos da interação entre manipulação neonatal (durante os 10 primeiros dias de vida) e diferentes fases do ciclo estral em ratos adultos machos ou em fêmeas testadas em diestro ou em estro, sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e de gonadotrofinas (LH e FSH), basais e em resposta ao estresse por éter (**1a**); e sobre a concentração plasmática basal de hormônios gonadais (Estradiol, Progesterona e Testosterona) e de Prolactina (**1b**). A seguir, serão discutidos os resultados do **Experimento 2**: Efeitos da interação entre manipulação neonatal e gonadectomia antes de 6 horas após o nascimento em ratos machos e fêmeas, sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter (**2a**); e sobre a concentração plasmática basal de gonadotrofinas (LH e FSH) e de hormônios gonadais (Estradiol, Progesterona e Testosterona) (**2b**). E, por fim, serão discutidos os resultados do **Experimento 3**: Efeitos da interação entre manipulação neonatal e gonadectomia na idade adulta (aos 80 dias), em ratos machos, sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter (**3a**); e sobre a concentração plasmática de gonadotrofinas (LH e FSH) e de Testosterona (**3b**).

## *Experimento 1-*

### *1.a) Efeitos da Manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou em estro*

Não foram observadas diferenças significativas na concentração plasmática basal de corticosterona em função da manipulação neonatal, tanto em machos quanto em fêmeas em diestro ou em estro. Esses resultados estão de acordo com trabalhos prévios os quais mostraram que a atividade basal do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenais não foi alterada pela manipulação neonatal (para revisões ver Denenberg, 1964; Levine et al., 1994; Levine, 2001). Ou seja, vários resultados prévios sugerem que a estimulação no período neonatal afeta a atividade do eixo quando são testadas reações a estresse, e não a atividade basal. A atividade do eixo HPA é normalmente controlada por mecanismos de feedback envolvendo a ligação dos glicocorticóides nos seus receptores presentes em áreas superiores as quais atuam sobre o hipotálamo, inibindo a secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH). Como foi observado em estudos prévios, a manipulação neonatal pode modificar a densidade desses receptores principalmente no hipocampo e córtex frontal, regiões importantes no controle da dinâmica de secreção do eixo HPA (Francis et al., 1994; Meaney, 1994; Sapolsky, 1994).

Quando testados em resposta ao estresse, a exposição a vapores de éter provocou aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona nos animais controles e essa resposta foi semelhante nos animais manipulados, tanto no caso dos ratos machos quanto nas fêmeas, testadas em diestro ou em estro. Isto é, não foram observadas diferenças significativas na resposta de corticosterona ao estresse por éter, nem em função da manipulação neonatal nem da fase do ciclo.

A ausência do efeito atenuante da manipulação neonatal sobre a resposta da corticosterona ao éter pode revelar que as alterações provocadas pela manipulação neonatal

na atividade de resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais dependem do estressor (Thrivikraman et al., 2000). Esse aspecto deve ser considerado, pois, quando submetidos ao éter, os ratos manipulados não apresentaram atenuação da secreção de corticosterona, anteriormente observada em resposta a outros estímulos estressantes, como por exemplo, contenção (Ogawa et al., 1994; Meaney et. al, 1994b; Pryce et al. 2001), ou exposição ao campo aberto (Fernández-Teruel et. al, 2002). Deve-se considerar que a exposição ao éter pode causar irritação de mucosas e também asfixia, relatadas em humanos (Nihlén et al., 1998), aumento do metabolismo de monoaminas, como dopamina e noradrenalina no núcleo arqueado e serotonina no núcleo supraquiasmático, observado em ratos (Johnston et al., 1984). Essas observações, dentre outras, também demonstram que a exposição ao éter pode causar estresse não somente psicológico, mas também físico, o que o torna diferente da maioria dos estressores utilizados nos experimentos sobre efeitos tardios da estimulação neonatal. No presente experimento, a exposição ao éter poderia estar provocando a ativação de vários circuitos neurais ao mesmo tempo, desencadeando um maior aumento da secreção de corticosterona, não comumente observado em ratos submetidos à manipulação neonatal, o que tornou nesse caso sua resposta ao estresse semelhante a dos animais controle.

Lookingland e colaboradores (1990), compararam efeitos de dois tipos de estresse por contenção em ratos machos e fêmeas, expostos ou não ao éter, e observaram que os mecanismos mediadores dos efeitos inibitórios da contenção sobre a atividade de neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares diferem daqueles mecanismos através dos quais o éter atua. Os resultados em fêmeas mostraram que o efeito do estresse por contenção (seja imobilização na posição supina ou confinamento em tubo de acrílico cilíndrico) depende do tipo de estressor utilizado, sendo que as respostas de machos diferem daquelas de fêmeas. Ainda, trinta minutos de imobilização na posição de supino mas não a contenção em tubo de acrílico, reduziu as concentrações de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) na eminência mediana de fêmeas não expostas ao éter, assim como a breve exposição ao éter exacerbou esse efeito. Em machos, nem a imobilização em supino, nem a contenção em tubo de acrílico, na ausência da exposição ao éter, foram capazes de alterar as concentrações de DOPAC na eminência mediana. Mas, os autores mostram que uma breve exposição prévia ao éter torna

ambos os tipos de estresse por contenção efetivos na inibição dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares. Por outro lado, mesmo na ausência de estresse por contenção, apenas a exposição durante 2 min ao éter foi capaz de provocar um relativo aumento da secreção de prolactina ao mesmo tempo em que reduziu a concentração de DOPAC na eminência mediana, tanto em machos como em fêmeas. Ou seja, os resultados sugerem que a exposição ao éter pode provocar efeitos distintos de outros estressores, provavelmente porque os mecanismos de ação do éter sejam diferentes.

Além disso, uma outra observação importante seria a de que os animais manipulados parecem apresentar semelhante capacidade do sistema/eixo de secretar glicocorticóides em resposta a estresse. Ou seja, efeitos de alterações na atividade do eixo HPA podem ser devidos a modulações exercidas pela manipulação de modo indireto, através de alterações provocadas por esse procedimento em áreas que constituem circuitarias que integram as respostas a estresse em animais adultos, como é o caso por exemplo, da redução do número de neurônios no locus coeruleus provocada pela manipulação na infância (Lucion et al., 2003). E no presente experimento, o estresse por éter poderia exercer influências sobre a modulação exercida normalmente pela manipulação neonatal nesses animais. Sendo assim, sugere-se que as modulações exercidas pela manipulação neonatal possam se manifestar de modo dinâmico e também ser dependentes do estressor, assim como das circuitarias e sistemas testados.

Com relação à ausência de diferenças na secreção de corticosterona plasmática em função da fase do ciclo testada, esse efeito pode ter ocorrido devido a mecanismos de ação intrínsecos do éter ativando outros circuitos relacionados à liberação de corticosterona, interferindo na modulação normalmente exercida pelos hormônios gonadais; ou ainda devido às coletas terem sido realizadas apenas comparando-se as fases de diestro ou estro e somente durante o período da manhã, enquanto muitas das variações hormonais em função das características do ciclo estral ocorrem principalmente na fase de proestro e à tarde (Viau & Meaney, 1991). Nosso objetivo, no presente experimento, era o de avaliar a atividade secretória do eixo HPA, de modo que selecionamos o horário da manhã, um período do ciclo circadiano em que a concentração basal de corticosterona em ratos é relativamente baixa e

constante, diferente dos períodos mais próximos do final do dia, quando os níveis de glicocorticóides se elevam e atingem valores de pico (De Boer & Van der Gugten, 1987).

Apesar de não havermos observado nesse primeiro experimento efeitos desse protocolo de manipulação neonatal sobre a secreção de corticosterona em resposta ao estresse por éter, resultados prévios de nosso laboratório (Severino et al., 2004) mostram a interação entre a manipulação no período neonatal e a dinâmica cíclica dos hormônios gonadais no momento do teste, sobre respostas comportamentais de medo-ansiedade e sobre a secreção de prolactina em ratas adultas. No experimento citado, foram comparadas ratas controle e manipuladas em duas fases distintas do ciclo estral, manhã do diestro (com baixas secreções de hormônios gonadais) e manhã do estro (logo após a fase de proestro, onde há maior secreção de hormônios sexuais durante o ciclo) (Freeman, 1994), em comportamentos no labirinto em cruz elevado e na resposta de prolactina ao estresse por éter. Quando comparadas às controles na mesma fase do ciclo, as ratas manipuladas testadas na fase diestro manifestaram uma redução geral da inibição comportamental, apresentada sob a forma de aumento da exploração do labirinto e de redução da concentração plasmática de prolactina na curva de resposta ao éter. Esse efeito não foi observado nas ratas manipuladas testadas na fase do estro, que apresentaram respostas semelhantes às ratas controle também testadas em estro, ou seja, não manifestaram os efeitos da manipulação neonatal.

Comparando-se os resultados do presente experimento com os dados prévios da literatura sobre efeitos da manipulação neonatal atenuando respostas ao estresse, e observando-se o fato de que a grande maioria dos trabalhos prévios utilizou outros estressores, que não o éter, a maioria destes considerados geradores de estímulos “psicológicos”, podemos sugerir que a manifestação dos efeitos tardios de experiências adversas precoces em resposta ao estresse em adultos parece depender do tipo de estressor a que são submetidos os animais, assim como do parâmetro avaliado em resposta a esse estressor.

**1.b) Efeitos da Manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de gonadotrofinas, hormônios gonadais e prolactina, basal e em resposta ao estresse por éter, em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro ou em estro**

Nesse experimento, não foram observadas diferenças significativas provocadas pela manipulação neonatal sobre a concentração plasmática de LH ou FSH, basal ou em resposta ao estresse por éter, em ratos machos ou fêmeas adultos. A ausência de efeitos da manipulação precoce sobre a concentração plasmática de gonadotrofinas poderia sugerir que esse procedimento não provoca efeitos diretos sobre a atividade hipofisária envolvida nas secreções do eixo HPG em animais adultos. Quando testados após exposição a vapores de éter, apenas as ratas em estro apresentaram uma significativa elevação da secreção de LH, aos 15 minutos, que foi semelhante em ambos os grupos de ratas controles e manipuladas. A elevação da concentração de LH em resposta a uma exposição aguda ao éter deve ter ocorrido pelo aumento abrupto da liberação de LHRH, estimulada pela noradrenalina liberada em resposta ao estresse. Os neurônios LHRH são sensíveis a estímulos estressantes agudos os quais provocam a secreção de noradrenalina a partir do locus coeruleus. Esse núcleo envia eferências à área pré-óptica do hipotálamo e essa sensibilização é aumentada durante o período ovulatório, devido à influência das secreções gonadais estimulando a atividade secretória do locus coeruleus (Freeman, 1994; Anselmo-Franci et al., 1997, 1999). Esses dados indicam interação entre a atividade do eixo HPG e o estresse.

Em relação à concentração plasmática basal de hormônios gonadais e de prolactina, a manipulação neonatal, independentemente da fase do ciclo testada, provocou uma redução da concentração de estradiol e de progesterona, assim como de prolactina, em ratas fêmeas adultas. Quanto aos machos, não foram verificadas diferenças significativas em relação à concentração de testosterona ou de prolactina, quando comparados ratos controles e manipulados. Pode-se sugerir, por estes resultados, que a manipulação neonatal parece inibir a atividade do eixo HPG em ratas adultas. Considerando-se que a manipulação durante os dez primeiros dias de vida pode ser um tipo de estresse crônico a que os animais foram submetidos, os efeitos observados no presente trabalho de certo modo concordam com

trabalhos prévios os quais mostram que elevadas concentrações plasmáticas de CRH, por exemplo pelo estresse crônico, ou a exposição prolongada a doses elevadas de glicocorticóides, têm efeito inibitório sobre a atividade de secreção do eixo HPG, o que leva a inibir a função reprodutiva (para uma revisão ver Kalantaridou et al., 2004).

Deve-se considerar também que o protocolo utilizado permitiu somente um momento de observação da concentração plasmática basal de hormônios gonadais, em fêmeas em diestro ou em estro. Desse modo, os resultados observados podem sugerir influências da manipulação neonatal interferindo na atividade do eixo HPG, mas não permitem concluir quanto a todos os efeitos desse procedimento sobre o quadro geral das funções reprodutivas nos ratos testados. Apesar de que trabalhos prévios de nosso laboratório já demonstraram que a manipulação neonatal retarda a data da abertura vaginal e reduz o número de óvulos, além de provocar ciclos estrais anovulatórios, em ratas adultas (Gomes et al., 1999), reduz o comportamento sexual, tanto em fêmeas como em machos (Padoin et al., 2001) o que indica que a manipulação neonatal pode prejudicar as funções reprodutivas de ratos adultos.

## *Experimento 2-*

### *2.a) Efeitos da Manipulação neonatal X Gonadectomia logo após o nascimento (antes de 6 horas de vida) sobre a concentração plasmática de corticosterona, basal e em resposta ao estresse, em ratos machos e fêmeas adultos*

A manipulação neonatal reduziu a resposta da corticosterona ao estresse em fêmeas sem cirurgia, quando comparada ao grupo de ratas não manipuladas, confirmando dados que demonstram a atenuação das respostas do eixo HPA ao estresse em animais adultos que foram manipulados na infância tanto em ratos machos (Ogawa et al., 1994; Levine, 2001; Pryce et al., 2001; Fernández-Teruel et al., 2002) como em fêmeas (McCarthy et al., 1997; McIntosh et al., 1999; Kalinichev et al., 2002; Lehmann et al., 2002; Papaioannou et al., 2002; Panagiotaropoulos et al., 2004; Severino et al., 2004).

Em fêmeas, a cirurgia de castração fictícia, da mesma forma que a manipulação neonatal, provocou atenuação da resposta da corticosterona ao estresse na idade adulta, comparada ao grupo de ratas não-manipuladas e não submetidas a qualquer procedimento cirúrgico. Considerando-se que o procedimento cirúrgico envolve a crioadestesia, a qual pode ser considerada como um tipo de estresse por provocar alterações morfológicas e comportamentais em ratos (Nunez et al., 1998, 2000) e que foi realizado imediatamente após o nascimento, em um período crítico de susceptibilidade do sistema nervoso do filhote a influências ambientais (Sapolsky, 1997; Cooke et al., 1998; McCormick et al., 1998), pode-se inferir que o procedimento cirúrgico a que os filhotes foram submetidos logo após o nascimento atue como um estímulo estressor. As fêmeas parecem demonstrar essa susceptibilidade ao estímulo cirúrgico.

Ainda em fêmeas, quando as duas intervenções ambientais (cirurgia fictícia e manipulação) foram combinadas, os resultados mostraram uma atenuação ainda maior da resposta da corticosterona ao estresse por éter do que cada estímulo separadamente. O

procedimento cirúrgico possivelmente tenha funcionado como a estimulação por manipulação dos filhotes e, assim como a manipulação, gerou alterações nas respostas a estresse no adulto, talvez por afetar a organização da circuitaria nervosa relacionada com o controle da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais. De fato, alguns autores relatam que ratos submetidos à cirurgia de laparotomia neonatal (sob crioanestesia, e posterior injeção de salina) apresentam, quando adultos, redução de respostas a estímulos dolorosos, como teste de “hot plate” (50°C), latência de retirada da cauda (50°C) e o teste de constricção abdominal por estímulo de ácido acético, quando comparados a animais controles (que sofreram crioanestesia e injeção de salina, ou somente injeção de salina). Esses autores sugerem que a exposição a estímulos nocivos ou estressantes pode induzir a mudanças a longo-prazo nas respostas de dor, e que essas reações podem ser mediadas por alterações provocadas na atividade do eixo do estresse ou na circuitaria antinociceptiva (Sternberg et al., 2005). Outros autores sugerem que experiências aversivas precoces podem modular os efeitos da manipulação neonatal, quando demonstram a interação de efeitos da injeção de veículo e estimulação por manipulação neonatal reduzindo a atividade de secreção de corticosterona plasmática em ratos adultos (Panagiotaropoulos et al., 2004).

A castração das fêmeas logo após o nascimento por sua vez aboliu o efeito atenuador da manipulação e do estresse cirúrgico neonatal sobre a resposta da corticosterona ao estresse por éter na idade adulta. Esse resultado indica que os hormônios gonadais podem modular os efeitos da manipulação neonatal e está de acordo com estudos prévios de Panagiotaropoulos e colaboradores (2004) onde mostram que em ratas fêmeas androgenizadas por injeção de testosterona no período neonatal, a manipulação neonatal induz a alguns efeitos similares aqueles observados em machos manipulados.

Outro resultado do presente experimento foi que a manipulação no período neonatal reduziu a concentração plasmática basal de corticosterona. Essa redução na corticosterona basal não foi observada em fêmeas submetidas apenas ao procedimento cirúrgico logo após o nascimento. E, em machos, houve um efeito principal observado em função da manipulação neonatal, reduzindo a secreção basal em todos os grupos testados. Esse resultado está de acordo com trabalho prévio (Papaioannou et al., 2002, em que a redução da

secreção basal de corticosterona foi observada em ratos adultos, machos e fêmeas, submetidos à manipulação diária por 15 minutos desde o primeiro até o 22º dia de vida. Em contraste, uma série de outros estudos haviam mostrado que ausência de efeitos da manipulação sobre a atividade basal de secreção de corticosterona (para revisões ver Denenberg, 1964; Levine et al., 1994; Levine, 2001).

Diferente do observado em fêmeas, em ratos machos, a resposta da corticosterona ao éter não foi alterada nem pela manipulação, nem pela castração neonatal. Quanto à ausência de efeito da manipulação neonatal, o resultado do presente trabalho discorda de vários estudos (Denenberg, 1964; Levine et al., 1967; Hess et al., 1969; Meerlo et al., 1999; Levine, 2001), nos quais a atenuação da resposta ao estresse é o efeito principal, ou central. Diferente da maioria dos experimentos realizados com animais manipulados no período neonatal, o presente experimento utilizou a exposição a vapores de éter como estímulo para testar as respostas a estresse na idade adulta. Alguns autores demonstram que o éter é um potente estressor, provocando mais efeitos significativos do que pela imobilização, por exemplo, sobre a liberação de oxitocina em ratos adultos (Ivanyi et al., 1991). Além destes, outros autores comparam efeitos da manipulação neonatal sobre a intensidade e tempo de indução de *c-Fos* em várias regiões do cérebro e tronco encefálico, pela exposição a estresse físico (éter) ou emocional (contenção) no adulto, relatando distintas respostas em função do estressor utilizado (Ábraham & Kóvacs, 2000).

No entanto, por outro lado, experimentos prévios de nosso laboratório (Severino et al., 2004) demonstraram que o modelo de manipulação utilizado leva à redução da secreção de prolactina plasmática em resposta à exposição ao éter em ratos adultos machos ou em fêmeas testadas na fase de diestro, de acordo com resultados da literatura (Meerlo et al., 1999). Além disso pode-se considerar que a circuitaria do eixo HPA e a de controle da secreção de prolactina podem estar sendo distintamente influenciadas ou podem apresentar diferentes níveis de susceptibilidade às influências da manipulação neonatal, ou ainda aos efeitos da exposição ao éter.

A ausência de efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da corticosterona ao éter em machos pode indicar também, do mesmo modo que no experimento anterior, que as

alterações provocadas pela manipulação neonatal na atividade de resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais parecem ser dependentes do estressor (Thrivikraman et al., 2000).

Considerando-se que os resultados de resposta da corticosterona ao estresse por éter em ratos machos não evidenciaram efeitos nem da manipulação, nem da castração neonatal, não é possível concluir a respeito da hipótese inicial do experimento de que poderia haver interação entre esses dois fatores nos machos. No entanto, em trabalho prévio, Panagiotaropoulos e colaboradores (2004) concluem que a reatividade ao estresse na idade adulta, observada pela atividade de secreção de corticosterona, poderia ser influenciada mais por efeitos ativacionais, sejam no processo de puberdade ou em outros períodos da vida adulta, do que organizacionais dos hormônios gonadais. Por outro lado, esses mesmos autores propõem que os hormônios gonadais em machos e fêmeas exerceriam efeito organizacional sobre a atividade monoaminérgica cerebral. Sugerem ainda que a experiência neonatal interage com as ações organizacionais e ativacionais da testosterona e sobre o desenvolvimento do sistema nervoso influenciando a reatividade ao estresse de modo distinto em machos e em fêmeas.

É importante considerar que, no presente estudo, as castrações foram realizadas logo após o nascimento e, portanto, a ausência dos hormônios gonadais e/ou de seus possíveis efeitos ocorreu durante toda a vida pós-natal dos animais. A influência da retirada dos hormônios gonadais, no caso das fêmeas, pode refletir a sua importância em processos subsequentes a aqueles de diferenciação do sistema nervoso no período neonatal, ou seja, em outras fases de desenvolvimento ao longo da vida do animal. Isso porque, em fêmeas, a presença da alfafetoproteína até por volta de uma semana de vida, e sua atividade ligando-se ao estrógeno e prevenindo a passagem do mesmo através da barreira hematoencefálica, impossibilita as ações organizacionais do hormônio gonadal feminino (Becú-Vilallobos et al., 1997; Fitch & Denenberg, 1998; Grober et al., 1998).

A importância da ação dos hormônios gonadais, sobre esse sistema HPA, durante período neonatal (efeito organizacional) e/ou na vida adulta (efeitos ativacionais) necessita ser mais bem testada. Entretanto, considerando-se que, em fêmeas, os hormônios gonadais

não parecem exercer efeitos organizacionais do sistema nervoso, de fato a ausência da atividade dos hormônios gonadais estabelece o sistema nervoso como sendo feminino, é plausível assumir que os efeitos da gonadectomia observados no presente experimento são devidos a ausência das secreções gonadais em outras fases do desenvolvimento, como nos processos de puberdade e na vida adulta. Essa conclusão está de acordo com a observação de que ratas fêmeas androgenizadas no período neonatal (aos 2 dias de vida) apresentam concentrações plasmáticas semelhantes de corticosterona quando comparadas a fêmeas injetadas apenas com veículo, o que indica que diferenças nos níveis circulantes de corticosterona na vida adulta parecem ser afetadas pelas ações ativacionais e não organizacionais dos hormônios gonadais (Panagiotaropoulos et al., 2004). Nesse experimento, a ausência das secreções gonadais durante toda vida nas fêmeas adultas castradas logo após o nascimento impediu a manifestação do efeito atenuante da manipulação neonatal observado na resposta de corticosterona ao estresse por éter em ratas manipuladas que foram submetidas apenas à cirurgia fictícia neonatal, as quais apresentavam hormônios gonadais circulantes. Esse resultado revela a influência das ações ativacionais dos hormônios gonadais femininos sobre os efeitos tardios que a manipulação neonatal exerce na secreção de corticosterona.

***2. b) Efeitos da Manipulação neonatal X Gonadectomia logo após o nascimento (antes de 6 horas de vida) sobre a concentração plasmática de gonadotrofinas e de hormônios gonadais em ratos adultos machos e fêmeas***

Não foram observados efeitos significativos da manipulação neonatal sobre as concentrações de hormônios gonadais, tanto em fêmeas testadas em diestro, quanto em machos, e esses dados confirmam resultados anteriores (Severino et al., 2004), assim como não houve efeito do procedimento cirúrgico logo após o nascimento, que pode ser considerado também como um tipo de estresse neonatal. Não foram detectados hormônios

gonadais circulantes naqueles animais adultos, machos ou fêmeas, que haviam sido submetidos à castração neonatal, conforme esperado.

Por outro lado, com relação à secreção de LH e de FSH, foi observada interação entre as 2 intervenções realizadas no período neonatal, manipulação neonatal e castração precoce. A manipulação neonatal induziu a um aumento ainda maior da concentração basal de ambas gonadotrofinas, tanto em machos como em fêmeas adultos castrados 6 horas após o nascimento, quando comparados aos grupos de ratos somente castrados.

Esses resultados evidenciam a influência das variações ambientais no período neonatal sobre a atividade dos eixos HPG e HPA, e além disso mostram que as secreções de ambos os sistemas parecem ser importantes na determinação e diferenciação das áreas que irão constituir os circuitos funcionais reprodutivos no adulto (Handa et al., 1994a; Garcia-Segura et al., 1995; Becú-Vilallobos et al., 1997; Fitch & Denenberg, 1998, Viau, 2002). De acordo com os presentes resultados, além de a castração ter provocado as esperadas alterações na funcionalidade do eixo HPG no adulto, a manipulação neonatal somada a aquele procedimento interferiu na manifestação desse efeito. Seja através de influências nos processos de diferenciação durante o período neonatal, seja na ativação durante a puberdade das áreas que foram diferenciadas, a manipulação neonatal causou uma maior secreção de gonadotrofinas nos adultos, intensificando o efeito observado apenas pela castração neonatal. Além disso, resultados de outros experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que a manipulação neonatal provoca alteração estrutural em núcleos importantes do eixo HPG, como a redução do número de neurônios do locus coeruleus (Lucion et al., 2003), cuja atividade modula a dinâmica da secreção de LH e de FSH, em fêmeas (Anselmo-Franci et al., 1997). Assim sendo, sugere-se que a manipulação possa estar afetando a diferenciação de áreas que constituem o eixo HPG, e que esse efeito foi exacerbado pela retirada dos hormônios gonadais, no mesmo período, nos ratos testados. Esses resultados podem revelar também a susceptibilidade do eixo reprodutivo às influências de variações das condições ambientais durante o processo de diferenciação perinatal, o que poderia ter conduzido à significativamente maior secreção de LH e FSH nos

adultos testados que haviam sido submetidos a ambos os tratamentos, isto é, ao procedimento de manipulação neonatal e à cirurgia de gonadectomia.

Sendo assim, a alteração da secreção de gonadotrofinas como resultado da interação de efeitos da castração e da manipulação neonatal indica que a manipulação no período crítico de diferenciação dos sistemas neuroendócrinos deve estar também alterando o desenvolvimento ou a atividade de vias funcionais que influenciam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, como já foi observada redução do comportamento sexual (Padoin et. al, 2001), além da redução da ovulação em ratas (Gomes et. al, 2000), e uma modificação estrutural importante sob a forma de redução significativa do número de neurônios no locus coeruleus de ratas adultas que foram manipuladas no período neonatal (Lucion et. al, 2003).

Em resumo, os resultados desse experimento demonstram que a ausência de hormônios gonadais desde o período neonatal pode abolir, ou impedir a manifestação dos efeitos atenuantes que a manipulação neonatal exerce sobre a secreção basal e sobre a resposta da corticosterona ao estresse por éter em ratas fêmeas adultas. A importância dos hormônios gonadais, ao longo do desenvolvimento em fêmeas, sugere que esses devem estar exercendo influências ativacionais sobre os efeitos da manipulação neonatal.

Além disso, a manipulação neonatal potencializa a atividade secretória basal das gonadotrofinas hipofisárias de animais machos e fêmeas adultos, gonadectomizados logo após o nascimento.

Esses resultados indicam que os hormônios gonadais podem modular os efeitos da manipulação neonatal, assim como a manipulação neonatal pode influenciar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

### *Experimento 3-*

#### *3.a) Efeitos da Manipulação neonatal X Gonadectomia em idade adulta (aos 80 dias de vida) sobre a concentração plasmática de corticosterona basal e em resposta ao estresse por éter em ratos machos*

Nesse experimento, não foram observados efeitos estatisticamente significativos nem da manipulação neonatal, nem da castração em idade adulta, nem da interação entre esses procedimentos, sobre a concentração plasmática de corticosterona basal ou em resposta ao estresse por éter em ratos machos.

Quando comparados os valores obtidos para a corticosterona basal nesses grupos de ratos adultos com dados da literatura (De Boer & Van der Gugten, 1987; Handa et al., 1994; Atkinson & Waddell, 1997), que são semelhantes aos valores basais dos ratos machos testados no experimento 2, pode-se perceber que houve uma relativa redução geral da corticosterona plasmática basal em todos os grupos testados no presente experimento. Esse resultado impossibilitou a verificação de possíveis efeitos da manipulação neonatal ou mesmo da castração em idade adulta, pois tornou os valores basais semelhantes entre os grupos. Considerou-se a possibilidade de o procedimento cirúrgico, ou mesmo o anestésico utilizado ter provocado o efeito observado. Um estudo em que foram observados efeitos agudos da ketamina sobre sistemas de memória e sintomas psicóticos em voluntários saudáveis revelou que a infusão de ketamina em humanos adultos pode provocar padrões seletivos de prejuízos à memória de trabalho, episódica e procedural, assim como pode induzir sintomas dissociativos e relacionados à esquizofrenia (Morgan et al., 2004). Portanto, devemos considerar a hipótese de que a exposição desses animais ao procedimento cirúrgico utilizando-se a anestesia por Ketamina possa ter provocado algum tipo de trauma nos mesmos, que conduziu à inibição da atividade secretora basal do eixo HPA a médio-prazo, impedindo a verificação de possíveis efeitos tardios da manipulação precoce ou da ausência de testosterona no período do teste.

Quando observados os efeitos da manipulação neonatal e da castração em idade adulta sobre a resposta ao estresse por éter em ratos machos, verificou-se que os grupos testados não diferiram entre si, mas todos apresentaram elevação das concentrações plasmáticas de corticosterona, se comparados com os animais testados sem a exposição ao éter (grupos basais). No caso da resposta ao estresse, os valores observados no presente experimento 3 são semelhantes a aqueles apresentados na literatura (Handa et al., 1994; Atkinson & Wadell, 1997), o que nos levou a considerar que a atividade de secreção do eixo HPA em resposta ao estresse nesses animais não parece ter sido prejudicada pelo procedimento cirúrgico. Além disso, a amplitude da diferença entre os valores das concentrações de corticosterona basais e em resposta ao estresse em ratos adultos submetidos previamente ao procedimento cirúrgico foi maior do que quando comparados os valores de corticosterona, basais e em resposta ao estresse, nos grupos de machos adultos que haviam sido submetidos à cirurgia logo após o nascimento. Ou seja, como os ratos submetidos ao procedimento cirúrgico em idade adulta apresentaram valores reduzidos de concentração plasmática basal de corticosterona, quando comparados a eles, os respectivos grupos expostos ao estresse por éter apresentaram uma elevação proporcionalmente maior da concentração plasmática de corticosterona do que a diferença observada entre aqueles animais submetidos ao procedimento cirúrgico logo após o nascimento. Deve-se observar que os protocolos de castração neonatal ou em adulto envolveram procedimentos com anestésias diferentes. Além disso, também os animais testados faziam parte de grupos independentes, não tendo sido avaliadas amostras pareadas, ou seja, o grupo basal e o grupo de resposta ao estresse foram compostos de animais diferentes, o que constitui outra variável importante, que influencia na avaliação ou análise do resultado.

Deve-se considerar ainda que experiências prévias com estressores durante a vida adulta podem desencadear aumento da atividade de secreção de glicocorticóides em resposta a situações estressantes subseqüentes, o que caracteriza normalmente uma sensibilização do eixo HPA ao estresse, diferente das alterações a longo-prazo observadas em função da manipulação neonatal, que conduzem geralmente à atenuação das respostas à maior parte dos estímulos estressantes na idade adulta (González et al., 1990; Levine, 2001).

No presente experimento, deve-se considerar que o procedimento cirúrgico sofrido poucas semanas antes do teste poderia estar atuando também como um estresse prévio para os ratos adultos, talvez modulando a resposta de secreção de corticosterona à exposição ao éter.

### **3. b) Efeitos da Manipulação neonatal X Gonadectomia em idade adulta (aos 80 dias de vida) sobre a concentração plasmática basal de gonadotrofinas e de testosterona**

Com relação aos efeitos da manipulação neonatal e da castração em idade adulta sobre a concentração plasmática de gonadotrofinas em ratos machos, apesar de não terem sido encontradas interações significativas sobre a concentração plasmática de hormônio folículo-estimulante (FSH), observou-se aumento significativo do FSH como efeito da retirada do feedback gonadal em ambos os grupos de animais que foram submetidos à castração. A ausência dos hormônios gonadais retira a inibição normalmente exercida pelos mesmos sobre a atividade secretória de gonadotrofinas hipofisárias, promovendo aumento da liberação dessas gonadotrofinas (Becu-Villallobos et al., 1997).

Com relação à concentração basal de hormônio luteinizante (LH), houve interação significativa entre os procedimentos de manipulação e castração utilizados. Ou seja, além de a castração em idade adulta provocar elevação da concentração plasmática de LH em ambos os grupos de ratos machos, verificou-se que os animais submetidos tanto à manipulação neonatal quanto à castração aos 80 dias de idade apresentaram elevação da concentração plasmática basal de LH significativamente menor do que os grupos de ratos castrados aos 80 dias que não foram submetidos à manipulação neonatal. Ou seja, a manipulação neonatal provocou um aumento menos pronunciado da concentração de LH, na ausência do feedback negativo gonadal, em ratos machos castrados após a puberdade. Propõe-se que nesses animais a manipulação neonatal possa ter atuado modulando os processos de diferenciação de áreas reguladoras da atividade do eixo HPG, provocados pela ação dos hormônios gonadais, desde o período intrauterino, e também após o nascimento em machos (Weisz & Ward, 1980; Baum, 1988).

Esse resultado, comparado aos dados obtidos em ratos machos e fêmeas gonadectomizados logo após o nascimento, novamente indica que existe interação entre os hormônios esteróides gonadais e a manipulação neonatal sobre a secreção de LH, em ratos adultos. Em conjunto, os resultados sugerem que a presença ou ausência dos hormônios gonadais, desde o período neonatal ou durante a fase adulta, pode influenciar os processos através dos quais a manipulação neonatal estabelece seus efeitos sobre a atividade secretória do eixo HPG no adulto. Os hormônios gonadais exercem influências ativacionais sobre os efeitos tardios da manipulação neonatal conforme foi observado também pelas alterações provocadas na secreção de LH em ratos adultos, manipulados no período neonatal e que foram castrados aos 80 dias.

*Discussão geral sobre efeitos da interação entre manipulação neonatal e castração em diferentes fases do desenvolvimento em ratos machos e fêmeas*

→ A retirada das gônadas (e de suas secreções) no período neonatal, quando está ocorrendo a diferenciação do sistema nervoso, poderia influenciar no processo de “imprinting/estampagem” provocado pela manipulação neste mesmo período, desencadeando novas alterações plásticas no sistema nervoso do filhote, as quais irão promover modificações funcionais manifestadas por este quando adulto.

→ Em ratas fêmeas, a efetiva ação do estrógeno perinatal sobre o sistema nervoso pode ser impossibilitada devido à atividade da enzima alfa-feto-proteína, produzida em quantidades significativas até por volta de 10 dias de vida, existente em machos e em fêmeas (para uma revisão, ver Fitch & Denenberg, 1998). Essa enzima se liga ao estrógeno e impede a sua passagem através da barreira hematoencefálica (MacLusky e Naftolin, 1981). Portanto, a retirada dos ovários logo após o nascimento provocaria a perda da influência dos hormônios ovarianos por toda a vida da fêmea, e, como essa influência parece insignificante durante os processos perinatais de diferenciação do sistema nervoso, seus efeitos ocorreriam principalmente sobre a dinâmica da instalação da puberdade e na fisiologia geral da adulta. Por esse motivo, há que se considerar a possibilidade de que diferenças nos efeitos da manipulação sobre as respostas observadas em fêmeas castradas, com relação às fêmeas não-castradas (cirurgia fictícia) sejam devidas principalmente à ausência de influências ativacionais dos hormônios gonadais na idade adulta.

→ Esse processo poderia desencadear também distinções nas reações de machos comparadas às respostas das fêmeas, quando testados durante a vida adulta. Ou seja, poderia interagir com efeitos de gênero.

→ Por outro lado ainda, a retirada das gônadas em ratos adultos provoca a falta dos hormônios gonadais circulantes no período do teste (realizado em torno de um mês após a castração), o que poderia influenciar na manifestação dos efeitos tardios, mas não na formação da “marca” provocada pela manipulação no período neonatal. A presença das secreções gonadais do macho no período neonatal, poderia talvez modular a atividade da

manipulação neonatal sobre a diferenciação do sistema nervoso, durante a organização, por exemplo, dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenais e hipotálamo-hipófise-gônadas. A manutenção da secreção desses hormônios poderia promover mais tarde uma “sensibilização ou ativação do sistema”, durante o processo de instalação da puberdade, e a sua posterior retirada poderia afetar a subsequente atividade secretória dos eixos relacionados acima. Conforme observado nos experimentos deste trabalho, o desenvolvimento na presença dos hormônios sexuais acarretou, no rato castrado quando adulto, uma alteração menos evidente na resposta de elevação da concentração das gonadotrofinas pela retirada do feedback gonadal, diferentemente do que ocorreu como efeitos da castração logo após o nascimento, em machos ou fêmeas. Ou seja, os resultados mostram influências ativacionais dos hormônios gonadais sobre a concentração plasmática de corticosterona em ratos adultos.

→ Em resumo, os resultados desses experimentos permitem concluir que os hormônios gonadais interagem com os efeitos da manipulação neonatal. Indica-se que a influência dos hormônios gonadais na modulação dos efeitos a longo-prazo da manipulação no período neonatal seja ativacional. A ausência de hormônios gonadais desde o período neonatal abole os efeitos atenuantes que a manipulação neonatal exerce sobre a secreção basal e sobre a resposta da corticosterona ao estresse por éter em ratas fêmeas adultas. Além disso, a manipulação neonatal influencia a atividade do eixo HPG, potencializando a atividade secretória basal das gonadotrofinas hipofisárias de animais machos e fêmeas adultos, gonadectomizados logo após o nascimento. E, em ratos castrados após a puberdade, a manipulação neonatal provoca uma redução daquele aumento na secreção de gonadotrofinas em resposta à retirada do feedback gonadal. Portanto, os resultados do presente trabalho mostram que os hormônios gonadais podem modular os efeitos da manipulação neonatal, assim como revelam algumas influências da manipulação neonatal provocando, a longo-prazo, alterações na atividade reprodutiva.

## CONCLUSÕES

### Experimento 1 -

1.a) Resultados principais → Diferentemente do esperado, a manipulação neonatal não atenuou a resposta da corticosterona ao estresse por éter em ratos adultos machos e em fêmeas testadas em diestro ou em estro.

Conclusões → A manipulação neonatal não altera os sistemas neurais de regulação da resposta de corticosterona ao estresse por éter, diferentemente do relatado na literatura para outros estressores como, por exemplo, a contenção, considerados de natureza “psicológica”. Além disso, a manifestação dos efeitos gerados por modulações exercidas pela manipulação neonatal sobre as respostas a estresse no adulto parece ser dependente do estressor, assim como das circuitarias e dos sistemas testados.

1.b) Resultados principais → A manipulação neonatal, em ratos machos e em fêmeas testadas em diestro ou em estro, não alterou as concentrações plasmáticas de gonadotrofinas, basais e em resposta ao estresse por éter, nem a concentração basal de testosterona em machos, mas reduziu as concentrações plasmáticas basais de estradiol, de progesterona e de prolactina, em fêmeas adultas testadas na fase de diestro ou na fase de estro.

Conclusões → A manipulação neonatal afeta a atividade do eixo reprodutivo, mas parece ter efeitos diferenciados sobre a regulação desse eixo endócrino. É possível

que a manipulação neonatal altere a secreção de hormônios gonadais atuando talvez diretamente sobre as gônadas através de algum mecanismo ainda desconhecido.

### Experimento 2 -

2.a) Resultados principais → A cirurgia fictícia neonatal reduziu a resposta de corticosterona ao éter, em fêmeas. A manipulação neonatal em fêmeas reduziu as concentrações plasmáticas de corticosterona, basais e em resposta ao estresse por éter. Em ratas submetidas à cirurgia fictícia, a manipulação neonatal provocou maior redução nas concentrações plasmáticas de corticosterona em resposta ao estresse por éter, ou seja, a cirurgia fictícia potencializou a redução da resposta de corticosterona provocada pela manipulação neonatal. Quando comparadas, as fêmeas castradas, manipuladas ou não no período neonatal, apresentaram concentrações plasmáticas de corticosterona semelhantes entre si. Nos machos, nem a castração, nem a manipulação neonatal, alteraram a concentração basal ou a resposta de corticosterona ao estresse por éter.

### Conclusões

→ O procedimento de manipulação neonatal exacerbou o efeito de atenuação da resposta de corticosterona ao estresse por éter, provocado por uma experiência aversiva aguda no período crítico de desenvolvimento, em fêmeas.

→ A gonadectomia em fêmeas logo após o nascimento inibe a manifestação a longo prazo de efeitos atenuantes da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, basais e em resposta ao estresse por éter.

→ Os efeitos da interação castração x manipulação neonatal sobre a atividade do eixo HPA em adultos são dependentes do gênero.

→ Além disso, a interação entre hormônios gonadais e manipulação neonatal sobre a atividade do eixo HPA parece depender de influências ativacionais e não organizacionais daqueles hormônios.

2.b) Resultados principais → A manipulação neonatal exacerbou o efeito de aumento da concentração plasmática basal de gonadotrofinas, observado em ratos machos e fêmeas adultos, que foram castrados antes de 6 horas de vida.

Conclusões → A manipulação neonatal interfere nos processos de controle por feedback negativo das gonadotrofinas em ratos machos e fêmeas adultos, castrados logo após o nascimento.

### Experimento 3 -

3.a) Resultados principais → Nem a manipulação neonatal, nem a gonadectomia aos 80 dias de idade alteraram a concentração plasmática de corticosterona, basal ou em resposta ao estresse por éter em ratos machos.

Conclusões → Parece não haver interação entre a manipulação neonatal e a castração na idade adulta sobre a concentração plasmática de corticosterona em ratos machos.

3.b) Resultados principais → A manipulação neonatal reduziu a resposta de elevação da concentração plasmática basal de LH, na ausência do feedback gonadal, em ratos machos castrados em idade adulta.

Conclusões → A manipulação neonatal interfere nos processos de controle por feedback negativo das gonadotrofinas em ratos machos castrados após a puberdade.

→ A interação entre hormônios gonadais e manipulação neonatal sobre a atividade do eixo HPG também parece depender de influências ativacionais daqueles hormônios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, I.; KOVACS, K. Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. **European Journal of Neuroscience** 12: 3003-3014, 2000.

ADER, R.; FRIEDMAN, S. B.; GROTA, L.; SCHAEFER, A. Attenuation of the plasma corticosterone response to handling and electric shock stimulation in the infant rat. **Physiology and Behavior** 3: 327-331, 1968.

ADER, R.; GROTA, L. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. **Physiology and Behavior** 4: 303-305, 1969.

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

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

ATKINSON, H. C.; WADDELL, B. J. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. **Endocrinology** 138 (9): 3842-3848, 1997.

BAUM, M. J.; BRAND, T.; OOMS, M.; VREEBURG, J. T. M.; SLOB A. K. Immediate postnatal rise in whole body androgen content in male rats: correlation with increased testicular content and reduced body clearance of testosterone. **Biology of Reproduction** 38: 980-986, 1988.

- BAUM, M. J.; WOUTERSEN P. J. A.; SLOB A. K. Sex difference in whole body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females. **Biology of Reproduction** 44: 747-751, 1991.
- BECÚ-VILLALOBOS, D.; IGLESIAS, A. G.; DÍAZ-TORGA, G.; HOCKL, P.; LIBERTUN, C. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. **Cellular and Molecular Neurobiology** 17 (6): 699-715, 1997.
- BECKER, R. R.; ILES, D. J. Developmental pattern of androgen-binding protein secretion during the critical period of sexual differentiation. **Archives of Andrology** 14: 107-114, 1985.
- BERREBY, A. S.; FITCH, R. H.; RALPHE, D. L.; DENENBERG, J. O.; FRIEDRICH JR. V. L.; DENENBERG, V. H. Corpus calosum: region-specific effects of Sex, early experience and age. **Brain Research** 438: 216-224, 1988.
- BERRY, B.; MCMAHAN, R.; GALLAGHER, M. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. **Behavioral Neuroscience** 111 (2): 267-274, 1997.
- BREEDLOVE, S. M. Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. **The Journal of Neuroscience** 12 (11): 4133-4142, 1992.
- CONSTANZO, D. J.; RICCIO, D. C.; KISSINGER, S. State-dependent retention produced with estrus in rats. **Physiology and Behavior** 57 (5): 1009-1011, 1995.
- COOKE, B.; HEGSTROM, C. D.; VILLENEUVE, L. S.; BREEDLOVE, S. M. Sexual differentiation of the Vertebrate Brain: Principles and Mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology** 19: 323-362, 1998.
- CORBIER, P. Sexual differentiation of positive feedback: effect of hour of castration at birth on estradiol-induced luteinizing hormone secretion in immature male rats. **Endocrinology** 116 (1): 142-147, 1985.

DENENBERG, V. H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. **Psychological Review, American Psychological Association, Inc 71 (5):** 335-351, Sep 1964.

DENENBERG, V. H.; FITCH, R. H.; SCHROTT, L. M.; COWELL, P. E.; WATERS, N. S. Corpus callosum: Interactive effects of infantile handling and testosterone in the rat. **Behavioral Neuroscience 105 (4):** 562-566, 1991.

DE BOER, S. F.; VAN DER GUGTEN, J. Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. **Physiology and Behavior 40:** 323-328, 1987.

DIAZ-VELIZ, G.; SOTO, V.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. **Physiology and Behavior 46:** 397-401, 1989.

DIAZ-VELIZ, G.; URRESTA, F.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and others behaviors. **Physiology and Behavior 50:** 61-65, 1991.

DIAZ-VELIZ, G.; URRESTA, F.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Progesterone effects on the acquisition of conditioned avoidance responses and other motoric behaviors in intact and ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology 19 (4):** 387-394, 1994.

DIAZ-VELIZ, G.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Effects of oxotremorine on the acquisition of a conditioned avoidance response is modified the estrous cycle, ovariectomy, and estradiol replacement in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior 51 (2/3):** 279-283, 1995.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; DRISCOLL, P.; TOBEÑA, A.; BÄTTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young roman high- and low-avoidance rats. **Physiology and Behavior 50:** 563-565, 1991.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; GIL, L.; AGUILAR, R.; STEIMER, T.; TOBEÑA, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior 73:** 233-245, 2002.

FITCH, R. H.; MCGIVERN, R. F.; REDEL, E.; SCHROTT, L. M.; COWELL, P. E.; DENENBERG, V. Neonatal ovariectomy and pituitary-adrenal responsiveness in the adult rat. **Acta Endocrinologica** **126**: 44-48, 1992.

FITCH, R. H.; DENENBERG, V. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. **Behavioral and Brain Sciences** **21**: 311-352, 1998.

FOY, M. R.; CHIAIA, N. L.; TEYLER, T. J. Reversal of hippocampal sexual dimorphism by gonadal steroid manipulation. **Brain Research** **321**: 311-314, 1984.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. **Annual New York Academy of Sciences** **745**:136-152, 1994.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In **The Physiology of Reproduction** Ed E. Knobil and J. Neill et al. Raven press, NY, 45: 613-657, 1994.

FRYE, C. A. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. **Physiology and Behavior** **57 (1)**: 5-14, 1995.

GARCIA-SEGURA, L. M.; DUEÑAS, M.; BUSIGUINA, S.; NAFTOLIN, F.; CHOWEN, J. A. Gonadal hormone regulation of neuronal-glia interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** **53 (1-6)**: 293-298, 1995.

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

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

GORSKI, R. A. Editorial: Estradiol acts via the estrogen receptor in the sexual differentiation of the rat brain, but What does this complex do? **Endocrinology** **133** (2): 431-432, 1993.

GÖTZ, F.; DÖRNER, G. Sex hormone-dependent brain maturation and sexual behavior in rats. **Endokrinologie** **68** (3): 275-282, 1976.

GRAY, J. A.; LEVINE, S.; BROADHURST, P. L. Gonadal hormone injections in infancy and adult emotional behaviour. **Animal Behaviour** **13**: 33-45, 1965.

GROBER, M. S.; WINTERSTEIN, G. M.; GHAZANFAR, A. A.; EROSCHENKO, V. P. The effects of estradiol on gonadotropin-releasing hormone neurons in the developing mouse brain. **General and Comparative Endocrinology** **112**: 356-363, 1998.

HANDA, R. J.; NUNLEY, K. M.; LORENS, S. A.; LOUIE, J. P.; MCGIVERN, R. F.; BOLLNOW, M. R. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. **Physiology and behavior** **55**: 117-124, 1994.

HANDA, R. J.; BURGESS, L. H.; KERR, J. E.; O'KEEFE, J. A. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Hormones and Behavior** **28**: 464-476, 1994.

HASELTINE, F. P.; OHNO, S. Mechanisms of gonadal differentiation. **Science** **211**: 1272-1277, 1981.

HENNESSY, J. W.; LEVINE, S. Stress, arousal, and pituitary-adrenal system: a psychoendocrine hypothesis. **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology** **8**: 133-178, 1979.

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

IVANYI, T.; WIEGANT, V.M.; WIED, D. Differential effects of emotional and physical stress on the central and peripheral secretion of neurohypophysial hormones in male rats. **Life Sciences** 48(13): 1309-1316, 1991.

JOHNSTON, C. A.; SPINEDI, E. J.; NEGRO-VILAR, A. Effects of neonatal monosodium glutamate (MSG) treatment on the hormonal and central monoaminergic dynamics associated with the acute ether stress in the male rat. **Brain Research Bulletin**. 13 (5): 643-649, 1984.

JOSEPH, R.; HESS, S.; BIRECREE, E. Effects of hormone manipulations and exploration on sex differences in maze learning. **Behavioral Biology** 24: 364-377, 1978.

KALINICHEV, M.; EASTERLING, K. W.; PLOTSKY, P. M.; HOLTZMAN, S. G. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 73: 131-140, 2002.

KELLY, D. D. Sexual Differentiation of the nervous system. In: Kandel, E.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M., eds. **Principles of neural sciences** New York: Elsevier; 959-973, 1991.

LEHMANN, L.; PRYCE, C.; JONGEN-RÊLO, A. L.; STÖHR, T.; POTHUIZEN, H. H. J.; FELDON, J. Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats **Neurobiology of Aging**. 23: 457-466, 2002.

LERET, M. L.; GONZÁLEZ, M. I.; TRANQUE, P.; FRAILE, A. Influence of sexual differentiation on striatal and limbic catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology** 86 C (2): 299-303, 1987.

LEVINE, S.; ALPERT, M. Differential maturation of the central nervous system as a function of early experience. **Archives of General Psychiatry** 1: 403-405, 1959.

LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. **Science** 135: 795-796, 9 march 1962.

LEVINE, S.; MULLINS JR., R. F. Hormonal influences on brain organization in infant rats. **Science 152 (3729):** 1585-1592, 17 june 1966.

LEVINE, S. HALTMEYER, G. C.; KARAS, G. G.; DENENBERG, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior 2:** 55-59, 1967.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. **Annual New York Academy of Sciences 746:** 275-293, 1994.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**, 255-260, 2001.

LITTERIA, M. Long-term effects of neonatal ovariectomy on cerebellar development in the rat: a histological and morphometric study. **Developmental Brain Research 81:** 113-120, 1994.

LOOKINGLAND, K. J.; GUNNET, J. W.; TONEY, T. W.; MOORE, K.E. Comparison of the effects of ether and restraint stress on the activity of tuberoinfundibular dopamine neurons in female and male rats. **Neuroendocrinology**. 52: 99-105, 1990.

LUCION, A. B.; CHARCHAT, H.; PEREIRA, G. A. M.; RASIA-FILHO, A. A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiology and Behavior 60:** 1419-1423, 1996.

LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M.; WINKELMANN, E.C.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behavioral Neuroscience 117:** 894-903, 2003.

MacLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science 211:** 1294-1302, 1981.

McCARTHY, M. M.; BESMER, H. R.; JACOBS, S. C.; KEIDAN, G. M. O.; GIBBS, R. B. Influence of maternal grooming and age on fos immunoreactivity in the preoptic area of neonatal rats: Implications for sexual differentiation. **Developmental Neuroscience 19:** 488-496, 1997.

McCORMICK CM; FUREY BF; CHILD M; SAWYER MJ; DONOHUE SM. Neonatal sex hormones have 'organizational' effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. **Brain Research Developmental Brain Research** **105(2)**: 295-307, 1998.

McEWEN, B. S. Neural gonadal steroid actions. *Science*. 211: 1303-1311, 1981.

MEANEY, M. J.; SEEMA, B; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response hypothalamic CRF system. **Annual New York Academy of Sciences** **697**: 70-85, 1993.

MEANEY, M. J.; DORIO, J.; FRANCIS, D; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J. W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. **Annual New York Academy of Sciences** **746**: 260-273, 1994a.

MEANEY, M. J.; TANNENBAUM, B.; FRANCIS, D.; BHATNAGAR, S.; SHANKS, N.; VIAU, V.; O'DONNELL, D.; PLOTSKY, P. M. Early environmental programming of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Seminars in the Neurosciences** **6**: 247-259, 1994b.

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

MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology** **21** (7): 609-620, 1996.

MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DIAZ-VELIZ, G. Effects of LHRH on avoidance conditioning in normally cycling and ovariectomized female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** **61** (3): 221-228, 1998.

- MORGAN, C. J. A.; MOFEEZ, A.; BRANDNER, B.; BROMLEY, L.; CURRAN, H. V. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. **Neuropsychopharmacology**. 29: 208-218, 2004.
- NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. **Science** 211: 1263-1264, 1981.
- NIHLÉN, A.; LÖF, A.; JOHANSON, G. Controlled Ethyl *tert*-butyl Ether (ETBE) exposure of male volunteers II Acute effects. **Toxicological Sciences**. 46: 143-150, 1998.
- NÚÑEZ, J. F.; FERRÉ, P.; GARCÍA, E.; ESCORIHUELA, R. M.; FERNÁNDEZ-TERUEL A.; TOBENA A. Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way avoidance in female rats. **Physiology and Behavior**. 57 (5): 831-835, 1995.
- NUNEZ, J. L.; KIM B. Y.; JURASKA, J. M. Neonatal cryoanesthesia affects the morphology of the visual cortex in the adult rat. **Brain Research Developmental Brain Research** 111 (1): 89-98, 1998.
- OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K. J.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field- induced behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 19(4): 961-967, 1994.
- PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS, H.M.T.; LUCION, A. B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience** 115 (6): 1332-1340, 2001.
- PANAGIOTAROPOULOS, T.; PONDIKI, S.; PAPAIOANNOU, A.; ALIKARIDIS, F.; STAMATAKIS, A.; GEROZISSIS, K.; STYLIANOPOULOU, F. Neonatal handling and gender modulate brain monoamines and plasma corticosterone levels following repeated stressors in adulthood. **Neuroendocrinology**. 80: 181-191, 2004.
- 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.

- PFEIFFER, C. A. Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. **The American Journal of Anatomy** **58 (1)**: 195-225, 1936.
- PILGRIM, C.; REISERT, I. Differences between male and female brains- Developmental mechanisms and implications. **Hormones and Metabolism Research** **24**: 353-359, 1992.
- PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research** **18**: 195-200, 1993.
- PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; BAHR, N. I.; FELDON, J. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. **Behavioral Neuroscience** **115 (1)**: 71-83, 2001.
- RAMALEY, J. A. Effects of ovariectomy on dexamethasone suppression of the adrenal axis in adult rats. **Neuroendocrinology** **20**: 260-269, 1976.
- RASIA-FILHO, A. A.; LUCION, A. B. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. **Hormones and Behavior** **30**: 251-258, 1996.
- RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. **Brain Research Bulletin** **48**: 173-183, 1999.
- ROOF, R. L.; HAVENS, M. D. Testosterone improves maze performance and induces development of male hippocampus in females. **Brain Research** **572**: 310-313, 1992.
- ROSENFELD, P.; WETMORE, J. B.; LEVINE, S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. **Physiology and Behavior** **52**: 787-791, 1992.
- SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine mechanisms and stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews** **11**: 65-76, 1986.

SAPOLSKY, R.M. The importance of a well-groomed child. **Science** **277**: 1620-1621, 12 sep 1997.

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. Effect of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various age and estrous cycle phases of females. **Physiology and Behavior** **81**: 489-498, 2004.

SFIKAKIS, A.; SPYRAKI, C.; SITARAS, N.; VARONOS, D. Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. **Physiology and Behavior** **21**: 441-446, 1978.

SIMERLY, R. B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANSON. L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor m RNA-containing cells in the rat brain: na in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology** **294**: 76-95, 1990.

SMYTHE, J. W.; MCCORMICK, C. M.; ROCHFORD, J.; MEANEY, M. J. The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. **Physiology and Behavior** **55 (5)**: 971-974, 1994.

STERNBERG, W. F.; SCORR, L.; SMITH, L. D.; RIDGWAY, C. G.; STOUT, M. Long-term effects of neonatal surgery on adulthood pain behavior. **Pain** **113**: 347-353, 2005.

SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on ACTH stress response in the infant rat. **Neuroendocrinology** **57**: 204-212, 1993.

THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C.B.; PLOTSKY, P. M. Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. **Brain Research**. **870**: 87-101, 2000.

VIAU, V; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology** **129 (5)**: 2503-2511, 1991.

VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and-adrenal axes. **Journal of Neuroendocrinology** 14: 506-513, 2002.

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

WARREN, S. G.; HUMPHREYS, A. G.; JURASKA, J. M.; GREENOUGH, W. T. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. **Brain Research** 703: 26-30, 1995.

WARREN, S. G.; JURASKA, J. M. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. **Behavioral Neuroscience** 111 (2): 259-266, 1997.

WEISZ, J.; WARD, I. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology** 106: 306-316, 1980.

WONG, M.; MOSS, R. Long-term and short-term eletrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. **The Journal of Neuroscience** 12 (8): 3217-3225, August 1992.

WOOLEY, C. S.; MCEWEN, B. S. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. **The Journal of Neuroscience** 12 (7): 2549-2554, July 1992.