



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

***EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE O
SINAL DE BDNF NO BULBO OLFATÓRIO DE RATOS***

Adolfo Rodrigues Reis

Porto Alegre - 2010



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

***EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE O SINAL
DE BDNF NO BULBO OLFATÓRIO DE RATOS***

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

Adolfo Rodrigues Reis

Orientador: Prof. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre - 2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Aldo Bolten Lucion, pela oportunidade, confiança e orientação durante toda essa jornada;

Aos Professores Dr. Martín Pablo Cammarota e Dr. Ivan Antônio Izquierdo, por disponibilizarem o laboratório para realização de meus experimentos e por todo suporte em relação às conclusões das análises bioquímicas;

Aos colegas do Lab 11, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e alegria, e também por todos os ensinamentos;

Aos colegas da PUC-RS, pelo acolhimento e também por toda ajuda nos experimentos;

Aos meus pais e minha irmã, por serem meu porto seguro, por todo apoio e carinho que posso contar sempre;

A toda minha família e amigos, que mesmo distantes estão sempre presentes na forma de incentivo;

Aos funcionários do PPG-Neurociência, por estarem sempre a disposição e também por toda ajuda com a burocracia;

Aos membros da coordenação, pela disposição e ajuda, sempre lutando para melhorar as condições de curso para os alunos;

Aos membros da banca examinadora, pelo empenho nas correções e pela disposição para esclarecimentos;

Aos bioteristas, pela ajuda com os cuidados dos Animais e na rotina o laboratório;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho;

E finalmente aos ratos, pois sem eles essa dissertação não poderia ser desenvolvida.

I Sumário

- III Lista de Figuras
- VI Lista de Abreviaturas
- VIII Resumo

Conteúdo

| | | |
|----------|--|--------------------------------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Diversidade da Resposta ao Estresse | 1 |
| 1.2 | Resposta ao Estresse no Período Neonatal | 4 |
| 1.3 | Manipulação Neonatal | 6 |
| 1.4 | Aprendizado Olfatório e Via Noradrenalina/CREB | 9 |
| 1.5 | CREB e BDNF - Modificações Estruturais no Bulbo Olfatório..... | 12 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 16 |
| 3 | OBJETIVO GERAL | 17 |
| 3.1 | Objetivos Específicos | 17 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 4.1 | Animais | 19 |
| 4.2 | Sacrifício | Erro! Indicador não definido. |
| 4.3 | Descarte | 20 |
| 4.4 | Grupos Experimentais..... | 20 |
| 4.5 | Divisão dos Grupos (DIAGRAMAS 1 e 2)..... | 22 |
| 4.6 | Experimento 1 | 23 |
| 4.6.1 | Análise dos níveis de BDNF e de proteínas relacionadas. | 23 |
| 4.7 | Experimento 2..... | 24 |
| 4.7.1 | Análise dos níveis de BDNF e de proteínas relacionadas. | 24 |
| 4.7.2 | Teste de Preferência pelo odor materno (filhotes PDN7)..... | 25 |
| 4.7.3 | Teste de Preferência Sexual (Animais Adultos)..... | 27 |
| 4.8 | Outros Procedimentos Associados..... | 29 |
| 4.9 | Análise Estatística | 30 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5 | RESULTADOS | 31 |
| 5.1 | Experimento 1 | 31 |
| 5.1.1 | Níveis de CREB nos machos 30 minutos após a manipulação | 31 |
| 5.1.2 | Níveis de pCREB nos machos 30 minutos após a manipulação | 32 |
| 5.1.3 | Níveis de BDNF nos machos 30 e 120 minutos após a manipulação | 33 |
| 5.1.4 | Níveis de pro-BDNF nos machos 30 e 120 minutos após a manipulação..... | 34 |
| 5.1.5 | Níveis de CREB nas fêmeas 30 minutos após a manipulação | 35 |
| 5.1.6 | Níveis de pCREB nas fêmeas 30 minutos após a manipulação | 36 |
| 5.1.7 | Níveis de BDNF nas fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação | 37 |
| 5.1.8 | Níveis de pro-BDNF nas fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação..... | 38 |
| 5.2 | Experimento 2..... | 39 |
| 5.2.1 | Nível de BDNF em ambos os sexos no DPN 7 | 39 |
| 5.2.2 | Nível de pro-BDNF em ambos os sexos no DPN 7 | 40 |
| 5.2.3 | Preferência Pelo Odor do Ninho em Ambos os Sexos (DPN 7) | 41 |
| 5.2.4 | Preferência Sexual | 42 |
| 6 | DISCUSSÃO | 44 |
| 6.1 | Mecanismos Moleculares de Atuação da Manipulação Repetida no BO | 44 |
| 6.2 | Manipulação Única no DPN1 - Efeitos Bioquímicos e Comportamentais..... | 51 |
| 7 | CONCLUSÕES | 56 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |

Lista de Figuras e Ilustrações

Figuras

Figura 1. Representação esquemática de diversos fatores que influenciam na resposta ao estresse e os diversos mediadores que podem ser utilizados dependendo do tipo de estresse. Esquema traduzido e adaptado pelo autor retirado de (Joëls e Baram 2009)..... 2

Figura 2. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO. Para o filhote aprender a ter preferência por um odor é necessário o pareamento deste odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003)..... 10

Figura 3. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO mostrando a possível atuação do comportamento da mãe no funcionamento da via e na produção de BDNF no bulbo olfatório dos filhotes após o protocolo de manipulação. 14

Diagramas

Diagrama 1- Divisão dos Grupos no Experimento 1 – Os grupos deste experimento foram controle não manipulado (NM), Manipulação única no DPN7 (M7) e manipulação repetida até o DPN 7 (MR)..... 22

Diagrama 2 - Divisão dos Grupos no Experimento 2 – Os grupos deste experimento foram controle não manipulado (NM) e Manipulação única no DPN1 (M1)..... 23

Gráficos

Gráfico 1. MÉDIA±E.P.M. do nível de CREB em filhotes machos 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. n=6 em todos os grupos. 31

Gráfico 2. MÉDIA±E.P.M. do nível de pCREB em filhotes machos 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). n =6-5 em todos os grupos. 32

Gráfico 3. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes machos 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,01 diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). n =6-5 em todos os grupos. 33

Gráfico 4. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes machos 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,05 or P<0,01 diferença significativa comparado com o grupo controle (não manipulado). n =6-5 em todos grupos..... 34

Gráfico 5. MEDIA±E.P.M. do nível de CREB em filhotes fêmeas 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. n =6 em todos os grupos..... 35

Gráfico 6. MEDIA±E.P.M. do nível de pCREB em filhotes fêmeas 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,05 ou P<0,01, diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). n =6-5 em todos os grupos. 36

Gráfico 7. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. n =6 em todos os grupos..... 37

Gráfico 8. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,05 or P<0,01 diferença significativa comparado com o grupo controle (não manipulado). n =6-5 em todos grupos..... 38

Gráfico 9. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes machos E fêmeas no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. *P<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle do mesmo sexo (não manipulado). n =6-5 em todos grupos. 39

Gráfico 10. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes machos E fêmeas no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. n =6 em todos grupos..... 40

Gráfico 11. MÉDIA±E.P.M. do tempo na área das maravalhas em filhotes de ambos os sexos no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de Duas Vias seguido de Bonferroni posttests. *P<0,05 diferença significativa no tempo de permanência nas áreas da maravalhas. n =11 em todos os grupos..... 41

Gráfico 12. MÉDIA±E.P.M. do tempo na área dos animais em adultos de ambos os sexos. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de Duas Vias seguido de Bonferroni posttests. *P<0,01 diferença significativa no tempo de exploração nas áreas dos animais ativo e castrado. n =11 em todos os grupos..... 42

Esquemas

- Esquema 1** – Atuação dos adrenoreceptores alfa 1 e alfa 2 no Locus Coeruleus de filhotes no período neonatal (NEONATE) e quando desmamados (WEANLING) mostrando o balanço entra a atuação dos dois e sua repercussão em áreas alvo como o bulbo olfatório (Figura retirada de Sullivan, 2001)..... 9
- Esquema 2** – Exemplo de atuação de neurotransmissores na fosforilação do CREB e ativação de todo o complexo que irá atuar no núcleo promovendo a transcrição do gene do BDNF e a produção do BDNF primeiro na forma de seu precursor e depois clivado em varias moléculas de BDNF. Depois o BDNF é empacotado e liberado podendo atuar tanto em outra célula como na própria célula que o produziu e liberou. Modificado pelo autor retirado de *R&D Systems Cytokine Bulletin(2), 2009.* 12
- Esquema 3** – A figura A mostra o esquema utilizado para o teste de preferência pelo odor do ninho. A figura B mostra a caixa utilizada para o teste, onde se vê as duas áreas contendo as maravalhas e a linha neutra (em vermelho) que divide as duas áreas. A figura C mostra o posicionamento do filhote no início de cada teste. 26
- Esquema 4** – A figura A mostra o esquema utilizado para o teste de preferência sexual, onde o rato a ser testado se ambienta por 15 minutos e a seguir os animais-estímulos são colocados e se inicia a filmagem dos comportamentos por 15 minutos. A figura B mostra a caixa utilizada para o teste de preferência sexual. 28
- Esquema 5** – Proposto mecanismo para as modificações encontradas no sinal de BDNF nos machos e suas possíveis repercussões para a morfologia das células do bulbo olfatório, promovidas pela manipulação repetida até o DPN 7. Redução na função noradrenérgica (*Ponto 1*). Aumento da função serotoninérgica (*Ponto 2 e 3*). Não foi encontrado um aumento nos níveis de pCREB apenas uma tendência (*Ponto 4*). Aumento dos níveis de pro-BDNF (*Ponto 5*). Aumento dos níveis de BDNF (*Ponto 6*). O *ponto 7* do esquema 7 representa uma célula do bulbo olfatório com sua morfologia alterada como possível atuação do aumento repetido de BDNF ao longo da primeira semana de vida. 46
- Esquema 6** – Proposto mecanismo para as modificações encontradas no sinal de BDNF nas fêmeas promovidas pela manipulação repetida até o DPN 7.Redução na função noradrenérgica nas fêmeas manipuladas repetidamente (*Ponto 1 e 2*) Mudanças na estrutura do Locus Coeruleus (*Ponto 3*). Diminuição dos níveis de pCREB (*Ponto 4*). Redução dos níveis de pro-BDNF (*Ponto 5*). os níveis de BDNF não foram alterados (*Ponto 6* do Esquema 5) Como não encontramos diferença nos níveis de BDNF é difícil de identificar se existe atuação duradoura desse protocolo no sinal de BDNF nas fêmeas. 50

Lista de Abreviaturas

- ✓ *5-HT1A – RECEPTOR DA SEROTONINA TIPO 1^a*
- ✓ *5-HIAA – METABOLITO DA SEROTONINA (Ácido 5-Hidroxi-indolacetico)*
- ✓ *ACTH – HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO*
- ✓ *ADN – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO*
- ✓ *ANOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA*
- ✓ *APOM - ÁREA PRÉ-ÓPICA MEDIAL*
- ✓ *AVP – VASOPRESSINA*
- ✓ *BO – BULBO OLFATÓRIO*
- ✓ *BDNF – FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO*
- ✓ *CBP – PROTEÍNA LIGANTE AO CREB*
- ✓ *CRE – ELEMENTO RESPONSIVO AO AMP_c*
- ✓ *CREB – PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ELEMENTO RESPONSIVO AO AMP_c*
- ✓ *CRH – HORMÔNIO LIBERADOR DA CORTICOTROFINA*
- ✓ *DPN – DIA PÓS-NATAL*
- ✓ *EPM – ERRO PADRÃO DA MÉDIA*
- ✓ *HPA – EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL*
- ✓ *LC – LOCUS COERULEUS*
- ✓ *MHPG – METABOLITO DA NORADRENALINA (3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglocol)*
- ✓ *NA – NORADRENALINA*
- ✓ *NM – GRUPO CONTROLE NÃO MANIPULADO*
- ✓ *MI – GRUPO MANIPULAÇÃO ÚNICA NO DIA 1*

- ✓ *M7 – GRUPO MANIPULAÇÃO ÚNICA NO DIA 7*
- ✓ *MR – GRUPO MANIPULAÇÃO REPETIDA ATÉ O DIA 7*
- ✓ *OVX – FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS*
- ✓ *pro-BDNF – PROTEÍNA PRECURSORA DO BDNF*
- ✓ *pCREB – PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ELEMENTO RESPONSIVO AO AMPc
FOSFORILADA*
- ✓ *PBS – TAMPÃO FOSFATO-SALINO*
- ✓ *PKA – PROTEÍNA CINASE A*
- ✓ *PKC – PROTEÍNA CINASE C*
- ✓ *PVDF – FLUORETO DE POLIVINILIDINA*
- ✓ *PVN – NÚCLEO PARAVENTRICULAR*
- ✓ *SNC – SISTEMA NERVOSO CENTRAL*
- ✓ *TBST – SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS-FOSFATO-SALINO-TWEEN*

Resumo

Reis, Adolfo Rodrigues. **Efeito da Manipulação Neonatal Sobre o Sinal de BDNF no Bulbo Olfatório de Ratos**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

Ao nascerem os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido e os primeiros dias de vida representam uma fase crítica para o desenvolvimento do sistema nervoso, de fato nesta fase o encéfalo está passando por diversos processos fundamentais como organização funcional das redes neurais, proliferação neuronal, migração, diferenciação, além de gliogênese e mielinização.

Em ratos, um procedimento simples, como “manipular” os filhotes por alguns minutos durante a primeira semana de vida, pode marcar decisivamente o desenvolvimento do indivíduo. Assim, a manipulação neonatal tem sido muito utilizada para se examinar os mecanismos pelos quais variações ambientais podem afetar o desenvolvimento do filhote.

A manipulação neonatal promove uma série de alterações comportamentais e neuroendócrinas que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo no adulto. Além das mudanças neuroendócrinas já foram relatadas diversas alterações sobre a estrutura do sistema nervoso, como por exemplo, na densidade de células na área pré-óptica medial, na amígdala medial póstero-dorsal e no núcleo periventricular antero ventral, no córtex pré-frontal, núcleos amigdalóides e no *Locus coeruleus* que apresenta papel decisivo durante o desenvolvimento.

Sabe-se que o *Locus coeruleus* apresenta uma atuação muito importante no aprendizado olfatório, pois, apresenta uma via de conexão com o bulbo olfatório. O estímulo tátil realizado pela mãe (Lambida) atua sobre o *locus coeruleus* promovendo um aumento na liberação de noradrenalina no bulbo olfatório, que vai resultar na fosforilação do CREB (proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc), que por sua vez promove a transcrição de vários genes como o de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo).

Como foi demonstrado que a manipulação pode atuar na estrutura do *Locus coeruleus* e também pode alterar o comportamento maternal isso provoca profundas mudanças na via noradrenérgica e o bulbo como sendo uma de suas áreas de eferência também estaria sujeito a essas modificações.

A manipulação neonatal poderia alterar o comportamento maternal, modificando o padrão de lambida da mãe nos filhotes, comprometendo o aporte de noradrenalina no bulbo e por sua vez alterando os níveis de pCREB (proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc fosforilada) e BDNF no bulbo olfatório

O BDNF atua em diversos processos durante o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo que alterações na sinalização desse fator poderia ser a causa de modificações estruturais e comportamentais encontradas para a manipulação neonatal.

Portanto, nesta dissertação avaliamos o efeito da manipulação neonatal sobre a fosforilação da CREB usando uma abordagem diferente daquela utilizada por Rainecki et al (2009) e também analisar o efeito da manipulação do sinal de BDNF no bulbo olfatório de ratos no dia 7 pós-natal com o intuito de verificar se as alterações na fosforilação do CREB se traduzem em alterações nos níveis de proteínas (BDNF e seu pré-cursor o pro-BDNF).

Os resultados dessa dissertação mostram que manipulação neonatal tanto única como repetida foi capaz de promover alterações bioquímicas no bulbo olfatório de filhotes no dia 7 pós-natal. Além disso, as modificações encontradas nos níveis de pCREB e BDNF em resposta a manipulação sugerem que este protocolo promova alterações duradouras nos níveis de BDNF. Essas mudanças poderiam ser responsáveis por alterações estruturais estáveis no bulbo olfatório desses animais, como já relatados para muitas outras áreas do encéfalo. Sendo que essas alterações na estrutura cerebral poderiam ser a causa de diversos distúrbios psiquiátricos encontrados na vida adulta.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Diversidade da Resposta ao Estresse*

Apesar da palavra estresse geralmente apresentar uma conotação negativa, o estresse é um componente importante da vida, sendo estimulante em algumas ocasiões, mas um fardo em muitas outras (Dhabhar 2009).

O cérebro é o órgão central da resposta ao estresse, é ele que determina não só o que será considerado um estímulo estressante, mas também controla as respostas comportamentais e fisiológicas em resposta a estressores reais ou em potencial (McEwen 2008). No entanto, o cérebro também é alvo de mudanças causadas pelo estresse e pode apresentar mudanças químicas e estruturais em resposta a estresses agudos e crônicos (McEwen 2008; Joëls & Baram 2009).

Os glicocorticóides como o cortisol em humanos e a corticosterona nos roedores, são comumente citados como centrais para as alterações provocadas pelo estresse, no entanto, outros fatores são também essenciais para a resposta ao estresse e suas consequências para o organismo.

Existem vários fatores que podem influenciar uma resposta ao estresse, bem como, diferentes tipos de estresse podem ter respostas ou mediadores específicos dependendo de quais respostas serão importantes para lidar com evento estressor como mostra a Figura 1 (Joëls & Baram 2009).

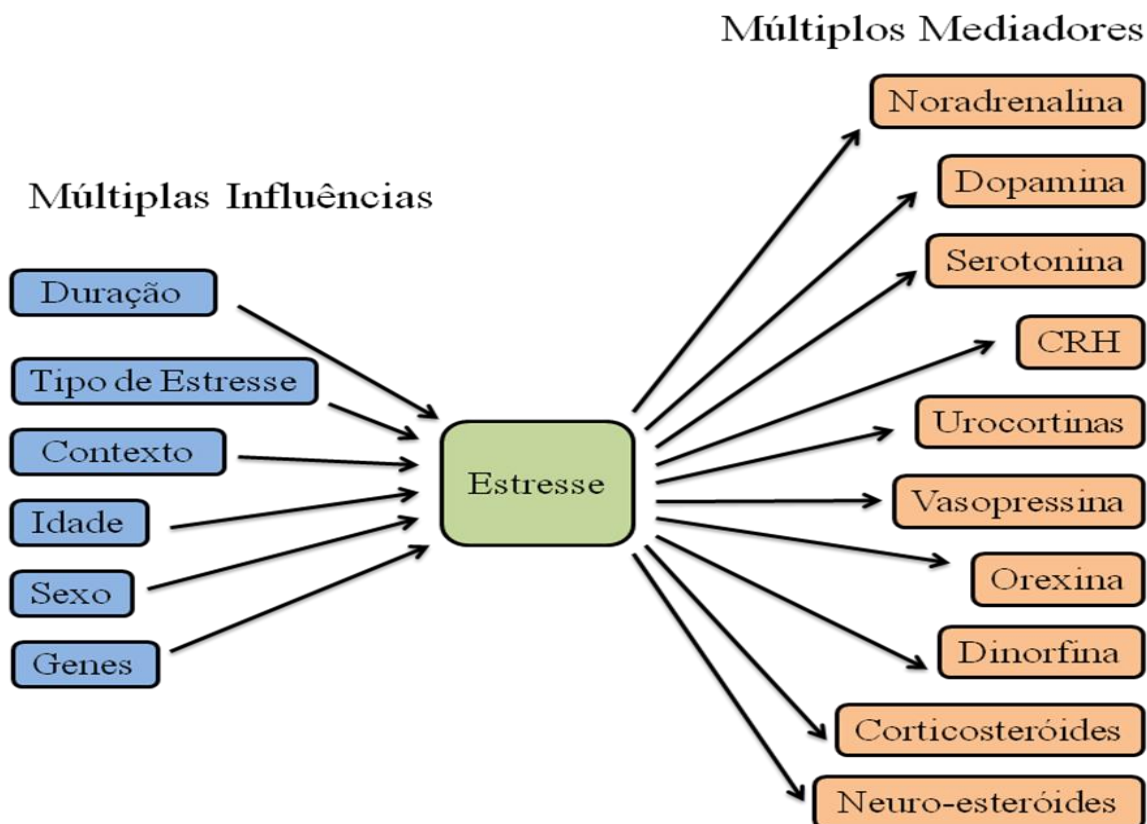


Figura 1. Representação esquemática de diversos fatores que influenciam na resposta ao estresse e os diversos mediadores que podem ser utilizados dependendo do tipo de estresse. Esquema traduzido e adaptado pelo autor retirado de (Joëls e Baram 2009).

Os dois principais sistemas neuroendócrinos envolvidos em integrar as respostas a um estressor são o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e o sistema neurovegetativo simpático. A ativação do eixo HPA resulta na liberação de cortisol ou corticosterona do córtex da adrenal.

O aumento da atividade catecolaminérgica, e da ativação deste eixo, integrado com diversos outros sistemas neuroendócrinos, regulam a função vascular e a captação de energia, facilitando as respostas comportamentais adequadas e servindo para manter a homeostase (Kolber *et al.* 2008).

Para que isto ocorra, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que irão atuar ativando a hipófise anterior e promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez irá promover a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (Kolber *et al.* 2008; Herman & Cullinan, 1997).

Os glicocorticóides, em um organismo adulto regulam diversas funções que visam à manutenção dos processos metabólicos básicos, bem como a regulação de um organismo em resposta ao estresse (Kolber *et al.* 2008). No homem, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e no rato, a corticosterona.

A maior parte dos efeitos da corticosterona são rapidamente revertidos em um organismo adulto, entretanto a administração deste hormônio durante o desenvolvimento tem mostrado efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação de diversos sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (Levine 2001).

A ativação do sistema neurovegetativo simpático também é induzida em resposta ao estresse e resulta na liberação de noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos e pela medula da adrenal na corrente sanguínea, onde, junto com os glicocorticóides irão aumentar a lipólise, a glicogenólise e o catabolismo de proteínas.

Além desta descarga periférica, o estresse também induz a secreção de noradrenalina no SNC, sendo que grande parte origina-se no *Locus coeruleus* (LC) (Konstandi *et al.* 2000).

A corticosterona é um dos principais hormônios avaliados na resposta a diversos tipos de estressores, entretanto a prolactina também responde a esses estímulos. Diferentemente da resposta da corticosterona, que é mais tardia e prolongada, a prolactina retorna aos níveis basais dentro de aproximadamente 15 minutos. Sendo assim, os níveis de

prolactina juntamente com os de ACTH também podem ser considerados, como índice quantitativo das respostas a diferentes estressores (Freeman *et al.* 2000). No entanto, sabe-se que a resposta ao estresse nos filhotes logo após o nascimento apresenta peculiaridades que a diferencia da resposta clássica encontrada nos adultos.

1.2 Resposta ao Estresse no Período Neonatal

Ao nascerem os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido e os primeiros dias de vida representam uma fase crítica para o desenvolvimento do sistema nervoso, de fato nesta fase o encéfalo está passando por diversos processos fundamentais como organização funcional das redes neurais, proliferação neuronal, migração, diferenciação, além de gliogênese e mielinização (Rice e Barone, 2000).

Durante as duas primeiras semanas de vida, em ratos, a concentração de corticosterona plasmática é baixa e permanece assim até aproximadamente o 14º dia de vida. Além disso, as concentrações hipofisárias de ACTH, e hipotalâmicas de CRH, também são diminuídas neste período. Assim, estímulos que normalmente induziriam o aumento de ACTH em adultos são incapazes de fazê-lo em animais neonatos, durante esta fase. Este período é chamado de **período hiporresponsivo ao estresse** (Levine 2001; Sapolsky & Meaney, 1986).

Embora haja uma redução da resposta do eixo HPA no período hiporresponsivo, esta resposta é muito variável, sendo alterada por fatores como, por exemplo, a idade do animal o tempo e o tipo de estressor ao qual ele é submetido (De Kloet *et al.* 1998).

A resposta do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal dos filhotes ao estresse sofre grande influência do cuidado materno. Filhotes que sofreram privação materna

apresentarão uma resposta mais acentuada de ACTH e corticosterona, e essa influência pode persistir até a vida adulta do animal (Knuth & Etgen 2007; Levine, 2001; Lippman *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o eixo HPA de ratos neonatos responde a estímulos ambientais de uma maneira peculiar, diferente de um animal adulto (Dent *et al.* 2000) .

Em ratos, a administração de altas doses de glicocorticóides causa um decréscimo na mitose, na mielinização, na migração e também é capaz de alterar a neuromorfogênese (Hadoke *et al.* 2006). Além disso, pode aumentar o risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos adultos (Hadoke *et al.* 2009). Sendo assim, a manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é necessária para um desenvolvimento normal do animal (Levine 2001).

O período hiporresponsivo ao estresse é, então, um importante mecanismo para proteger o filhote de uma secreção aumentada de glicocorticóides, durante o período crítico de desenvolvimento cerebral (Sapolsky & Meaney, 1986). Devido a este fator, o neonato necessita do cuidado maternal adequado nesta fase, para diminuir a exposição do mesmo a estressores (Sapolsky & Meaney, 1986).

Eventos estressantes durante o período pós-natal poderiam predispor o indivíduo ao desenvolvimento de diversos tipos de transtornos psiquiátricos na vida adulta (Sanchez *et al.*, 2001; Heim *et al.* 2004).

O estresse neonatal seria capaz de induzir mudanças neurobiológicas e comportamentais definitivas no fenótipo dos adultos (Vázquez *et al.* 2005; Cui *et al.* 2004; Walker *et al.* 2003; Walker *et al.* 2004; Yi & Baram 1994; Levine 2001).

O impacto do estresse neonatal tem sido estudado usando vários modelos animais (Meaney *et al.*, 1988; van Oers *et al.*, 1999; Huot *et al.*, 2002; Poeggel *et al.*, 2003).

1.3 Manipulação Neonatal

A manipulação neonatal é um paradigma experimental usado para testar os efeitos do estímulo ambiental da vida do recém-nascido em uma variedade de comportamentos e sistemas neuroendócrinos (Todeschin *et al.* 2009; Rainecki *et al.* 2009; Winkelmann-Duarte *et al.* 2007; Gomes *et al.*, 2005; Severino *et al.* 2004; Padoin *et al.*, 2001).

As interações mãe-filhote são essenciais para o desenvolvimento do filhote. Modelos de estresse como a manipulação neonatal poderiam afetar o comportamento materno, aumentar o cuidado parental (Pryce *et al.* 2001) e contribuir para as alterações na vida adulta da prole.

Alterações ou interferências sobre a relação mãe-filhote no período neonatal, como a manipulação neonatal, podem provocar um distúrbio nesta relação, modificando assim o comportamento da mãe em relação a sua prole.

Em geral, mães de filhotes que foram manipulados permanecem mais tempo cuidando da sua prole, sendo que, um dos comportamentos alterados é o de lambem os filhotes. Mães de filhotes manipulados lambem mais a prole do que as mães de filhotes não-manipulados (Liu *et al.* 1997).

Sabe-se que esse comportamento da mãe em relação ao filhote pode alterar o desenvolvimento do SNC (Levine 2001, Liu *et al.* 2000b, 1997, Francis *et al.* 1994, Meaney *et al.* 1993). Portanto, postula-se que seria a alteração nesta relação mãe-filhote a responsável pelo padrão comportamental e neuroendócrino observado em ratos manipulados no período pós-natal.

Estudos mostram que no rato, ocorrem variações naturais no cuidado maternal que alteram permanentemente o comportamento e a regulação neuroquímica dos filhotes

(Champagne *et al.* 2003, Bredy *et al.* 2003, Francis *et al.* 2002). Liu *et al.* (1997) mostraram que filhotes cujas mães permanecem mais tempo no ninho e apresentam aumento nos níveis de lambda, quando adultos estes animais apresentam um aumento da concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma menor secreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse.

Esses dados são similares aos dos animais que foram manipulados no período neonatal (Levine 1994, Meaney *et al.* 1993). Outra característica que é similar entre os filhotes que foram manipulados e os que naturalmente receberam maior cuidado maternal é o seu comportamento no campo aberto quando adulto, os dois apresentam um aumento geral da atividade exploratória (Champagne *et al.* 2003, Padoin *et al.* 2001).

Animais cujas mães que tem um alto cuidado com a sua prole apresentam um aumento na taxa de sinaptogênese ou aumento na sobrevivência das sinapses no hipocampo comparado a animais cujas mães têm um baixo cuidado com a sua prole (Liu *et al.* 2000b). Sendo assim, a variação no cuidado maternal pode ser considerada o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes.

Estudos demonstraram que a manipulação neonatal altera respostas emocionais como medo (Fernandez-Teruel *et al.*, 1991; Padoin *et al.*, 2001), o comportamento sexual (Gomes *et al.* 1999), e agressividade maternal (Padoin *et al.*, 2001).

Além das mudanças neuroendócrinas já foram relatadas diversas alterações sobre a estrutura do sistema nervoso, como por exemplo, na densidade de células na área pré-óptica medial (Lucion *et al.* 1999), na amígdala medial póstero-dorsal e no núcleo periventricular (Camozzato *et al.* 2006), no córtex pré-frontal, núcleos amidalóides (Bodnoff *et al.* 1987) e no *Locus coeruleus* (Caldji *et al.* 2000; Lucion *et al.* 2003) que apresenta papel decisivo na resposta ao estresse.

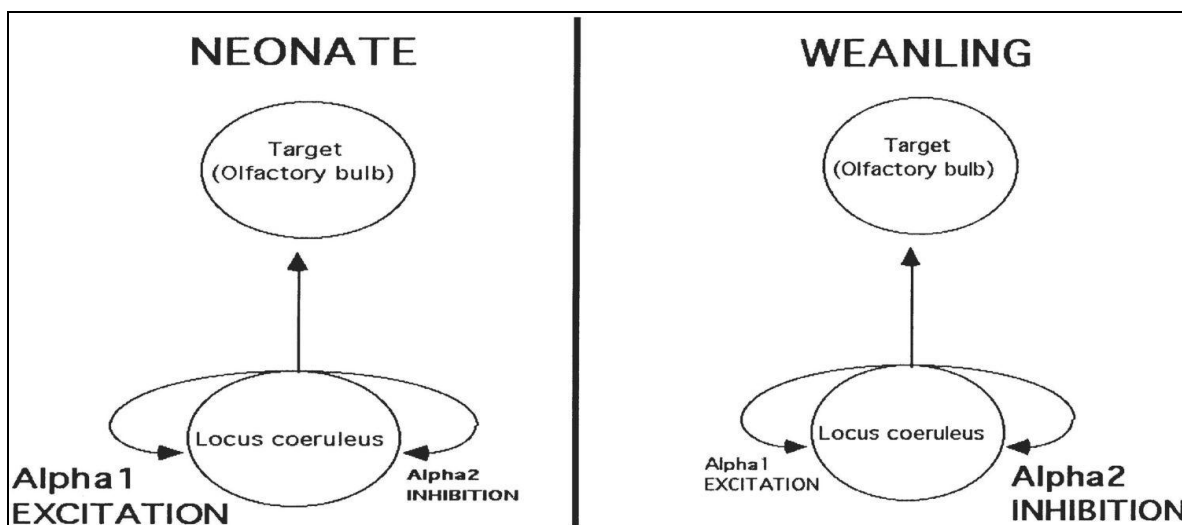
O *Locus coeruleus*, que se localiza no tegumento dorsolateral da ponte, é o responsável por mais da metade dos neurônios noradrenérgicos do sistema nervoso central. O LC apresenta um papel importante na resposta a estímulos estressores (Morila *et al.* 1987a, 1987b e 1987c; Van Bockstaele 2001), suas inervações atingem difusamente todo o cérebro, principalmente áreas como o córtex e o hipocampo regulando uma série de funções como humor, estado de vigília, atenção, aquisição de memória (Barnes & Pompeiano, 1991; Cirelli & Tononi, 2000). Disfunções noradrenérgicas têm sido associadas a diversos distúrbios psiquiátricos como transtorno depressivo maior e transtorno bipolar (Wiste *et al.*, 2008) esquizofrenia (Marnier *et al.*, 2005) e autismo (Bailey *et al.*, 1998).

Além disso, o LC tem uma importante atuação sobre o sistema olfatório. O olfato, juntamente com o tato, é responsável pelas primeiras formas de interação do filhote diretamente com o ambiente.

O processo de aprendizado olfatório produz mudanças metabólicas e anatômicas no bulbo olfatório que são mantidas ao longo da vida do animal (Sullivan, 2005), e este processo está intimamente relacionado com a atividade noradrenérgica do LC (Moriceau & Sullivan, 2004).

Sabe-se que a função noradrenérgica do filhote é diferente da do adulto. Isso acontece principalmente pela pouca ou ausência da atuação inibitória dos auto-receptores α_2 -adrenérgicos no filhote.

Estes Receptores completam sua maturação por volta do dia pós-natal 10 (DPN10) (Nakamura *et al.*, 1987; Nakamura e Sakaguchi, 1990). Inibindo significativamente a atividade do LC e sua responsividade à medida que o animal vai se desenvolvendo até se tornar adulto (Esquema 1).



Esquema 1 – Atuação dos adrenoreceptores alfa 1 e alfa 2 no Locus Coeruleus de filhotes no período neonatal (NEONATE) e quando desmamados (WEANLING) mostrando o balanço entre a atuação dos dois e sua repercussão em áreas alvo como o bulbo olfatório (Figura retirada de Sullivan, 2001)

O LC dos filhotes no período neonatal apresenta uma grande sensibilidade a estímulos sensoriais e essa característica única deste período é essencial para o aprendizado olfatório do filhote e para o ideal desenvolvimento do sistema nervoso do filhote (Sullivan, 2001).

1.4 Aprendizado Olfatório e Via Noradrenalina/CREB

A noradrenalina do LC tem um papel fundamental no desenvolvimento e modificação do sistema sensorial de mamíferos (Sullivan & Wilson 1994). Como mostra a figura 2, uma das áreas que recebe densa projeção noradrenérgica do LC é o bulbo olfatório (BO), área essa que apresenta receptores β -adrenérgicos que já estão funcionais durante as primeiras semanas de vida dos ratos (Woo & Leon 1995a, McLean & Shipley 1991, Wilson & Leon 1988).

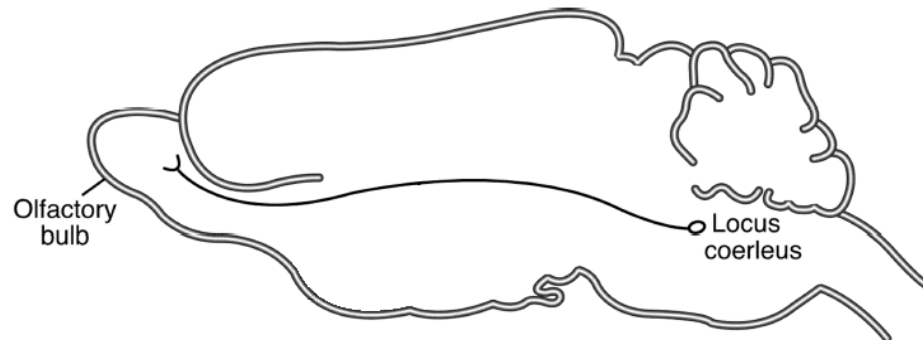


Figura 2. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO. Para o filhote aprender a ter preferência por um odor é necessário o pareamento deste odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003).

Rangel e Leon (1995) demonstraram que a estimulação tátil com pincel é capaz de promover um aumento no conteúdo de NA no BO.

De fato, a estimulação do LC com acetilcolina, pareado com a apresentação de um novo odor, induz a preferência por esse odor no filhote (Sullivan *et al.* 2000).

No entanto, lesão bilateral do LC em filhotes, com 6-OHDA, reduz o conteúdo de NA no BO impedindo a formação do aprendizado olfatório nesses animais (Sullivan *et al.* 1994).

Portanto, logo após o nascimento, quando a mãe lambe o filhote (estimulação tátil) ela promove liberação de NA pelo LC que age no BO e promove o aprendizado olfatório, fazendo com que o filhote tenha preferência pelo cheiro da mãe.

A liberação de NA pelo LC induzida pela estimulação tátil, necessária para o aprendizado olfatório, pode ser substituída pela microinjeção de isoproterenol (agonista β -

adrenérgico) diretamente no BO (Sullivan *et al.* 2000) ou periféricamente (Harley *et al.* 2006, McLean *et al.* 2005).

A ação do isoproterenol no aprendizado olfatório exibe uma curva em U invertida, em que injeções periféricas com doses baixas (1 mg/kg) ou altas (4 mg/kg) não são efetivas na indução do aprendizado, o que ocorre com uma dose moderada (2 mg/kg), que é uma concentração ótima para o aprendizado olfatório (Langdon *et al.* 1997, Sullivan *et al.* 1991, 1989).

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

O CREB pertence a uma família de fatores de transcrição denominada CREB/ATF e participa de eventos de sinalização intracelular que regulam uma grande variedade de funções biológicas, incluindo a proliferação celular na pituitária (Struthers *et al.* 1991), diferenciação sexual do SNC (Auger *et al.* 2001), espermatogênese (Don & Stelzer 2002, Scobey *et al.* 2001) e formação de memória (Cammarota *et al.* 2000, Silva *et al.* 1998).

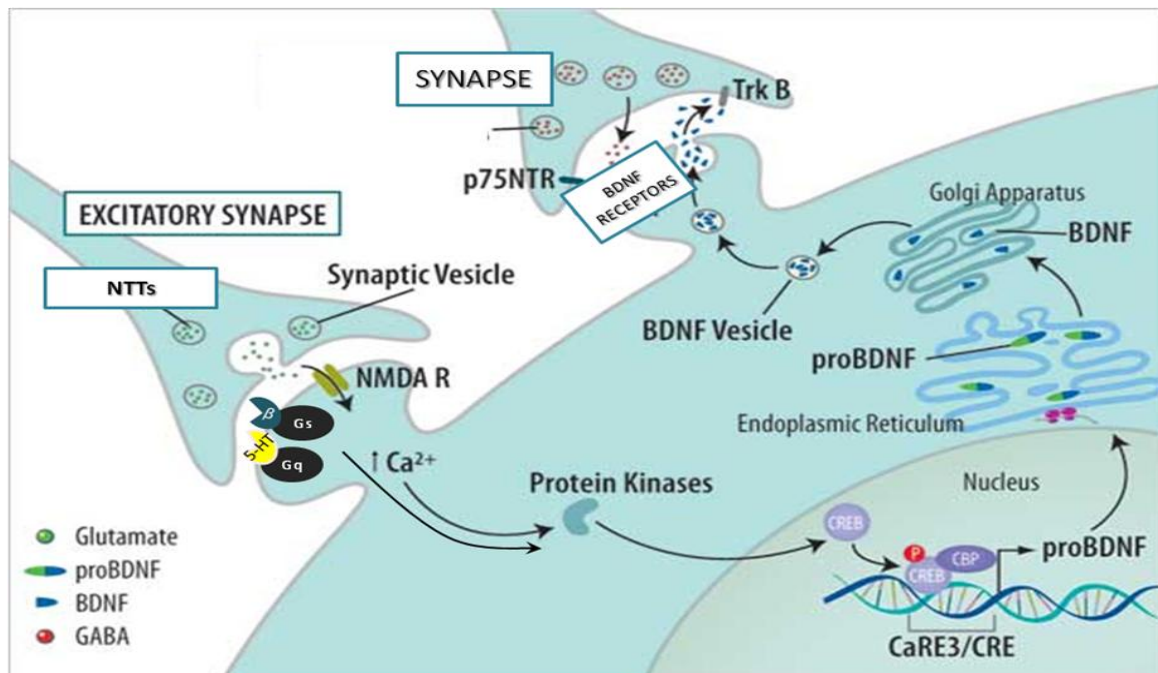
A ativação transcricional mediada por CREB depende da presença de uma proteína nuclear denominada CBP (proteína ligante ao CREB), a qual se liga especificamente à forma fosforilada do CREB.

Após, o complexo CREB/CBP liga-se a regiões específicas do ADN, pois as proteínas pertencentes à família de fatores de transcrição CREB/ATF apresentam, em sua

estrutura, domínios para a ativação da transcrição e regiões que permitem a dimerização e a ligação ao DNA, os quais são responsáveis pela ligação à sequência CRE (elemento responsivo ao AMPc), permitindo o início da transcrição de genes que apresentam uma sequência que responde ao estímulo por AMPc nos seus promotores (Lamprecht 1999, Silva *et al.* 1998).

1.5 CREB e BDNF - Modificações Estruturais no Bulbo Olfatório

O CREB apresenta no mínimo, dez produtos gênicos distintos, sendo um deles o Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (Tao *et al.* 1998, Binker & Scharfman, 2004). Durante o desenvolvimento dos vertebrados, a sobrevivência dos neurônios depende de fatores neurotróficos derivados de suas conexões (Levi-montalcini, 1987, Barde 1989).



Esquema 2 - Exemplo de atuação de neurotransmissores na fosforilação do CREB e ativação de todo o complexo que irá atuar no núcleo promovendo a transcrição do gene do BDNF e a produção do BDNF primeiro na forma de seu precursor e depois clivado em varias moléculas de BDNF. Depois o BDNF é empacotado e liberado podendo atuar tanto em outra célula como na própria célula que o produziu e liberou. Modificado pelo autor retirado de *R&D Systems Cytokine Bulletin(2), 2009*.

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (sigla em inglês BDNF) apresenta um importante papel em diversos processos como, por exemplo, para a regulação da morte celular, do desenvolvimento dos padrões de conexões, para o crescimento e complexidade dos dendritos no córtex cerebral (Huang *et al.* 2001).

A estimulação tátil realizada pela mãe, como no comportamento de lambar, induz à liberação de NA, proveniente do LC no BO, a qual se liga aos receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos aumentando os níveis de AMPc (Yuan *et al.*, 2000; Sullivan e Wilson 1994, Sullivan *et al.* 1991, 1989).

O aumento dos níveis de AMPc leva a fosforilação do CREB. O CREB por sua vez atua na transcrição de diversos fatores fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso como é o caso do BDNF como mostra o esquema 2.

O BDNF por sua vez estará implicado em processos como a plasticidade, morfologia da arborização dendrítica, sobrevivência, migração e diferenciação neuronal e até na competição axonal no bulbo olfatório durante o período neonatal (Imamura & Greer 2009; Gascon *et al.* 2007; Chiamello *et al.* 2007; Tran *et al.* 2008; Matsutani & Yamamoto 2004; Cao *et al.* 2007).

Embora não existam relatos sobre o efeito da manipulação neonatal sobre a morfologia do bulbo olfatório estudos mostram que a manipulação repetida até o sétimo dia pós natal promove mudanças importantes no sistema monoaminérgico dos filhotes no dia 7, além de serem encontradas também diferenças nos níveis de CREB no bulbo olfatório (Rainecki *et al.*, 2009).

Embora as mudanças nos níveis de CREB não levaram a respostas conclusivas neste trabalho o resultado sugere que a manipulação repetida pode provocar alterações epigenéticas no BO (Rainecki *et al.* 2009).

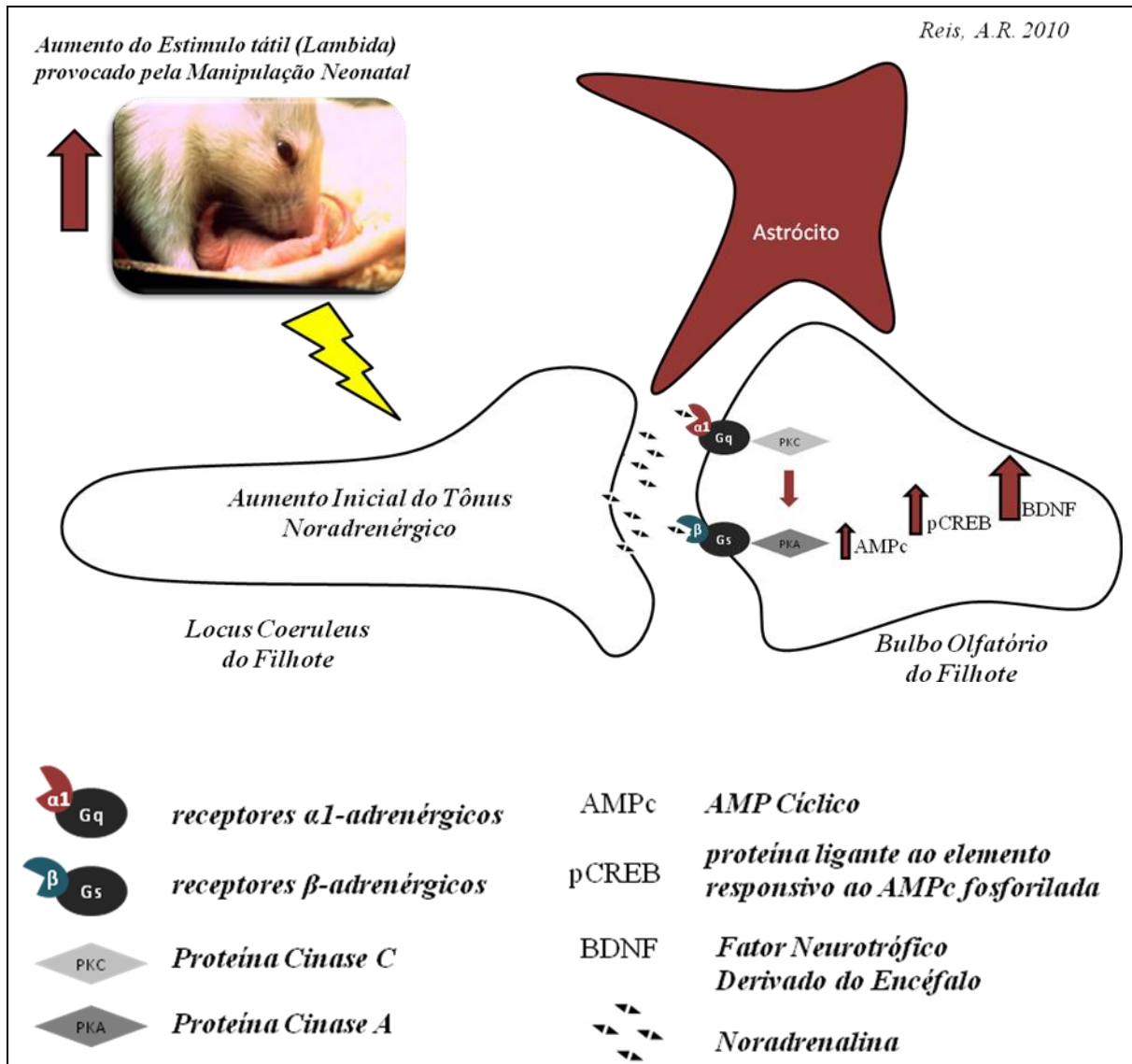


Figura 3 - Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO mostrando a possível atuação do comportamento da mãe no funcionamento da via e na produção de BDNF no bulbo olfatório dos filhotes após o protocolo de manipulação.

Essas alterações no sistema monoaminérgico e na fosforilação do CREB induzidas pela manipulação neonatal e sua atuação no comportamento da mãe, poderiam alterar o sinal de BDNF e promover alterações na estrutura do bulbo olfatório, como acontece em outras áreas do cérebro (Figura 3).

Nesta dissertação avaliamos o efeito da manipulação neonatal sobre a fosforilação da CREB usando uma abordagem diferente daquela utilizada por Rainecki *et al* (2009). Além disso, verificamos o efeito da manipulação neonatal sobre o sinal de BDNF no bulbo olfatório de ratos no dia 7 pós-natal para constatar se as alterações na fosforilação do CREB se traduzem em alterações nos níveis de proteínas (BDNF e seu pré-cursor o pró-BDNF).

2 JUSTIFICATIVA

A manipulação neonatal pode alterar várias respostas comportamentais e comprometer o desenvolvimento normal de estruturas cerebrais como o *Locus Coeruleus* e o bulbo olfatório. Essas alterações podem estar relacionadas com o aparecimento de diversos distúrbios psiquiátricos e neurológicos na vida adulta. Assim o estudo sobre as causas e possíveis vias de sinalização pelas quais ocorrem estas modificações é de suma importância para o entendimento da influência do cuidado materno e do ambiente neonatal no desenvolvimento do sistema nervoso além de proporcionar uma melhor compreensão da relação do ambiente o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos e possibilitar a criação de novas estratégias terapêuticas.

Apesar de se saber que a sobrevivência, migração e maturação dos neurônios durante o desenvolvimento dos vertebrados dependem de fatores neurotróficos como o BDNF, pouco se sabe sobre os efeitos do estresse neonatal sobre a sinalização de BDNF no bulbo olfatório e qual sua relação com os efeitos na vida adulta desse tipo de estresse. Com este trabalho pretendemos mostrar que a manipulação pode promover alterações no sinal de BDNF no bulbo olfatório, e assim alterar a estrutura do encéfalo.

3 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da manipulação neonatal sobre o desenvolvimento do bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas através de alterações nos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e de proteínas relacionadas com sua produção visando uma maior compreensão sobre os efeitos desse modelo de estresse sobre o desenvolvimento de estruturas do sistema nervoso, bem como uma melhor compreensão das origens dos transtornos psiquiátricos, como depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia e autismo, além de possibilitar a criação de novas estratégias terapêuticas.

3.1 *Objetivos Específicos*

Experimento 1 - Verificar se a manipulação neonatal única no dia 7 e a manipulação repetida desencadeiam alterações na produção de BDNF no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas no dia 7 de vida pós-natal além de observar se existem diferenças em relação ao sexo no efeito dessas intervenções. Para isto foram focados três níveis da cascata de produção do fator neurotrófico derivado do encéfalo:

- I. A fosforilação do fator de transcrição CREB (Verificar se a manipulação neonatal única no dia 7 e repetida afetaram os níveis de pCREB e CREB total no bulbo olfatório dos filhotes no DPN7.
- II. Verificar se os protocolos de manipulação única no dia 7 e repetida foram capazes de alterar os níveis de pro-BDNF (proteína precursora do BDNF) no bulbo olfatório dos filhotes no DPN7

- III. Verificar os níveis do próprio BDNF após o protocolo de manipulação neonatal (única ou repetida) no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas no DPN7.

Experimento 2 - Verificar se a manipulação neonatal única no dia 1 desencadeia alterações de longa duração na produção de BDNF no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas no dia 7 de vida pós-natal. Além disso, verificar se a manipulação única no dia 1 altera respostas comportamentais em filhotes e adultos como detalhado nos tópicos abaixo:

- I. Verificar os Níveis de BDNF e pro-BDNF no dia 7 de vida pós-parto.
- II. Verificar se a manipulação única no dia 1 altera a preferência pelo odor do ninho em ratos machos e fêmeas no dia 7 pós-natal.
- III. Verificar se a manipulação única no dia 1 altera a preferência sexual de ratos machos e fêmeas quando adultos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Animais*

Foram utilizadas 70 ratas Wistar prenhas neste estudo. As ratas foram levadas para o biotério setorial do Laboratorial de Neuroendocrinologia do Comportamento, cerca de uma semana antes do parto, onde foram colocadas em caixas individuais (com as seguintes dimensões: 65 x 55 x 25 cm) e observadas diariamente para determinar o dia ZERO ou dia de nascimento dos filhotes. Os animais foram mantidos no biotério setorial com temperatura ambiente a 22 ± 1 °C, num ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida ad libitum (Rodent Show, Nutrilab, Colombo, Brasil), e foram tratadas pelos funcionários do próprio CREAL. Todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo comitê de ética da instituição como consta no processo n°2007937.

4.2 *Eutanásia*

Os animais foram eutanasiados por decapitação para realização das análises bioquímicas. Este protocolo experimental foi necessário para que seja mínimo o estresse a que o animal é submetido e também para viabilizar a coleta das estruturas cerebrais de interesse desse trabalho. Os animais foram conduzidos do biotério setorial para o nosso laboratório, onde está localizada a guilhotina. O procedimento da decapitação é extremamente rápido, sob condições ideais de temperatura e ruído de forma a evitar qualquer sofrimento dos ratos. Esse procedimento foi realizado em uma sala separada, afastada dos outros animais para não estressá-los. A retirada do bulbo olfatório dos animais

foi realizada rapidamente na pia, em placas de petri forradas com papel filtro dentro de um isopor com gelo, onde o sangue foi imediatamente lavado e os materiais (papel com sangue) devidamente descartados após o procedimento.

4.3 Descarte

Quanto aos procedimentos de descarte, as carcaças animais foram acondicionadas em sacos plásticos de coloração branca, próprios para descarte, e colocadas no freezer (-18° C) do nosso laboratório e, após aviso prévio ao Biotério Central, foram conduzidas congeladas ao Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os resíduos biológicos, tais como: tecidos ou partes do encéfalo foram conduzidos ao CREAL, onde o tratamento é posteriormente padronizado. Todos os resíduos biológicos tiveram o mesmo tratamento dado às carcaças.

4.4 Grupos Experimentais

Não manipulado (NM): animais desse grupo não foram tocados pelos experimentadores nem pelos tratadores durante os primeiros 7 dias pós-natais (7 DPN) em referência ao DIA ZERO (dia do parto). No sétimo dia os animais foram sacrificados e os bulbos foram retirados e armazenadas em frascos com isopentano em gelo seco e estocado a -70°C, após os tempos de 30 e 120 minutos, tendo como referencial o horário em que foi feita a manipulação dos outros grupos.

Manipulados repetidamente (MR): animais que foram separados da mãe e manipulados durante 1 minuto por dia, nos 7 primeiros dias de vida pós-natal. A manipulação consiste em retirar a mãe da caixa-residência e colocá-la em uma caixa

separada enquanto os filhotes foram afastados do ninho e gentilmente manipulados, todos juntos, pelo pesquisador que utilizando luvas de látex, durante 1 minuto. Logo após, os filhotes foram devolvidos para suas caixas-residência e a mãe colocada junto a eles novamente até o sétimo dia quando foram sacrificados nos tempos de 30 e 120 minutos após a manipulação.

Manipulação única no dia 1 (M1): animais que foram separados da mãe e manipulados durante 1 minuto no dia 1 de vida pós-natal. A manipulação consiste em retirar a mãe da caixa-residência e colocá-la em uma sala separada enquanto os filhotes foram afastados do ninho e gentilmente manipulados, todos juntos, pelo pesquisador que utilizará luvas de látex, durante 1 minuto. Logo após, os filhotes foram devolvidos para suas caixas-residência e a mãe colocada junto a eles novamente até o sétimo dia quando foram sacrificados após 30 minutos, tendo como referencial o horário em que foi feita a manipulação dos outros grupos.

Manipulação única no dia 7 (M7): animais que foram separados da mãe e manipulados durante 1 minuto no dia 7 de vida pós-natal. Sendo realizado o mesmo protocolo de manipulação que os outros grupos. Em seguida foram realizados os procedimentos experimentais também nos mesmos tempos dos outros grupos após a manipulação do sétimo dia.

Os tempos de 30 e 120 minutos foram fixados levando em consideração a cinética de produção e atuação do BDNF e de pCREB e concordância com os estudos realizados neste tema na literatura (Garoflos *et al*, 2005b, 2007) e de acordo com a experiência prévia de pesquisadores do laboratório (Rainecki *et al*, 2009).

4.5 Divisão dos Grupos (DIAGRAMAS 1 e 2)

As fêmeas prenhas foram divididas em 4 grupos em função do tratamento, Controle não manipulado (NM), Manipulação Única no Dia 1 (M1), Manipulação única no dia 7 (M7) e Manipulação Repetida (MR). Os grupos foram subdivididos em 2 subgrupos (30 e 120) com relação aos tempos em que foram sacrificados como mostram em detalhes dos tópicos abaixo com exceção grupo M1 que foi analisado apenas aos 30 minutos.

Para as dosagens de proteínas por Western Blot foram utilizados apenas dois animais (1 macho e 1 Fêmea) por ninhada para evitar o “efeito ninhada”(Irmão e irmãs de uma mesma ninhada podem apresentar e compartilhar modificações da estrutura de uma proteína, por isso o uso de irmãos será evitado).

DIAGRAMA 1 – Divisão dos Grupos no Experimento 1 (Western Blot)

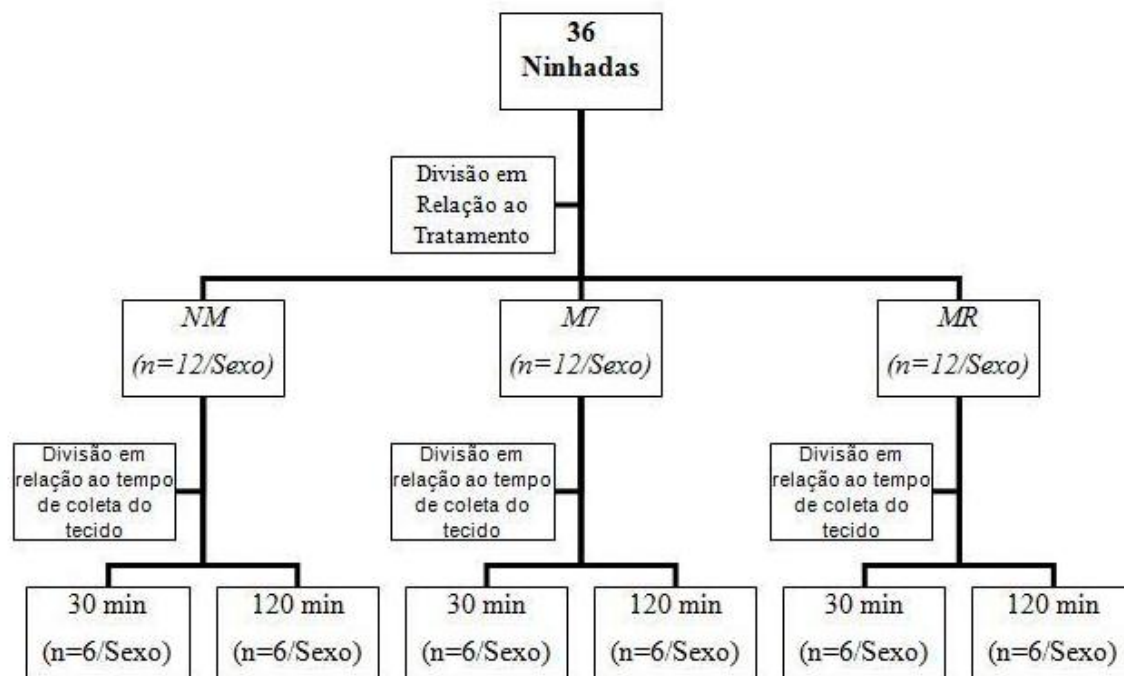


Diagrama 1- Divisão dos Grupos no Experimento 1 – Os grupos deste experimento foram controle não manipulado (NM), Manipulação única no DPN7 (M7) e manipulação repetida até o DPN 7 (MR). Ambos os sexos foram analisados.

DIAGRAMA 2- Divisão dos Grupos no Experimento 2

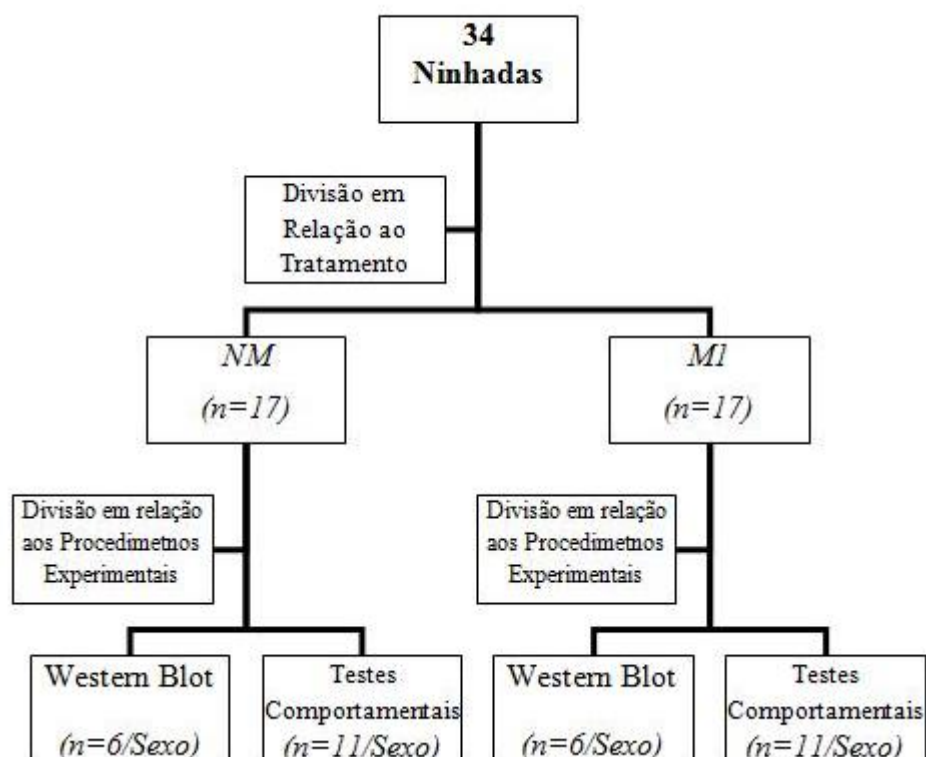


Diagrama 2 - Divisão dos Grupos no Experimento 2 – Os grupos deste experimento foram controle não manipulado (NM) e Manipulação única no DPN1 (M1). Ambos os sexos foram analisados.

4.6 Experimento 1

4.6.1 Análise dos níveis de BDNF e de proteínas relacionadas com sua produção no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas que sofreram intervenção neonatal e no controle.

Objetivo: verificar os níveis de BDNF, proBDNF, CREB e pCREB no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas.

Western Blot: Amostras (NM, n=6♂/6♀; M1 n=6♂/6♀ e MR, n=6♂/6♀) foram ferveridas na presença de 500µL de solução bloqueadora (4% sódio dodecil sulfato [SDS],

250mMTris-HCl, pH 6.8, 1% β -mercaptoetanol, 1% bromofenol Azul, e 20% glicerol) por 2 minutos a 90 °C. Proteínas (20 μ g por pista) foram separadas em um gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilidina). As amostras foram normalizadas de acordo com o total de proteínas, com quantidades iguais de cada proteína carregada por pista. Depois de bloqueados com solução tampão TBST (Tris-Fosfato-Salino-Tween) por 2 h, as proteínas foram incubadas de um dia para o outro, a 4°C, com os anticorpos primários (anti-BDNF 1:5000; anti-proBDNF 1:5000; anti-pCREB 1:4000; anti-CREB 1:5000). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com PBS (Tampão Fosfato-Salino) e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho conjugados a peroxidase (BDNF 1:80000, pCREB 1:50000, proBDNF, 1:80000 e anti-CREB 1:50000) por 2 h na temperatura ambiente. Depois os blots foram lavados com TBST e as proteínas foram observadas usando um reagente potencializador de quimioluminescência (Amersham Pharmacia Biotech, Aylesbury, UK) por 5 min. As análises densitométricas foram realizadas com ajuda do sistema ImageQuant RT-ECL (GE, Piscataway, NJ).

4.7 Experimento 2

4.7.1 Análise dos níveis de BDNF e de proteínas relacionadas com a via de produção no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas que sofreram intervenção neonatal e no controle.

Objetivo: verificar os níveis de BDNF, proBDNF no bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas.

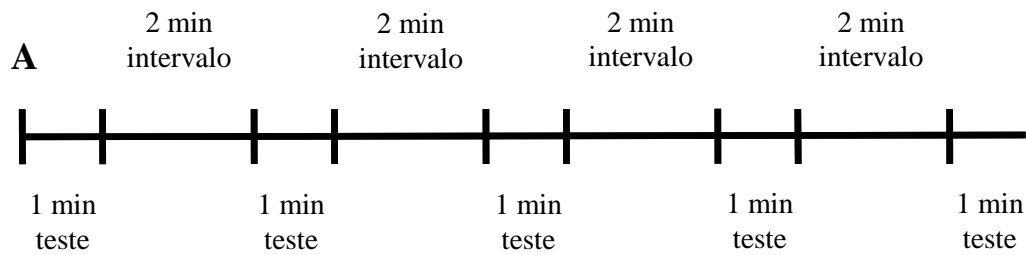
Western Blot: Mesmo protocolo descrito no tópico anterior com as seguintes amostras (NM, n=6♂/6♀ e M1 n=6♂/6♀).

4.7.2 Teste de Preferência pelo odor maternal em filhotes manipulados no período neonatal. Os animais foram testados apenas no 7º dia de vida.

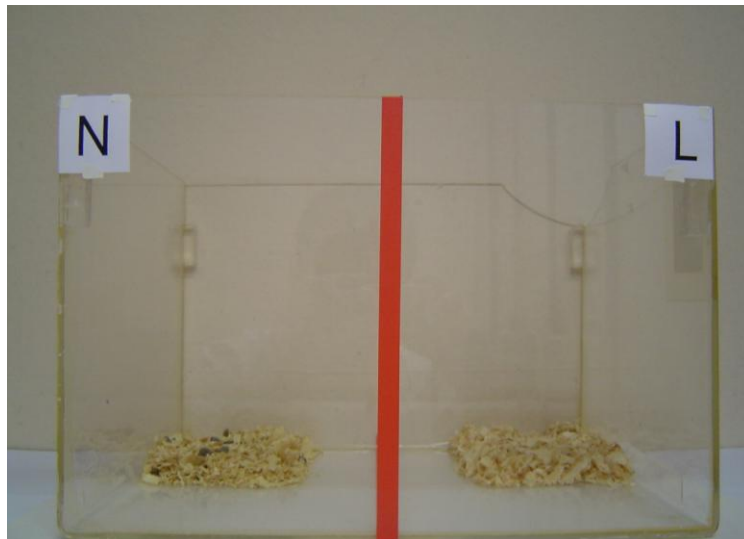
Objetivo: O teste de preferência pelo odor maternal permite ao filhote testado escolher entre duas áreas com maravalhas com odores diferentes. No teste, a escolha foi entre: maravalha limpa (odor neutro) e maravalha proveniente do ninho da sua caixa moradia (odor familiar). Esse experimento teve como objetivo avaliar se os filhotes testados apresentam preferência pelo odor da mãe que está impregnado na maravalha do ninho da caixa moradia.

Teste de Preferência pelo Odor Maternal: O teste de preferência pelo odor maternal foi realizado em uma caixa de acrílico de 34 cm de largura x 40 cm de comprimento x 24 cm de altura (Esquema 3B). Essa caixa foi dividida em duas áreas de 19 cm por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, 300 mL de maravalha limpa ou maravalha do ninho da caixa residência foi colocado no canto de cada área e o filhote foi colocado na linha que determina a zona neutra, encostado na parede oposta com a região da cabeça voltada para as áreas com maravalha, conforme mostra o Esquema 3C. O comportamento de cada filhote foi filmado por 1 minuto, ao fim dessa filmagem a caixa foi limpa com álcool 70% e as maravalhas foram trocadas de lado, ou seja, onde estava a maravalha limpa foi colocado a maravalha do ninho da caixa residência e onde estava a maravalha do ninho da caixa residência foi colocado maravalha limpa. Após, o mesmo filhote foi testado novamente. Esse procedimento de troca das maravalhas e novo teste ocorreram cinco vezes com um intervalo de 2 minutos entre os testes, conforme mostra o

Esquema 3A. Os vídeos foram analisados com o auxílio do programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou o tempo total que o filhote permaneceu sobre cada área. Os resultados foram expressos pela soma dos tempos sobre as áreas nos 5 testes para cada filhote.



B



C



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

4.7.3 Teste de Preferência Sexual (Animais Adultos)

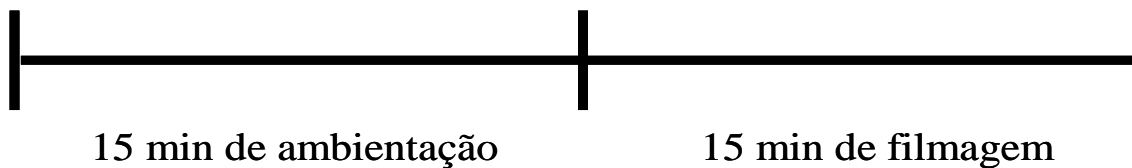
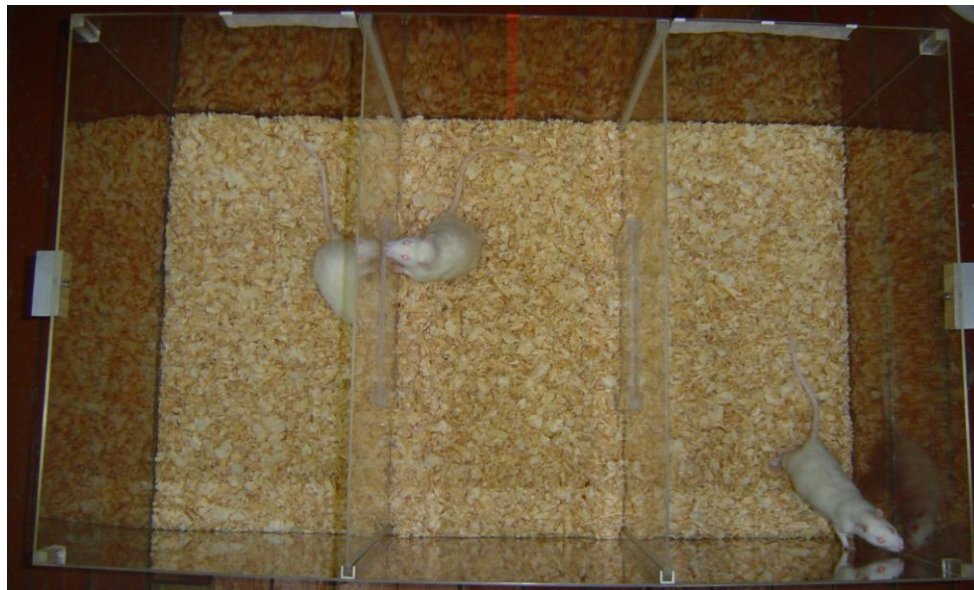
Objetivo: O teste de preferência sexual permite ao animal adulto testado escolher entre duas áreas com animais com odores diferentes (castrado ou ativo). Esse experimento teve como objetivo avaliar se os animais testados conseguem identificar o animal ativo e apresentam preferência pelo odor desse animal permanecendo mais tempo cheirando seu lado na caixa teste (Esquema 4B).

Preferência sexual de machos: Machos adultos (90 dias de idade) foram utilizados para o teste de preferência sexual, nesse teste, o rato pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo uma fêmea receptiva (castrada repostada com estradiol e progesterona) e outra contendo uma fêmea não-receptiva (castrada).

Preferência sexual em fêmeas: Para esse teste foram utilizados ratos adultos de ambos os grupos, controle (não-manipulado), manipulação única no dia 1. Quando adultas (80 dias de idade) as fêmeas tiveram o ciclo estral verificado, apenas ratas com 3 ciclos estrais regulares consecutivos foram utilizadas para o teste de preferência sexual. As ratas foram testadas no proestro, quando a rata está sexualmente receptiva. Nesse teste de preferência sexual a rata testada pôde escolher entre duas áreas com animais-estímulos, uma contendo um macho sexualmente ativo e outra contendo um macho castrado.

Teste de Preferência Sexual: O teste de preferência sexual foi realizado em uma caixa de acrílico de 90 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm altura (Esquema 4B). Essa caixa é dividida em três compartimentos iguais de 30 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm altura. Cada compartimento lateral tem uma porta que se comunica com o compartimento central. Essa porta permite o contato visual e olfatório, no entanto, não permite contato físico entre o animal testado, que está no compartimento central, e os

animais-estímulos, que estão nos compartimentos laterais. O rato a ser testado foi colocado no compartimento central, 15 minutos antes do início do teste para ambientação. No final desse período de ambientação os animais-estímulos foram colocados cada um em um dos compartimentos laterais e o comportamento do rato foi filmado por 15 minutos, conforme Esquema 4A. Todos os testes foram realizados no início do período escuro do ciclo claro-escuro, sob a iluminação de uma lâmpada vermelha. Os vídeos foram analisados com o auxílio do programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou o tempo total cheirando as áreas.

A**B**

Esquema 4. A figura **A** mostra o esquema utilizado para o teste de preferência sexual, onde o rato a ser testado se ambienta por 15 minutos e a seguir os animais-estímulos são colocados e se inicia a filmagem dos comportamentos por 15 minutos. A figura **B** mostra a caixa utilizada para o teste de preferência sexual.

4.8 Outros Procedimentos Associados

Ciclo Estral

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

Castração das Fêmeas

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

Reposição Hormonal de Fêmeas

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

Castração dos Machos

Ratos adultos foram anestesiadas com injeção i.p. de xilasina e cloridrato de ketamina, ambas na dose de 100 mL/Kg de peso corporal. A orquiectomia foi feita por

meio de incisões transversais únicas nos sacos escrotais de cerca de 2 cm, estando o animal em decúbito dorsal. Os ramos vasculares foram rigorosamente atados e, após, os testículos foram removidos. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas coletivas e só foram utilizados no mínimo 12 dias depois.

4.9 *Análise Estatística*

Para o análise das médias (\pm E.P.M.) dos resultados do western blot foi usado uma ANOVA de uma via e pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett ou teste *t de Student* quando necessário. Para as análises comportamentais foi utilizado uma ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1.1 Níveis de CREB nos machos 30 minutos após a manipulação do dia 7

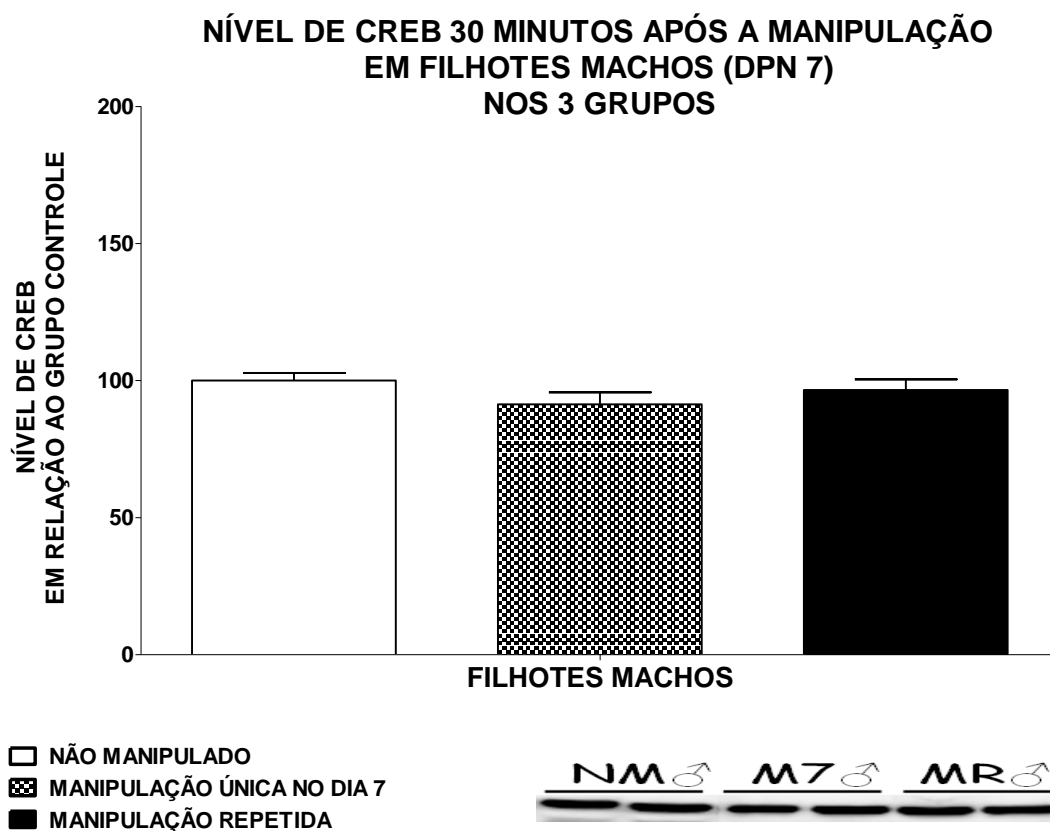


Gráfico 1. MÉDIA±E.P.M. do nível de CREB em filhotes machos 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. n=6-6-6.

Não houve diferenças nos níveis de CREB total 30 minutos após a manipulação entre os grupos manipulação única no dia 7 e a manipulação repetida comparados com o grupo controle não manipulado em filhotes machos ($F_{(2,15)} = 1.367$, $P = 0,2849$) (Gráfico 1).

5.1.2 Níveis de pCREB nos machos 30 minutos após a manipulação do dia 7

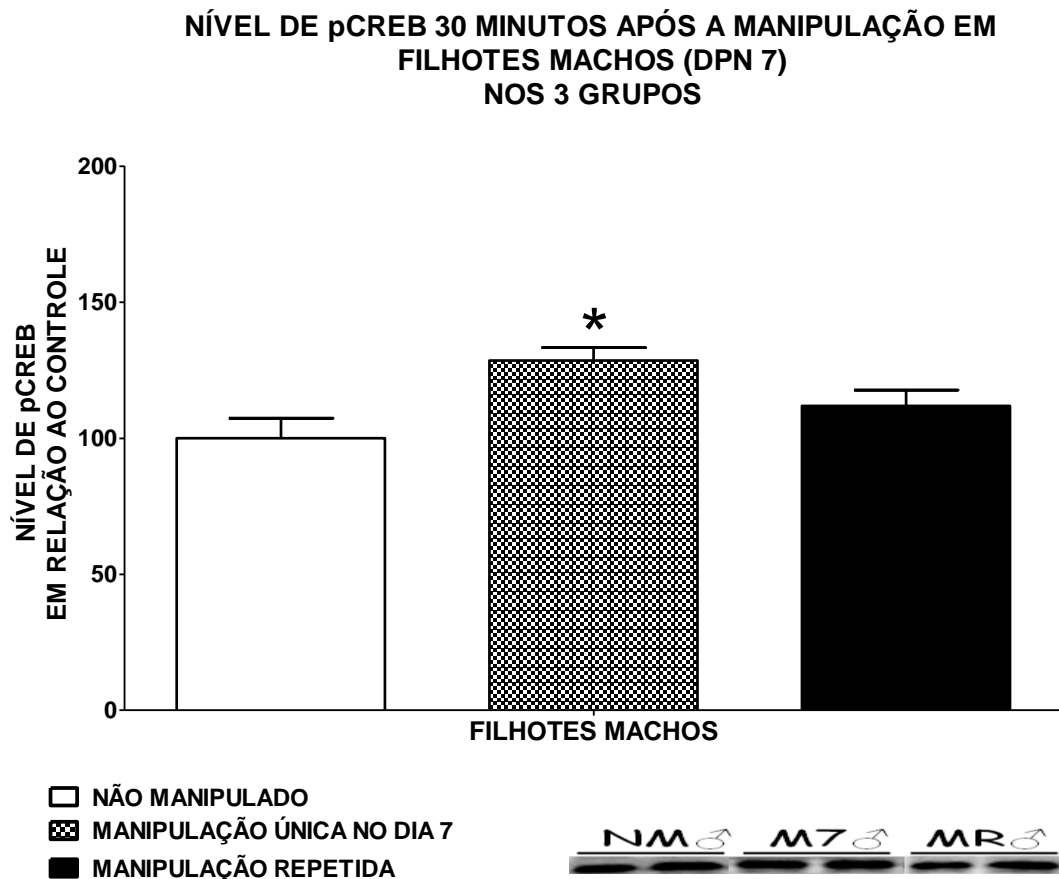


Gráfico 2. MÉDIA±E.P.M. do nível de pCREB em filhotes machos 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $P < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). $n=6-5-5$.

Foi observado um aumento nos níveis de pCREB apenas no grupo manipulado no dia 7 comparado com o grupo controle não manipulado ($F_{(2,13)}=5.242$, $P < 0,05$) (Gráfico 2). Não houve diferença no grupo manipulação repetida embora o gráfico mostre uma tendência ao aumento.

5.1.3 Níveis de BDNF nos machos 30 e 120 minutos após a manipulação do dia 7

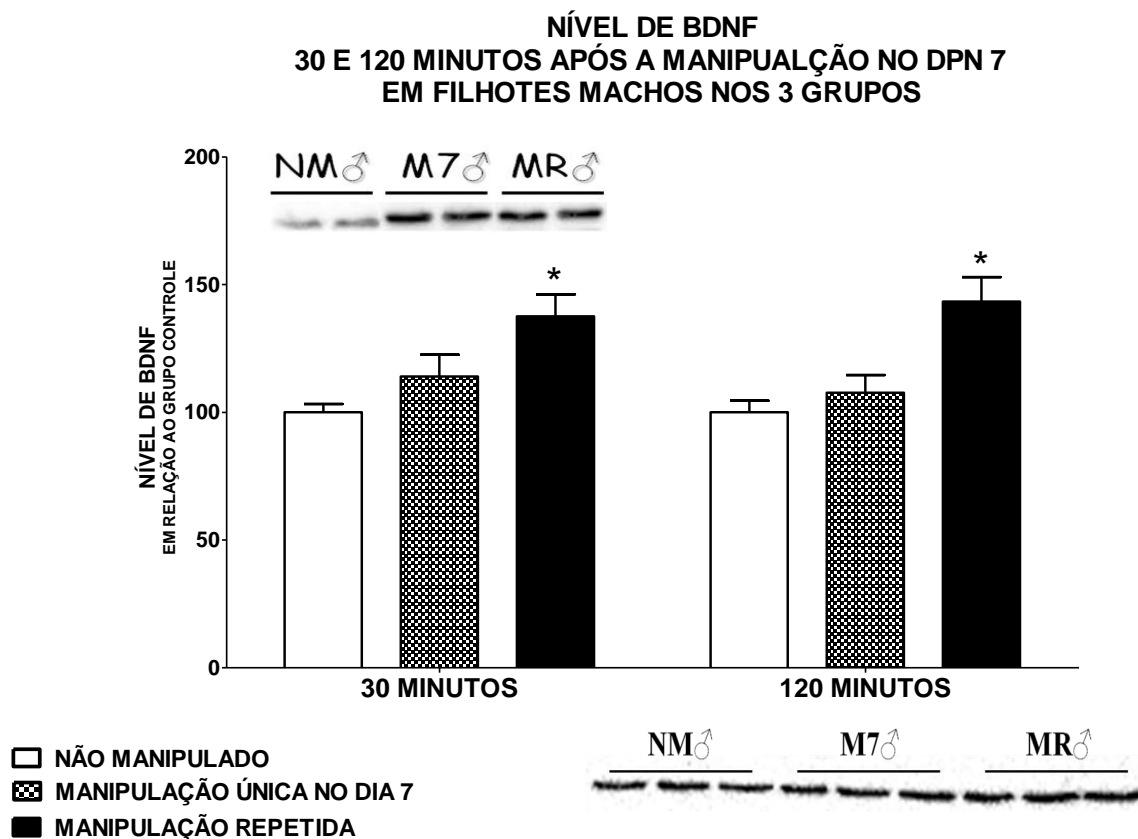


Gráfico 3. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes machos 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. *P<0,01 diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). n=6-6-6 aos 30 minutos e n=6-6-5 aos 120 minutos.

Foi observado que os níveis de BDNF estavam aumentados nos machos do grupo manipulação repetida 30 minutos ($F_{(2,15)}=6.885$, $P<0,01$) e aos 120 minutos ($F_{(2,14)}=10.22$, $P<0,01$) após a manipulação (Gráfico 3).

5.1.4 Níveis de pro-BDNF nos machos 30 e 120 minutos após a manipulação do dia 7

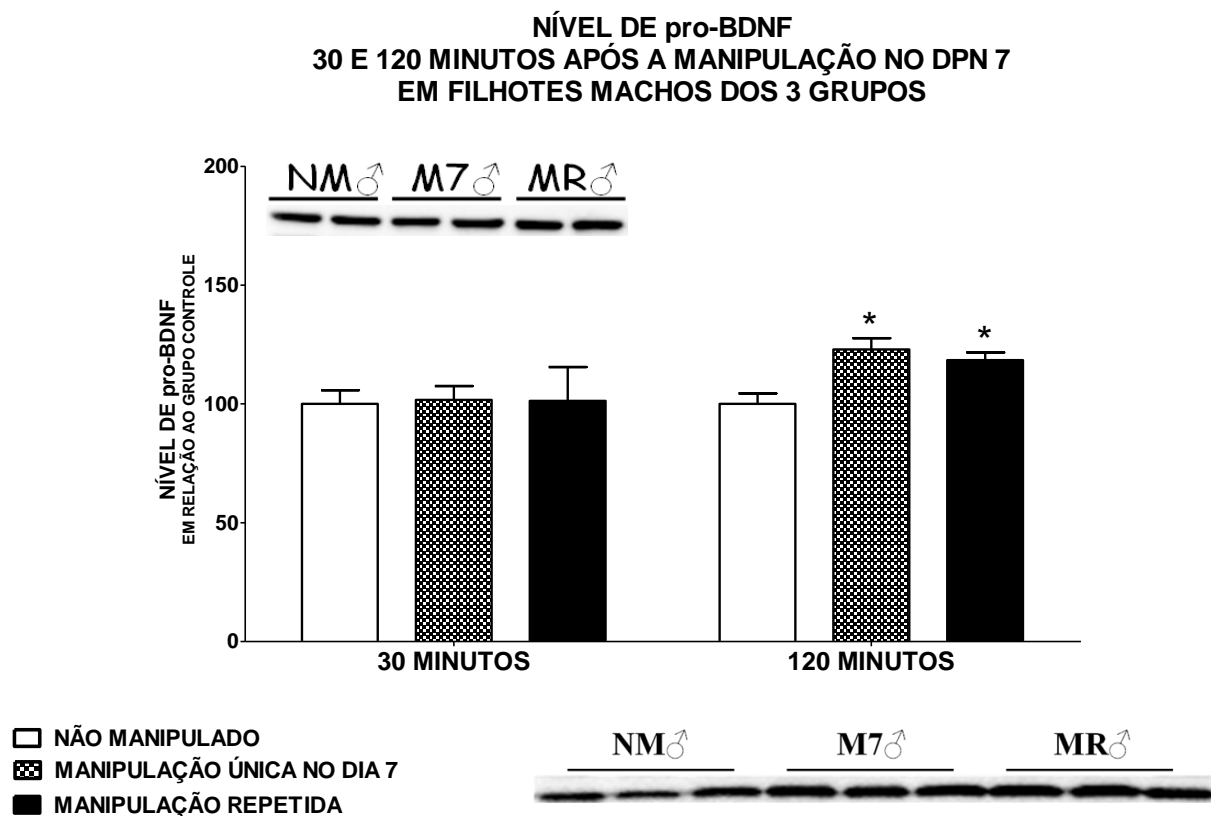


Gráfico 4. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes machos 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. *P<0,05 diferença significativa comparado com o grupo controle (não manipulado). n=6-6-6 aos 30 minutos e n=6-6-5 aos 120 minutos.

Os níveis de pro-BDNF nos machos não apresentaram diferenças 30 minutos após a manipulação em relação ao grupo controle não manipulado ($F_{(2,15)}=0,0083$, $P=0,9917$). No entanto, aos 120 minutos após a manipulação ambos os grupos M7 ($F_{(2,14)}=8,355$, $P<0,01$) e RH ($p<0,05$) apresentaram um aumento significativo comparados com o grupo não manipulado (Gráfico 4).

5.1.5 Níveis de CREB nas fêmeas 30 minutos após a manipulação do dia 7

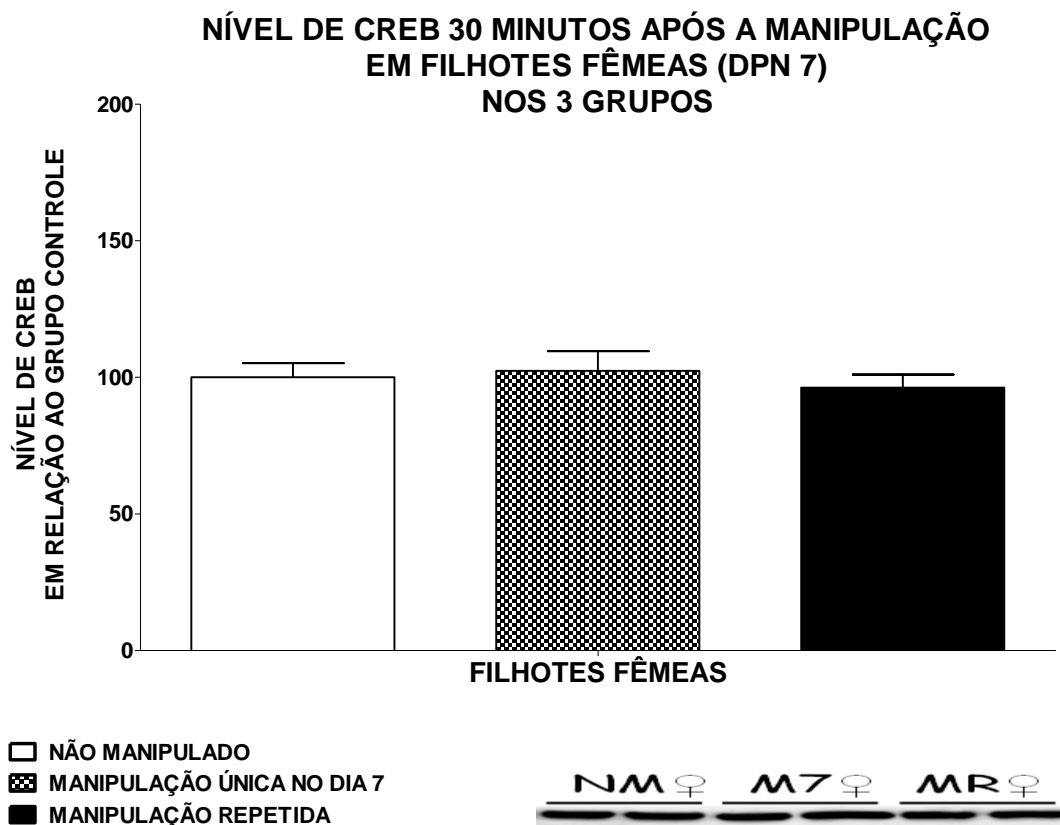


Gráfico 5. MEDIA±E.P.M. do nível de CREB em filhotes fêmeas 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. n=6-6-6.

Não houve diferenças nos níveis de CREB total 30 minutos após a manipulação entre os grupos manipulação única no dia 7 e a manipulação repetida comparados com o grupo controle (não manipulado) em filhotes fêmeas ($F_{(2,15)} = 0,2780$, $P = 0,7611$) (Gráfico 5).

5.1.6 Níveis de pCREB nas fêmeas 30 minutos após a manipulação do dia 7

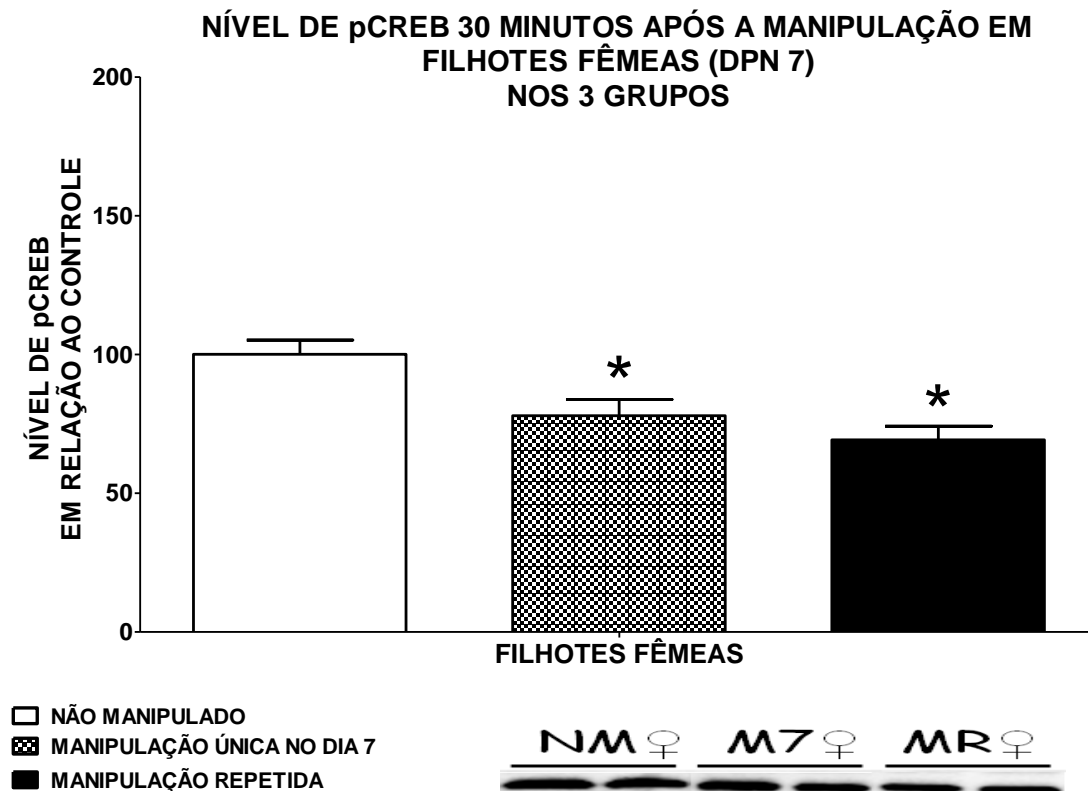


Gráfico 6. MÉDIA±E.P.M. do nível de pCREB em filhotes fêmeas 30 minutos depois da manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $P < 0,05$, diferença significativa em relação ao grupo controle (não manipulado). $n=6-5-6$.

Em contraste com o aumento dos níveis de pCREB encontrados nos filhotes machos, as fêmeas apresentaram uma diminuição dos níveis de pCREB aos 30 minutos após a manipulação, tanto no grupo manipulado somente no dia 7 ($F_{(2,14)}=9.360$, $P < 0,05$) como no grupo manipulado repetidamente ($P < 0,01$) em relação ao grupo não manipulado (Gráfico 6).

5.1.7 Níveis de BDNF nas fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação do dia 7

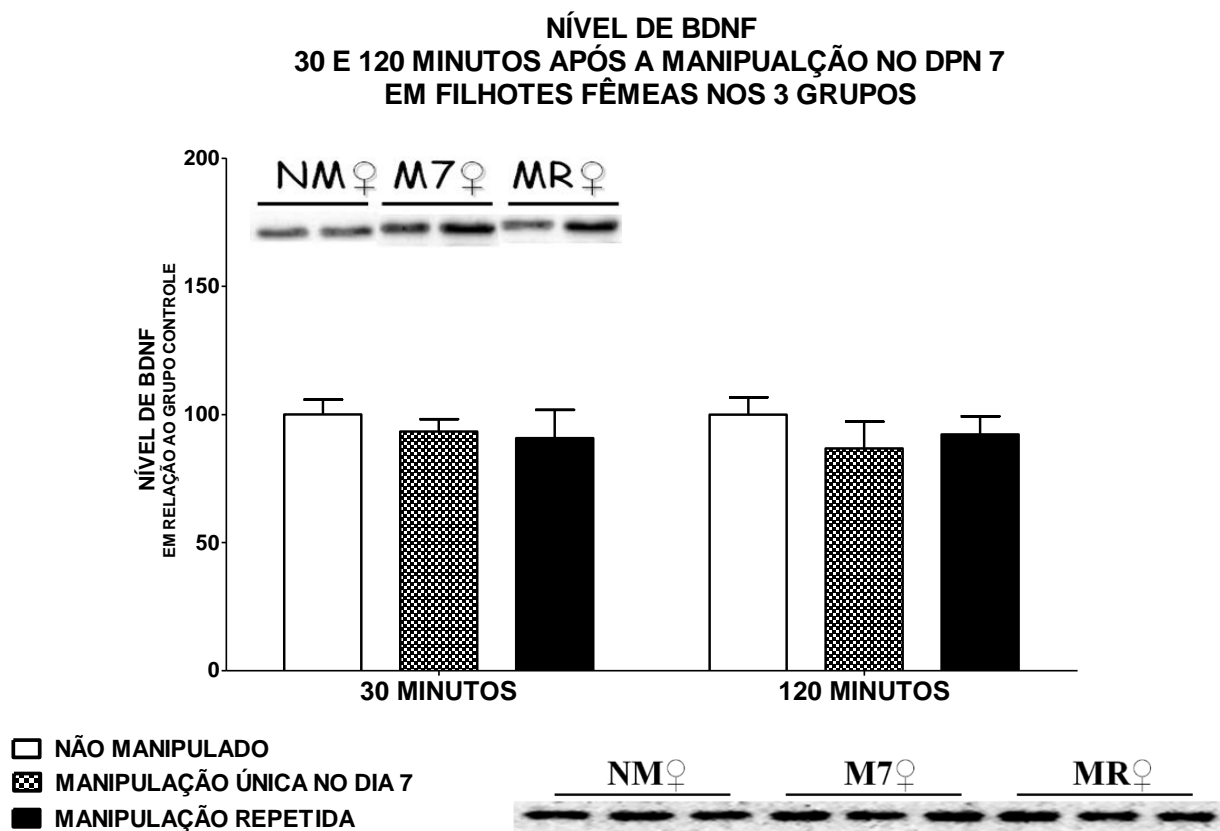


Gráfico 7. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. n=6-6-6 aos 30 minutos e n=6-6-6 aos 120 minutos.

Os níveis de BDNF nas fêmeas apresentaram grande variação dentro do grupo manipulação repetida (MR), no entanto não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nem aos 30 minutos ($F_{(2,15)}=0,3849$, $P=0,6871$) nem aos 120 minutos ($F_{(2,15)}=0,6495$, $P=0,5364$) após a manipulação (Gráfico 7).

5.1.8 Níveis de pro-BDNF nas fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação do dia 7

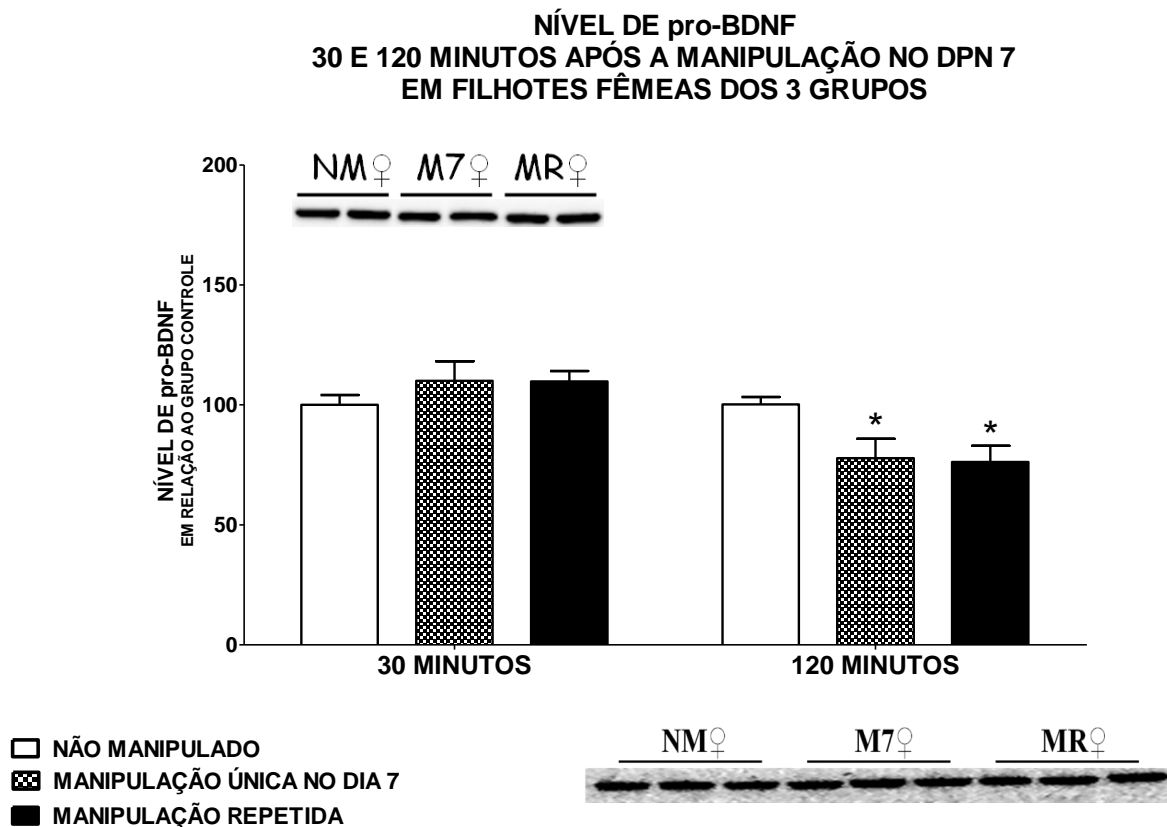


Gráfico 8. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes fêmeas 30 e 120 minutos após a manipulação no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $P < 0,05$ diferença significativa comparado com o grupo controle (não manipulado). $n=6-6-6$ aos 30 minutos e $n=6-6-5$ aos 120 minutos.

As fêmeas não apresentaram diferença nos níveis de pro-BDNF 30 minutos após o estresse no dia 7 ($F_{(2,15)} = 0,9527$, $P = 0,4078$). No entanto, aos 120 minutos após a manipulação os grupos manipulação única no dia 7 ($F_{(2,14)} = 7,010$, $P < 0,05$) e o grupo manipulação repetida ($p < 0,01$) apresentavam uma diminuição dos níveis de pro-BDNF comparados ao grupo controle (Gráfico 8).

5.2 Experimento 2

5.2.1 Nível de BDNF em ambos os sexos no DPN 7

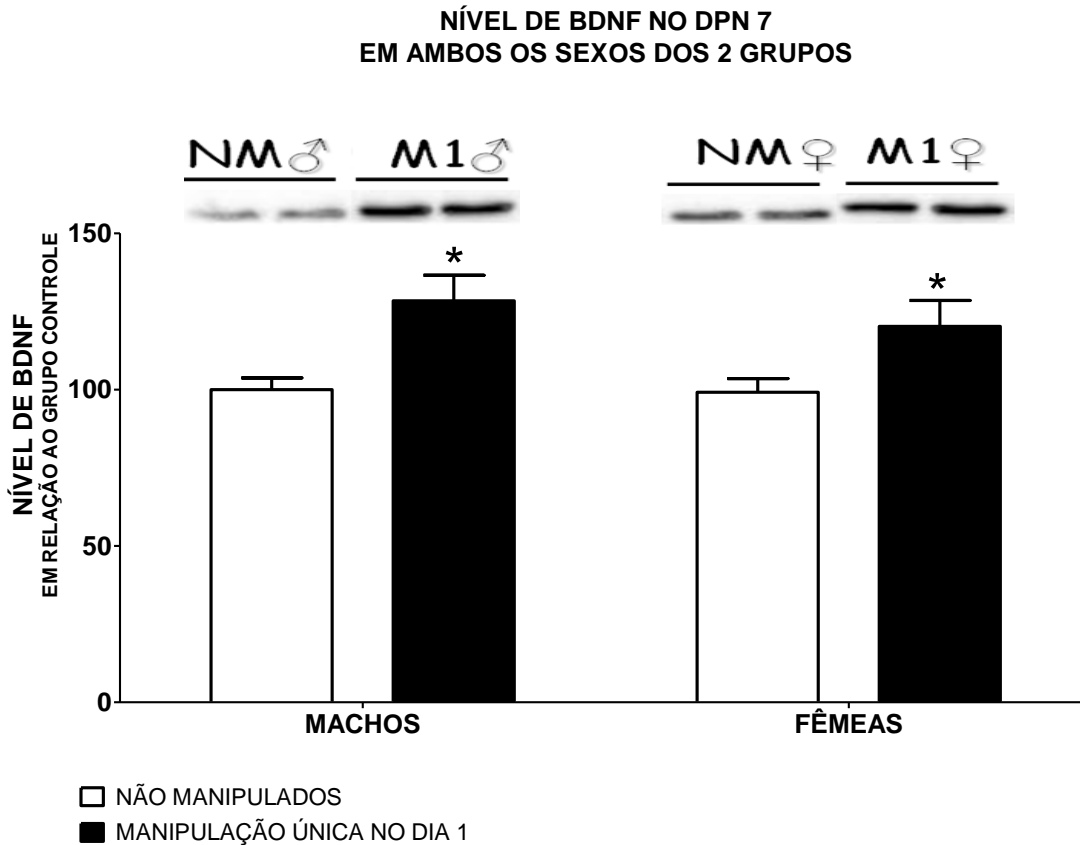


Gráfico 9. MÉDIA±E.P.M. do nível de BDNF em filhotes machos E fêmeas no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando Test *t* de Student. * $P < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle do mesmo sexo (não manipulado). $n=6$ controle e $n=5$ nos manipulados apenas no dia 1 pós-natal em ambos os sexos.

Os níveis de BDNF foram medidos no dia 7 e apresentaram um aumento nos grupos manipulados no primeiro dia de vida pós-parto tanto em machos ($t_9=3.344$, $P < 0,01$) quanto nas fêmeas ($t_9=3.145$, $P < 0,05$) (Gráfico 9).

5.2.2 Nível de pro-BDNF em ambos os sexos no DPN 7

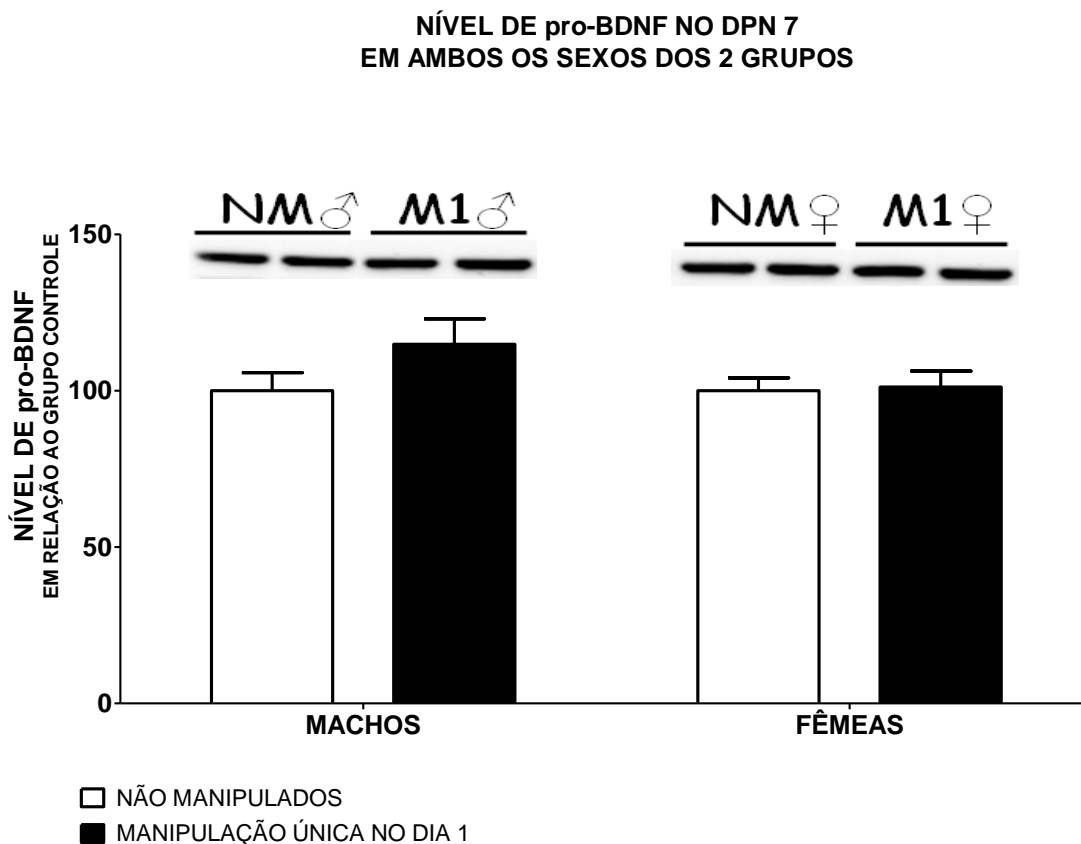


Gráfico 10. MÉDIA±E.P.M. do nível de pro-BDNF em filhotes machos E fêmeas no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando teste *t* de *Student*. $n = 6$ em todos os grupos.

Os níveis de pro-BDNF foram medidos no dia 7 e não apresentaram diferença significativa entre os grupos manipulados no primeiro dia de vida pós-parto tanto nos machos ($t_{10}=1.484$, $P=0,1687$) quanto nas fêmeas ($t_{10}=0.1753$, $P=0,8643$) (Gráfico 9).

5.2.3 Preferência Pelo Odor do Ninho em Ambos os Sexos (DPN 7)

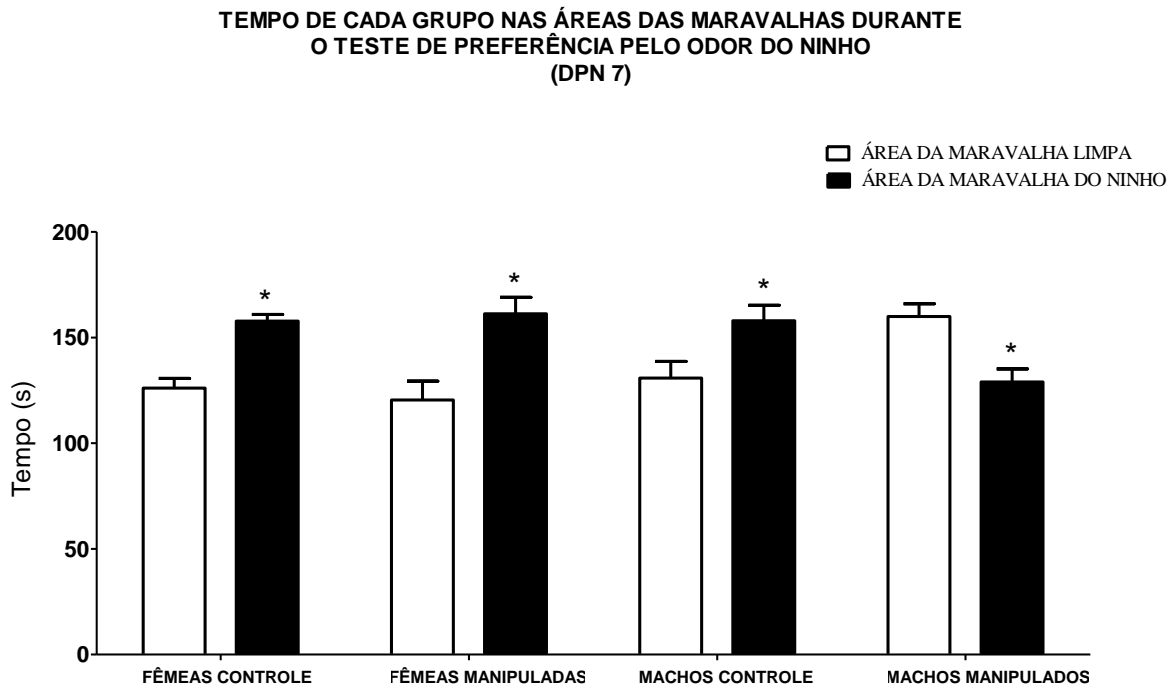


Gráfico 11. MÉDIA±E.P.M. do tempo na área das maravalhas em filhotes de ambos os sexos no DPN 7. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de Duas Vias seguido de Bonferroni posttests. * $P < 0,05$ diferença significativa no tempo de permanência nas áreas da maravalhas. $n = 11$ em todos os grupos.

As fêmeas, tanto controle ($p < 0,01$) quanto manipuladas ($p < 0,001$), apresentam preferência pelo odor do ninho como é demonstrado pelo fato de permanecerem significativamente mais tempo na área da maravalha (Efeito Principal LADO $F_{(1,20)} = 31,02$ $p < 0,0001$; Efeito Principal Tratamento - Manipulação $F_{(1,20)} = 0,03$ $p > 0,05$; Interação Tratamento X LADO $F_{(1,20)} = 0,4929$ $p > 0,05$). O mesmo ocorre com os machos do grupo controle não manipulado ($p < 0,05$), no entanto, os machos manipulados não apresentaram esta diferença permanecendo significativamente menos tempo do lado da maravalha do ninho ($P < 0,01$) (Efeito Principal LADO $F_{(1,20)} = 0,00$ $p > 0,05$; Efeito Principal Tratamento - Manipulação $F_{(1,20)} = 0,1036$ $p > 0,05$; Interação Tratamento X LADO $F_{(1,20)} = 14,24$ $p < 0,01$). Esses dados mostram que os machos que foram manipulados no Dia 1 apresentam um

déficit no reconhecimento do cheiro do ninho como um indício de uma alteração do vínculo mãe/filhote já na nesta idade (Gráfico 11).

5.2.4 Preferência Sexual

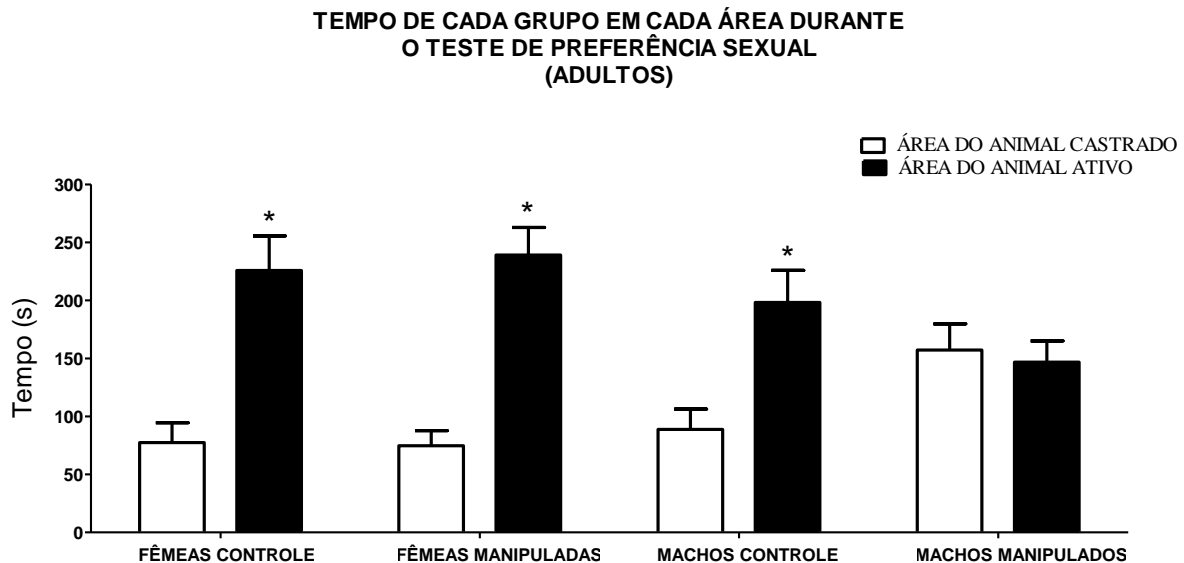


Gráfico 12. MÉDIA±E.P.M. do tempo na área dos animais em adultos de ambos os sexos. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de Duas Vias seguido de Bonferroni posttests. *P<0,01 diferença significativa no tempo de exploração nas áreas dos animais ativo e castrado. n =11 em todos os grupos.

Tanto as fêmeas controle ($P < 0,001$) quanto fêmeas que foram manipuladas no dia 1 ($p < 0,001$), apresentam preferência pelo odor do animal ativo pois permanecerem significativamente mais tempo cheirando o lado deste animal da caixa do que o lado do animal castrado (Efeito Principal LADO $F_{(1,20)} = 31,02$ $p < 0,0001$; Efeito Principal Tratamento- Manipulação $F_{(1,20)} = 0,03$ $p > 0,05$; Interação Tratamento X LADO $F_{(1,20)} = 0,4929$ $p > 0,05$). O mesmo ocorre com os machos do grupo controle não manipulado ($p < 0,01$), no entanto, os machos manipulados não apresentaram esta preferência permanecendo a mesma quantidade de tempo em ambos os lados da caixa ($p > 0,05$) (Efeito Principal LADO $F_{(1,20)} = 6,652$ $p < 0,05$; Efeito Principal Tratamento- Manipulação $F_{(1,20)}$

=0,1216 $p>0,05$; Interação Tratamento X LADO $F_{(1,20)} = 6,113$ $p<0,05$.. Esses dados mostram que os machos que foram manipulados no Dia 1 podem também apresentar alterações comportamentais à longo prazo (Gráfico 12).

6 DISCUSSÃO

6.1 *Mecanismos Moleculares de Atuação da Manipulação Repetida no BO*

No experimento 1 analisamos o efeito da manipulação neonatal única no dia 7 e da manipulação repetida até o dia 7 nos níveis de CREB total, pCREB, pro-BDNF e BDNF após a manipulação.

Como fizemos medidas em tempos diferentes e em pontos diferentes da cascata de produção do BDNF os dados se apresentam mais sólidos e demonstram uma clara diferença no efeito da manipulação neonatal em machos e em fêmeas no período neonatal.

Os machos manipulados repetidamente não apresentam aumento significativo nos níveis de pCREB o que foi um resultado inesperado, no entanto, 120 minutos após a intervenção os níveis de pro-BDNF estavam aumentados. Isso sugere que ocorreu um aumento na fosforilação do CREB, pois, o aumento nos níveis de pro-BDNF seria a etapa seguinte na via caso ocorresse um prévio aumento da fosforilação do CREB.

Além disso, os níveis de BDNF estavam aumentados nos machos manipulados repetidamente aos 30 e aos 120 minutos após o estresse, mas o aumento aos 30 minutos é idêntico ao apresentado aos 120 minutos.

Possivelmente esse resultado representa um efeito duradouro do protocolo de manipulação repetida nos níveis de BDNF e não necessariamente uma alteração desses níveis pela intervenção do dia, pois os níveis de pro-BDNF (pré-cursor do BDNF) estavam aumentados apenas aos 120 minutos. O Aumento de pro-BDNF seria a etapa anterior a produção do BDNF. A alteração dos níveis de BDNF não apresentou aumento dos 30 para

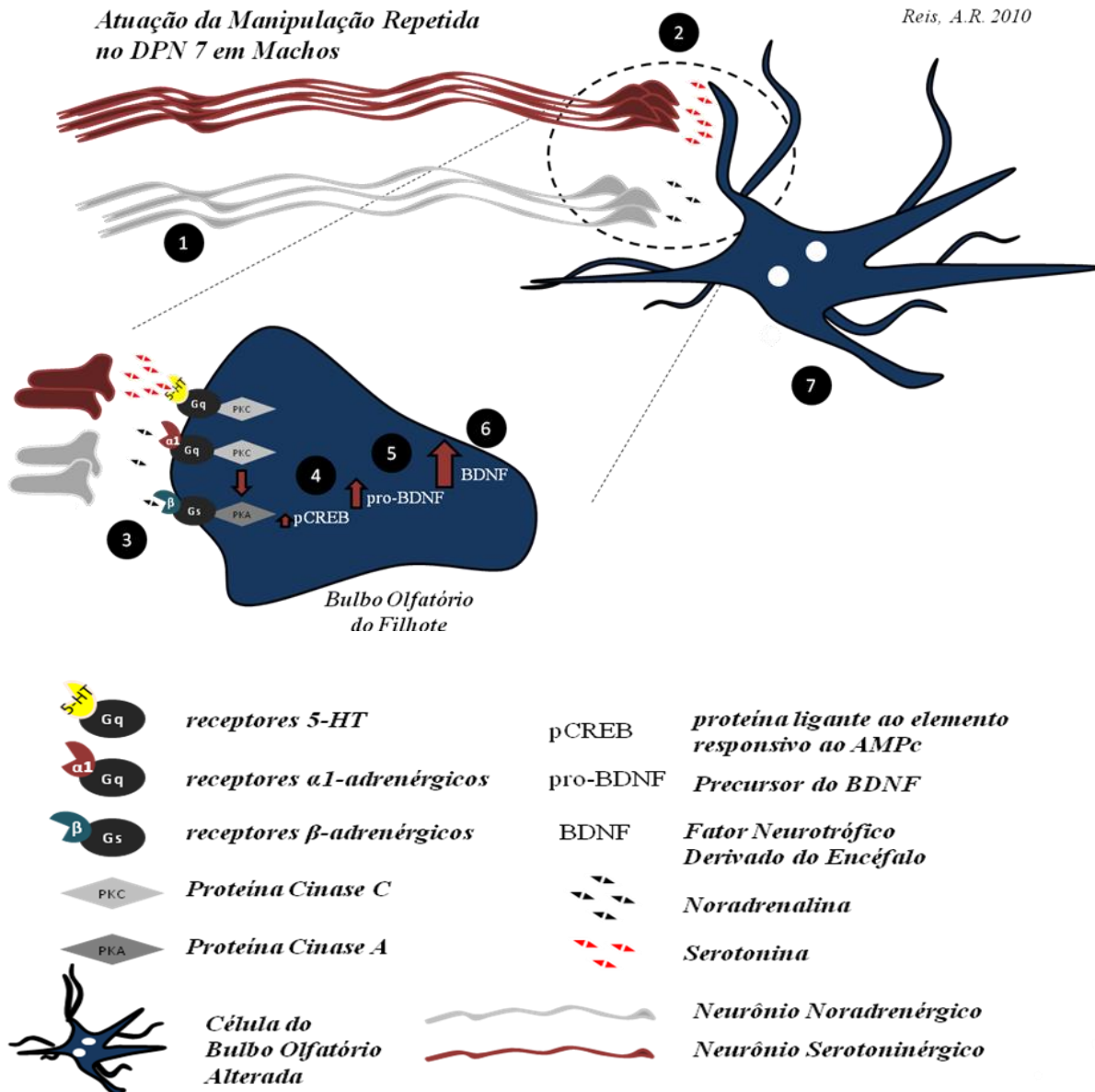
os 120 minutos o que seria esperado caso ocorresse atuação da intervenção no dia 7 nos níveis de BDNF.

De fato estudos demonstram que procedimentos de manipulação neonatal similares ao que fazemos neste trabalho apresentaram mudanças nos níveis de BDNF no hipocampo apenas 4 ou até 8 horas após a intervenção (Garoflos *et al.*, 2005b). Como resultados anteriores de nosso laboratório indicavam alteração na sinalização monoaminérgica 15 minutos após o protocolo de manipulação (Rainecki *et al.*, 2009) decidimos adotar tempos intermediários para não perder modificações que fossem mais breves nesta área, no entanto em trabalhos futuros a dinâmica de produção do BDNF nesta área deverá ser considerada.

Os ratos machos que foram manipulados apenas no dia 7 pós-natal apresentaram aumento nos níveis de pCREB como era esperado, além disso, também apresentam um aumento nos níveis de pro-BDNF 120 minutos após a intervenção. Não houve alteração nos níveis de BDNF.

Este resultado reforça a idéia de que o aumento dos níveis de BDNF encontrados nos machos manipulados repetidamente representa um efeito duradouro do protocolo de manipulação repetida nos níveis de BDNF e não necessariamente da atuação da intervenção no dia, pois, caso houvesse efeito aos 30 minutos ou aos 120 minutos após a intervenção essa alteração seria registrada em ambos os grupos, manipulados repetidamente e manipulados apenas no dia 7.

As alterações bioquímicas descritas nos machos manipulados (Repetidamente ou Apenas no dia 7) provavelmente estão associadas com mudanças induzidas por este tipo de intervenção no sistema monoaminérgico (Rainecki *et al.* 2009; Stamatakis *et al.* 2006; Vicentic *et al.* 2006; Papaioannou *et al.* 2002) e (Esquema 5).



Esquema 5 – Proposto mecanismo para as modificações encontradas no sinal de BDNF nos machos e suas possíveis repercussões para a morfologia das células do bulbo olfatório, promovidas pela manipulação repetida até o DPN 7. Redução na função noradrenérgica (Ponto 1). Aumento da função serotoninérgica (Ponto 2 e 3). Não foi encontrado um aumento nos níveis de pCREB apenas uma tendência (Ponto 4). Aumento dos níveis de pro-BDNF (Ponto 5). Aumento dos níveis de BDNF (Ponto 6). O ponto 7 do esquema 7 representa uma célula do bulbo olfatório com sua morfologia alterada como possível atuação do aumento repetido de BDNF ao longo da primeira semana de vida.

Raineki, *et al.* (2009) mostraram que ratos machos que foram manipulados repetidamente no período neonatal apresentam uma redução na função noradrenérgica no bulbo olfatório, o que não acontece nos machos manipulados somente no dia 7.

Essa redução pode representar uma adaptação da via noradrenérgica em função da intensa atividade do Locus Coeruleus nos primeiros dias de vida provocada pelo aumento do comportamento maternal em resposta a manipulação neonatal.

O Locus Coeruleus de adultos apresenta habituação quando estimulado repetidamente (Vankov, Herve-Minvielle & Sara, 1995), no entanto, o LC dos filhotes não apresenta essa resposta (Kimura & Nakamura, 1985; Nakamura & Sakaguchi, 1990). Portanto, mudanças em resposta a ativação excessiva nesse período poderiam ser muito mais extremas. De fato, Lucion *et al.* (2003) mostraram que existiu uma significativa diminuição do número de células no LC de filhotes que foram manipulados repetidamente.

Além da redução do tônus noradrenérgico no bulbo a manipulação repetida também poderia provocar uma redução da densidade de receptores β -adrenérgicos no bulbo olfatório tanto nos machos como nas fêmeas em função da repetição do estímulo tátil ao longo da primeira semana de vida.

Embora ocorra diminuição da sinalização noradrenérgica nos machos manipulados repetidamente, Rainecki, *et al.* (2009) também mostram que existe um aumento no nível de serotonina tanto nos machos manipulados repetidamente quanto machos manipulados apenas no dia 7 de vida pós-natal.

Isso poderia explicar o fato dos machos manipulados apenas no dia 7 apresentarem modificações nos níveis de pCREB já aos 30 minutos, enquanto os machos manipulados repetidamente apresentam apenas uma tendência ao aumento.

Na manipulação única no sétimo dia a resposta envolveria atuação tanto da NA (que esta aumenta nos machos manipulados no DPN7) quanto da serotonina (ocorre aumentam nos níveis de seu metabolito 5-HIAA) (Rainecki *et al.* 2009).

Nos machos manipulados repetidamente apenas o aumento do tônus serotoninérgico seria responsável pelo aumento nos níveis de AMPc e conseqüentemente no aumento da fosforilação do CREB (Rainecki *et al.* 2009).

Nas fêmeas os resultados foram muitas vezes opostos aos encontrados nos machos. As fêmeas manipuladas repetidamente apresentam diminuição dos níveis de pCREB e também apresentaram diminuição nos níveis de pro-BDNF no bulbo olfatório 120 minutos após a manipulação.

Apesar das diminuições nos níveis de pCREB e pro-BDNF das fêmeas manipuladas repetidamente indicarem uma atuação da manipulação neonatal sobre a sinalização de BDNF, não foram encontradas diferenças nos níveis desse fator após a intervenção.

Isto sugere que embora possam ocorrer mudanças bioquímicas logo após a manipulação na sinalização do BDNF estas parecem não alterar os níveis de BDNF de forma duradoura, como ocorre nos machos.

As fêmeas que foram manipuladas uma única vez apenas no DPN7 apresentam uma diminuição nos níveis de pCREB 30 minutos após a manipulação, como ocorreu nas fêmeas manipuladas repetidamente, sendo esta diminuição mais acentuada no grupo manipulado repetidamente.

O mesmo resultado é encontrado nos níveis de pro-BDNF que apresentaram uma diminuição 120 minutos após o estresse nas fêmeas que foram manipuladas uma única vez apenas no DPN7.

Essa diminuição nos níveis de pCREB nas fêmeas manipuladas repetidamente era esperada uma vez que resultados de nosso laboratório mostraram uma redução da função noradrenérgica no BO de fêmeas que foram manipuladas repetidamente no período neonatal quando comparado aos grupos não-manipulado (Rainecki *et al.* 2009).

A mesma alteração na sinalização noradrenérgica foi encontrada nos machos manipulados repetidamente indicando que a estimulação crônica do sistema noradrenérgico, devido a manipulação realizada durante os 7 primeiros dias pós-natais pode ser capaz de induzir uma exaustão na produção de NA, levando à redução do conteúdo de NA no BO das tanto de machos quanto de fêmeas (Raineiki *et al.* 2009).

As fêmeas que foram manipuladas uma única vez apenas no DPN7 não apresentam aumento nem diminuição da função noradrenérgica o que seria esperado após a manipulação neonatal. Isso indica que talvez os níveis de NA não sejam os únicos responsáveis pelos resultados que encontramos nesse trabalho.

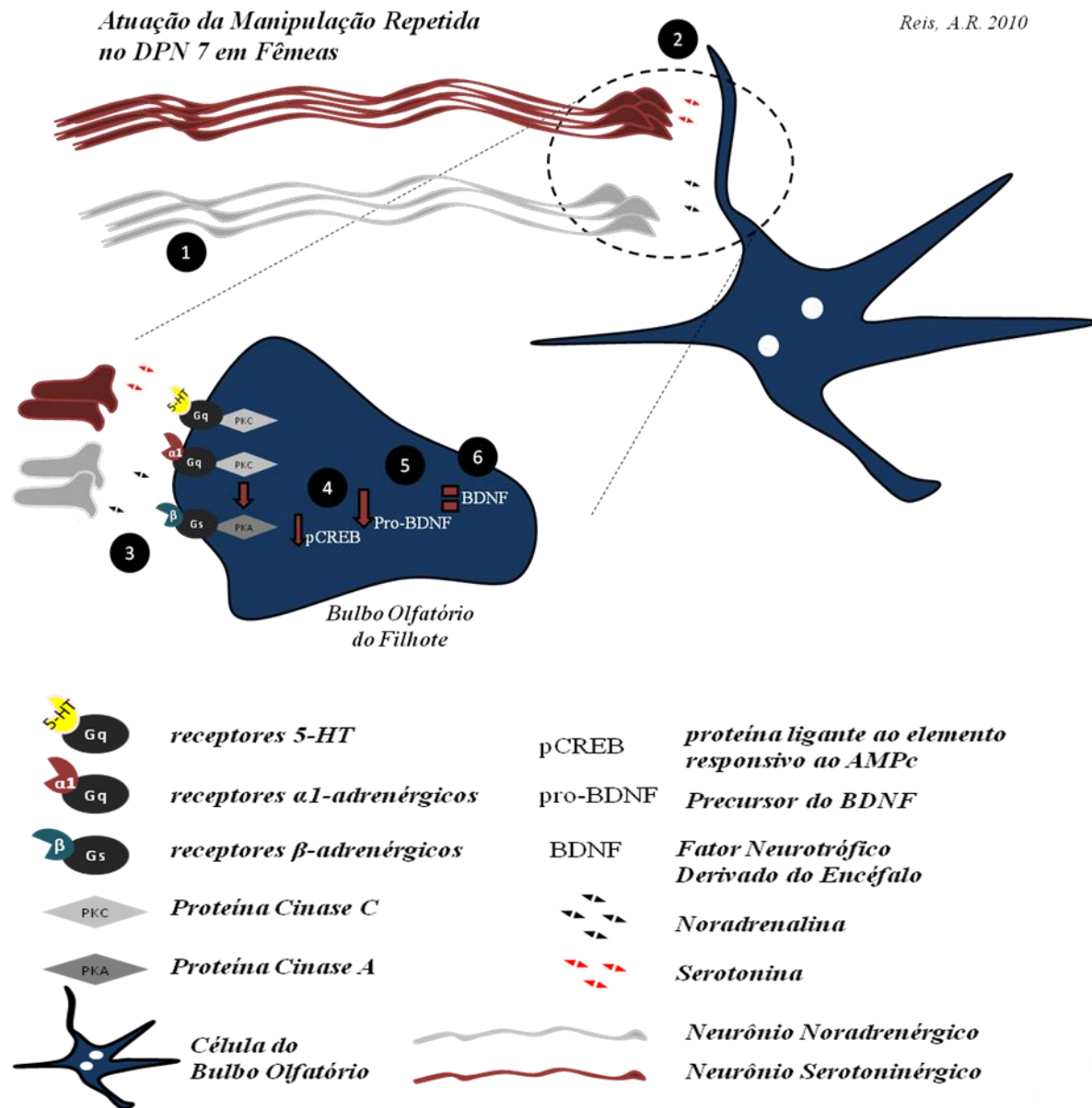
De fato, tanto as ratas que foram manipuladas todos os 7 dias quanto as ratas que foram manipuladas apenas uma única vez no DPN 7 apresentaram uma diminuição do conteúdo de MHPG (metabolito da NA) no BO comparado às ratas não-manipuladas (Raineiki *et al.* 2009).

Assim como nos machos os dados da literatura para os níveis serotonina/5-HIAA após a manipulação (repetida e única) no DPN 7 (Raineiki *et al.* 2009) também ajudam a explicar os resultados encontrados para as fêmeas neste trabalho (Esquema 6).

Ratas que foram manipuladas todos os 7 dias e ratas que foram manipuladas apenas uma vez no DPN 7 apresentaram uma diminuição do conteúdo de serotonina no BO comparado às ratas não-manipuladas (Raineiki *et al.* 2009).

Sabe-se que além da noradrenalina a serotonina também pode atuar aumentando a fosforilação do CREB através da ativação da proteína cinase C (PKC) que apresentam um *cross-talk* com a via da proteína cinase A (PKA) (Langdon *et al.* 1997; Yuan *et al.* 2000, 2003b).

Esses resultados ajudam a entender a diminuição dos níveis de pCREB nas fêmeas deste trabalho, embora não se saiba porque ocorrem essa alteração sexualmente dimórfica no sistema serotoninérgico.



Esquema 6 – Proposto mecanismo para as modificações encontradas no sinal de BDNF nas fêmeas promovidas pela manipulação repetida até o DPN 7. Redução na função noradrenérgica nas fêmeas manipuladas repetidamente (Ponto 1 e 2) Mudanças na estrutura do Locus Coeruleus (Ponto 3). Diminuição dos níveis de pCREB (Ponto 4). Redução dos níveis de pro-BDNF (Ponto 5). Os níveis de BDNF não foram alterados (Ponto 6 do Esquema 5) Como não encontramos diferença nos níveis de BDNF é difícil de identificar se existe atuação duradoura desse protocolo no sinal de BDNF no bulbo olfatório das fêmeas.

Stamatakis *et al.* (2006) mostraram que a manipulação neonatal apresenta alterações sexualmente dimórficas nos níveis do receptor 5-HT1A no hipocampo de animais adultos, sendo que os machos apresentam uma aumento e as fêmeas uma diminuição.

Além disso, Garaflos *et al.* (2005) mostraram que a manipulação neonatal repetida aumenta os níveis de BDNF na área CA4 do hipocampo de machos enquanto as fêmeas não apresentam alteração nos níveis de BDNF similar ao que encontramos neste trabalho no bulbo olfatório. Embora não tenhamos encontrado modificações nos níveis de BDNF das fêmeas manipuladas repetidamente isso não significa que não existam mudanças nos níveis de BDNF no bulbo das fêmeas deste grupo.

Como dito anteriormente utilizamos para as análises bioquímicas um protocolo de Western Blot com a homogeneização total do bulbo olfatório, como o bulbo apresenta diversas camadas com populações diferentes de neurônios, caso a manipulação promova efeitos opostos em camadas diferentes, ou seja, aumento em uma camada e ao mesmo tempo diminuição em outra, isso poderia mascarar alteração nos níveis das proteínas quando registrados por essa técnica.

Consequentemente a utilização de análises morfológicas que permitam a diferenciação das camadas do bulbo seria de grande ajuda para observar com mais especificidade e precisão os efeitos da manipulação neonatal sobre o funcionamento e a estrutura do bulbo olfatório.

6.2 Manipulação Única no DPNI - Efeitos Bioquímicos e Comportamentais

No experimento 2 analisamos o efeito da manipulação neonatal única no dia 1 sobre os níveis de pro-BDNF e BDNF de ratos machos e fêmeas no dia 7 de vida pós-natal. Além disso, analisamos o comportamento de preferência pelo odor do ninho nos filhotes de 7 dias e a preferência sexual nos adultos machos e fêmeas que foram manipulados uma única vez no DPN 1.

A manipulação única no dia 1 aumenta o nível de BDNF de machos e fêmeas, este resultado é bastante intrigante uma vez que a manipulação única no dia 7 não apresenta efeito sobre essa proteína. De fato em função da diminuição dos níveis de pro-BDNF encontrado nas fêmeas aos 120 minutos após o estresse acredita-se que possa ocorrer uma redução nos níveis de BDNF, o que seria o oposto do efeito encontrado com o mesmo protocolo de manipulação aguda sendo apenas aplicado em dias diferentes (no dia 1 e no dia 7 pós-natal).

Tanto machos quanto fêmeas manipulados no DPN 1 apresentaram aumento nos níveis de BDNF, esse resultado é surpreendente considerando que a manipulação no dia 1 aumenta a estimulação tátil realizada pela mãe nos filhotes nesse dia (Garoflos *et al.* 2008), isso induz à liberação de NA do LC no BO, aumentando os níveis de AMPc, levando a fosforilação do CREB e aumento na produção do BDNF.

No entanto o que torna esse resultado mais interessante é que as análises foram feitas no DPN 7, ou seja 6 dias após a intervenção, mostrando uma atuação duradoura da manipulação única no dia 1 nos níveis de BDNF de filhotes machos e fêmeas.

Apenas os machos manipulados no DPN 1 apresentaram alterações nos testes comportamentais.

Os machos apresentaram uma redução na preferência pelo odor da mãe quando testados no DPN 7. Além disso, não distinguem entre uma fêmea ativa ou castrada no teste de preferência sexual quando adultos.

Com relação à preferência pelo odor da mãe sabe-se que para que ocorra o aprendizado olfatório no filhote, possibilitando a ele identificar o odor da sua mãe, é necessário o pareamento de dois estímulos: o tátil (cuidado maternal) e o olfatório (odor da mãe) (Sullivan 2003).

Assim, uma variação no padrão de estimulação tátil, recebido pelo filhote, poderia ser prejudicial para a formação da memória do odor maternal.

Além disso, estudos mostraram que, em ratos, as mães, naturalmente, interagem diferentemente com seus filhotes machos e fêmeas, sendo que as mães permanecem mais tempo cuidando dos machos do que das fêmeas (Oomen *et al.* 2009; Moore *et al.* 1996; Moore & Morelli 1979).

Esse padrão de interação diferente entre mãe e machos e entre mãe e fêmeas se deve à maior concentração de testosterona que os machos apresentam, pois quando fêmeas recebem uma injeção de testosterona, no primeiro dia pós-natal, as mães aumentam o cuidado maternal para com aquelas fêmeas (Moore 1982).

Os machos poderiam ser mais vulneráveis que as fêmeas a manipulações agudas pelo fato de receberem mais cuidados. Sendo assim, é mais fácil que filhotes machos sofram os efeitos de alterações no comportamento da mãe.

Um evento importante que pode estar associado com as modificações encontradas nos machos adultos com relação à preferência sexual esta na atuação da testosterona no encéfalo dos filhotes machos nos primeiros dias de vida.

No dia do parto os machos apresentam um pico de testosterona que vai atuar masculinizando o encéfalo do macho (Ward *et al.* 2002).

Em função da proximidade do procedimento de manipulação neste experimento com esse pico de testosterona nos machos, poderiam ocorrer alterações na atuação da testosterona e comprometer a masculinização do cérebro dos machos influenciando em seu comportamento e conseqüentemente sua reprodução na vida adulta.

Sabe-se que um dado genótipo pode expressar diferentes fenótipos dependendo das condições ambientais em que o indivíduo se encontra (Bateson *et al.* 2004, Weaver *et al.* 2004).

Sendo assim, para muitas espécies animais, inclusive o homem, o ambiente em que o filhote permanece logo após o nascimento influencia o padrão comportamental desse indivíduo quando adulto, sendo a qualidade da relação mãe-filhote muito importante para o estabelecimento das respostas defensivas e das estratégias reprodutivas do filhote quando adulto (Cameron *et al.* 2005, Kaufman *et al.* 2000). Para Bateson *et al.* (2004) mesmo que as condições para o desenvolvimento de um indivíduo não sejam as ideais, ele necessita de estratégias para sobreviver. No entanto, o custo dessa sobrevivência pode ser o seu sucesso reprodutivo no futuro.

A diminuição da preferência pelo odor da mãe, bem como a alteração da preferência sexual nos machos manipulados uma vez no DPN 1 parecem não ter tanta relação com as alterações nos níveis de BDNF encontrados no bulbo olfatório, isso porque tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram essas modificações.

Uma possibilidade é que o efeito da manipulação no DPN1 nos machos seja muito maior logo após o estresse, modificando a relação da mãe com o filhote e comprometendo a preferência olfatória no filhote, mas as modificações bioquímicas poderiam ir se adaptando

nos dias após a manipulação até se igualarem com o efeito encontrado nas fêmeas embora tenham sido inicialmente mais intensas para os machos

Como não fizemos pedidas temporais e ao longo dos dias não é possível saber a dinâmica das modificações na produção do BDNF e pro-BDNF.

Outra explicação poderia estar em modificações em outras áreas do SNC como núcleos do hipotálamo e do complexo amigdaliano, sendo mais um problema motivacional do que olfatório propriamente dito.

Trabalhos prévios do nosso laboratório (Padoin *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2006a) mostram que a manipulação neonatal repetida interfere com o processo reprodutivo dos animais, pois tanto machos quanto fêmeas apresentam uma drástica diminuição do comportamento sexual.

A manipulação neonatal repetida é capaz de promover alterações no número de neurônios em diversas áreas do SNC, alterações essas que perduram ao longo da vida do animal (Camozzato 2006, Winkelmann-Duarte 2007, Lucion *et al.* 2003).

Algumas dessas alterações promovidas pela manipulação neonatal ocorreram em áreas do SNC que estão envolvidas com a percepção de odores, em especial com a percepção de feromônios, como a amígdala medial e a área pré-óptica medial (APOM) (Sánchez-Andrade *et al.* 2005, Stockhorst & Pietrowsky 2004).

A amígdala medial transmite entradas dos quimioceptores do BO para a APOM, sendo fundamental nos comportamentos de investigação sexual (Wood 1997). Uma grande lesão na amígdala reduz a tendência normal de interação social em ratos (Baumbach & Sieck 1977), modificações nessas duas áreas poderiam contribuir para o resultado encontrado neste trabalho.

No entanto são escassos os trabalhos realizados com esse tipo de manipulação aguda, portanto não sabemos se a manipulação única no DPN 1 poderia causar modificações estruturais tão diversas como a manipulação repetida embora a alterações dos níveis de BDNF no bulbo sejam um bom indicativo disso.

7 CONCLUSÕES

Os resultados dessa dissertação mostram que manipulação neonatal tanto única como repetida foi capaz de promover alterações bioquímicas no bulbo olfatório de filhotes no DPN 7.

Além disso, as modificações encontradas nos níveis de pCREB e BDNF em resposta a manipulação sugerem que este protocolo promove alterações duradouras nos níveis de BDNF.

Essas mudanças poderiam ser decorrentes de alterações na sinalização monoaminérgica provocada pela alteração do comportamento maternal e poderiam ser responsáveis por alterações estruturais estáveis no bulbo olfatório desses animais, como já relatados para muitas outras áreas do encéfalo.

Assim mostramos que, alterações no ambiente neonatal transmitidas aos filhotes através de modificações do comportamento maternal apresentam uma atuação importante no desenvolvimento do encéfalo. Sendo que essas alterações na estrutura cerebral poderiam ser a causa de diversos distúrbios psiquiátricos encontrados na vida adulta.

A compreensão dos mecanismos pelos quais ocorrem essas modificações é fundamental para a criação de estratégias terapêutica de prevenção e controle desses transtornos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ AUGER A.P.; HEXTER D.P. & McCarty, M.M. Sex difference in the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in neonate rat brain. **Brain Research 890**: 110-117. 2001.
- ❖ BAILEY, A.; LUTHERT, P.; DEAN, A.; HARDING, B.; JANOTA, I.; MONTGOMERY, M.; RUTTER, M. & LANTOS, P. A clinicopathological study of autism. **Brain 121**: 899–905. 1998.
- ❖ BARDE, Y.A. Trophic factors and neuronal survival. **Neuron 2**: 1525-1534. 1989.
- ❖ BATESON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T.; DEB, D.; D'UDINE, B.; FOLEY, R.A.; GLUCKMA, P.; GODFREY, K.; KIRKWOOD, T.; LAHR, M.M.; McNAMARA, J.; METCALFE, N.B.; MONAGHAN, P.; SPENCER, H.G. & SULTAN, S.E. Developmental plasticity and human health. **Nature 430**: 419-421. 2004.
- ❖ BAUMBACH, H.D. & SIECK, M.H. Temporal effects of discrete lesions in the olfactory and limbic systems on open-field behavior and dyadic encounters in male hooded rats. **Physiology & Behavior 18**: 617-637. 1977.
- ❖ BODNOFF, SR.; SURANYI-CADOTTE, BE.; QUIRION, R. & MEANEY, MJ. Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H] flunitrazepam binding in rat brain. **European Journal of Pharmacology 144**: 105-108. 1987.
- ❖ BRENDY, T.W.; GRANT, R.J.; CHAMPAGNE, D.L. & MEANEY, M.J. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. **European Journal of Neuroscience 18**: 2903-2909. 2003.
- ❖ CALDJI, C.; DIORIO, J. & MEANEY, MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological Psychiatry 48 (12)**:1164-74. 2000.
- ❖ CAMERON, N.M.; CHAMPAGNE, F.A.; PARENT, C.; FISH, E.W.; OZAKI-KURODA, K. & MEANEY, M.J. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews 29**: 843-865. 2005.
- ❖ CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; ARDENGHI, P. PARATCHA, G. STEIN, M.V.; IZQUIERDO, I. & MEDINA J.H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research 76**: 36-46. 2000.

- ❖ CAMOZZATO, T.S.C. Alterações morfológicas na área pré-óptica medial, núcleo periventricular anteroventral e amígdala medial pósterodorsal induzidas pela manipulação neonatal. 2006. 114 p. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ❖ CAO, L.; DHILLA, A.; MUKAI, J.; BLAZESKI, R.; LODOVICH, C.; MASON, C.A. & GOGOS, J.A. Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition *in vivo*. **Current Biology** **17(11)**: 911-921. 2007.
- ❖ CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. & MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior** **79**: 359-371, 2003.
- ❖ CHIARAMELLO, S.; DALMASSO, G.; BEZIN, L.; MARCEL, D.; JOURDAN, F.; PERETTO, P.; FASOLO, A. & De MARCHIS, S. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signaling pathways. **European Journal of Neuroscience** **26**: 1780-1790. 2007
- ❖ CUI, Z.-H., IKEDA, K., KAWAKAMI, K., GONDA, T., MASUDA, J. & NABIKI, T. Exaggerated response to cold stress in a congenic strain for the quantitative trait locus for blood pressure. **Journal of Hypertension** **22**: 2103-2109. 2004.
- ❖ DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S. & JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews** **9 (3)**: 269-301. 1998.
- ❖ DENT, G.W.; SMITH, M.A. & LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcript in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology** **141**: 1593-1598. 2000.
- ❖ DHABHAR, F. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. **Neuroimmunomodulation** **16**: 300-317. 2009.
- ❖ DON, J. & STELZER, G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology** **187**: 115-124. 2002.
- ❖ FRANCIS, D.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.
- ❖ FRANCIS, D.D.; YOUNG L.J.; MEANEY, M.J. & INSEL, T.R.; Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of

- oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. **Journal of Neuroendocrinology** **14**: 349-353. 2002.
- ❖ FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews** **80**: 1523-1631. 2000.
 - ❖ GAROFLOS, E.; STAMATAKIS, A.; MANTELAS, A.; PHILIPPIDIS, H. & STYLIANOPOULOU, F. Cellular mechanisms underlying an effect of “early handling” on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. **Brain Research** **1052**: 187–195. 2005b.
 - ❖ GAROFLOS, E.; STAMATAKIS, A.; PONDIKI S.; APOSTOLOU, A.; PHILIPPIDIS, H. & STYLIANOPOULOU, H. Cellular Mechanisms underlying the effect of a single exposure to neonatal handling on neurotrophin-3 in the brain of 1-day-old rats. **Neuroscience** **148**: 349–358. 2007.
 - ❖ GAROFLOS, E.; STAMAKIS, A.; RAFRIGIANNI, A.; PONDIKI, S. & STYLIANOPOULOU, F.. Neonatal handling on the first postnatal day leads to increased maternal behavior and Fos levels in the brain of the newborn rat. **Developmental Psychobiology** **50**: 704-713. 2008.
 - ❖ GASCON, E.; VUTSKITS, L.; JENNY, B.; DURBEC, P. & KISS, J.Z. PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. **Development** **134**: 1181-1190. 2007.
 - ❖ GOMES, C.M.; FRANTZ, P.J.; SANVITTO, G.L.; ANCELMO-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.
 - ❖ GOMES, C.M.; RAINEKI, C.; PAULA, P. R.; SEVERINO, G. S.; HELENA, C. V.; ANSELMOFRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; SANVITTO, G. L. & LUCION, A. B. Neonatal handling and reproductive function in female rats. **Journal of Endocrinology** **184**: 435-445. 2005.
 - ❖ HADOKE, P.W.F.; IQBAL, J. & WALKER, B.R. Therapeutic manipulation of glucocorticoid metabolism in cardiovascular disease. **British Journal of Pharmacology** **156**: 689–712. 2009.
 - ❖ HADOKE P.W.; MacDONALD L.; LOGIE, J.J.; SMALL, G.R.; DOVER, A.R. & WALKER, B.R. Intra-vascular glucocorticoid metabolism as a modulator of vascular structure and function. **Cell and Molecular Life Science** **63**: 565–578. 2006.
 - ❖ HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; McCANN, J. & McLEAN, J.H. β 1-adrenoceptor or α 1-adrenoceptor activation initiates early preference learning in rat

- pups: support for the mitral cell/cAMP model of odor preference learning. **Learning & Memory** **13**: 8-13. 2006.
- ❖ HEIM, C.; PLOTSKY, P.M. & NEMEROFF, C.B. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. **Neuropsychopharmacology** **29**:641– 648. 2004.
 - ❖ HERMAN, J.P. & CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hipotalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in neurosciences** **20**: 78-84. 1997.
 - ❖ HUANG E.J. & REICHARDT L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annual Review of Biochemistry** **72**: 609–642. 2003.
 - ❖ HUOT, R.; PLOTSKY, P.; LENOX, R. & McNAMARA, R. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research** **950**: 52– 63. 2002.
 - ❖ IMAMURA, F. & GREER, C.A. Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: Regulation by TrkB. **PLoS ONE** (**4**): 1-11. 2009.
 - ❖ JOËLS, M. & BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews/ Neuroscience** (**10**): 459-466. 2009.
 - ❖ KAWAHARA, N., CROLL S.D., WIEGAND, S.J., KLATZO, I. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for is-chemic tolerance, **Neuroscience Research** (**29**). 37–47. 1997.
 - ❖ KAUFMAN, J.; PLOTSKY, P.M.; NEMEROFF, C.B. & CHARNEY, D.S. Effects of early experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biological Psychiatry** **48**: 778-790, 2000.
 - ❖ KIMURA, F. & NAKAMURA, S. Locus coeruleus neurons in the neonatal rat: Electrical activity and responses to sensory stimulation. **Developmental Brain Research** **23**:301–305. 1985.
 - ❖ KNUTH, E. D. & ETGEN, A. M. Long-term behavioral consequences of brief, repeated neonatal isolation. **Brain Research** **1128**: 139-147. 2007.
 - ❖ KOLBER, B.J.; WIECZOREK, L. & MUGLIA, L.J. HPA axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered GR or MR function. **Stress** **11**(5): 321–338. 2008.
 - ❖ KONSTANDI, M.; JOHNASON, E.; LANG, M.; MALAMAS, M. & MARSELOS, M. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on

- brain biogenic amines in mice and rats. **Pharmacological Research** **41**: 341-346. 2000.
- ❖ LAMPRECHT, R. CREB: a message to remember. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**: 554-563. 1999.
 - ❖ LANGDON, P.E.; HARLEY, C.W. & McLEAN, J.H. Increased β adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. **Developmental Brain Research** **102**: 291-293. 1997.
 - ❖ LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science** **237**: 1154-1162. 1987.
 - ❖ LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior** **73**: 255-260. 2001.
 - ❖ 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.
 - ❖ LIPPMANN, M., BRESS, A., NEMEROFF, C. B., PLOTSKY, P. M. & MONTEGGIA, L. M. Long-term behavioral and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **European Journal of Neuroscience** **25**: 3091-3098, 2007.
 - ❖ LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology** **12**: 5-12. 2000a.
 - ❖ LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J.C.; FRANCIS, D.D. & MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience** **3**: 799-806. 2000b.
 - ❖ LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.D.; FREEMAN A.; SHARMA, S.; PEARDON, D.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science** **277**: 1659-1662. 1997.
 - ❖ LUCION, A.B., PADOIN, M.J.; PEREIRA, F.M.; MANDARIN-LACERDA, C.A. & SCHNEIDER, F.L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex of rats submitted to neonatal stimulation. **29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**. Pagina 617. 1999.

- ❖ LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M.; WINKELMANN, E. C.; SANVITTO, G. L. & ANSELMOFRANCI, J. A. Neonatal handling reduces the number of cells in the Locus Coeruleus of rats. **Behavioral Neuroscience** **117** (5): 894-903, 2003.
- ❖ MARNER, L.; SØBORG, C. & PAKKENBERG, B. Increased volume of the pigmented neurons in the locus coeruleus of schizophrenic subjects A stereological study. **Journal of Psychiatric Research** **39**: 337–345. 2005.
- ❖ MATSUNI, S. & YAMAMOTO, N. Brain-derived neurotrophic factor induces rapid morphological changes in dendritic spines of olfactory bulb granule cells in cultured slices through the modulation of glutamatergic signaling. **Neuroscience** **123**: 695-702. 2004.
- ❖ McEWEN, S.B. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **European Journal of Pharmacology** **583**(2-3): 174–185. 2008.
- ❖ McLEAN, J.H.; DARBY-KING, A. & HARLEY, C.W. Potentiation and prolongation of long-term odor memory in neonate rats using a phosphodiesterase inhibitor. **Neuroscience** **135**: 329-334. 2005.
- ❖ McLEAN, J.H. & SHIPLEY, M.T. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. **The Journal of Comparative Neurology** **304**: 467-477. 1991.
- ❖ MEANEY, M.; AITKEN, D.; BERKEL, C.V.; BHATNAGNER, S. & SAPOLSKY, R. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. **Science** **239**:766 –768. 1988.
- ❖ 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 and the hypothalamic CRF system. **Annals of New York Academy of Sciences** **697**: 70-85. 1993.
- ❖ MOORE, C.L. Maternal behavior in rats is affected by hormonal condition of pups. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** **96**: 123-129. 1982.
- ❖ MOORE, C.L. & MORELLI, G.A. Mother rats interact differently with male and female offspring. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** **93**: 677-684. 1979.
- ❖ MOORE, C.L.; JORDAN, L. & WONG L. Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. **Physiology and Behavior** **60** (5):1361-7. 1996.
- ❖ MORICEAU, S. & SULLIVAN, R.M. Unique neural circuit for neonatal olfactory learning. **Journal of Neuroscience** **24**: 1182–1189. 2004a.

- ❖ MORILAK, D.A., FORNAL, JACOBS, B.L. Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats: I. Thermoregulatory challenge. **Brain Research 422**: 17–23. 1987.
- ❖ MORILAK, D.A., FORNAL, JACOBS, B.L. Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats: II. Cardiovascular challenge. **Brain Research 422**: 24–31. 1987.
- ❖ MORILAK, D.A., FORNAL, JACOBS, B.L. Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats: III. Glucoregulatory challenge. **Brain Research 422**: 32–39. 1987.
- ❖ NAKAI, S.; MATSUNAGA, W.; ISHIDA, Y.; ISOBE, K. & SHIROKAWA, T. Effects of BDNF infusion on the axon terminals of locus coeruleus neurons of aging rats. **Neuroscience Research 54 (3)**: 213-219. 2006.
- ❖ NAKAMURA, S.; KIMURA F. & SAKAGUCHI, T. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. **Journal of Neurophysiology, 58**: 510-524, 1987.
- ❖ NAKAMURA, S.T. & SAKAGUCHI, T. Development and plasticity of the locus coeruleus. **A review of recent physiological and pharmacological experimentation. Progress in Neurobiology 34**: 505–526. 1990.
- ❖ OOMEN, C.A.; GIRARDI, C.E.N.; CAHYADI, R.; VERBEEK, E.C.; KRUGERS, H.; JOËLS, M. & LUCASSEN, P.J. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. **PLoS ONE (4)**: 1-13. 2009.
- ❖ PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS, H.T.M. & LUCION, A.B. Long-Lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience 115 (6)**: 1332-1340. 2001.
- ❖ PANAGIOTAROPOULOS, T.; PAPAIOANNOU, A.; PONDIKI, S.; PROKOPIOU, A. STYLIANOPOULOU, F. & GEROZISSIS, K. Effects of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. **Neuroendocrinology 79**: 109-118. 2004.
- ❖ PAPAIOANNOU, A.; DAFNI, U.; ALIKRIDIS, 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)**: 195-206. 2002.
- ❖ PAPAIOANNOU, A.; GEROZISSIS, K. PROKOPIOU, A.; BOLARIS, S. & STYLIANOPOULOU, F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and vulnerability to depressive behavior. **Behavioural Brain Research 129**: 131-139. 2002.

- ❖ PASTRANA, E.; MORENO-FLORES, M.T.; GURZOV, E.N.; AVILA, J.; WANDOSELL, F.; DIAZ-NIDO, J. Genes associated with adult axon regeneration promoted by olfactory ensheathing cells: a new role for matrix metalloproteinase 2. **Journal of Neuroscience** **26**: 5347–5359. 2006 *apud* HUANG E.J., REICHARDT L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annual Review Biochemistry** **72**: 609–642. 2003.
- ❖ PAXINOS, G.; & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Orlando, FL, **Academic Press**. 1998.
- ❖ POEGGEL, G.; HELMEKE, C.; ABRAHAM, A.; SCHWABE, T.; FRIEDRICH, P. & BRAUN, K. Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. **PNAS** **100**: 16137–16142. 2003.
- ❖ PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D. & FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology** **38(4)**: 239-251. 2001.
- ❖ RAINEKI, C.; de SOUZA, M.A.; SZAWKA, R.E.; LUTZ, M.L.; de VASCONCELLOS, L.F.T.; SANVITTO, G.L.; IZQUIERDO, I. BEVILAQUA, L.R.M.; CAMMAROTA, M. & LUCION, A.B. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and CREB pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**. 2009.
- ❖ RANGEL, S. & LEON, M. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. **Developmental Brain Research** **85**: 187-191. 1995.
- ❖ R&D SYSTEMS. Synaptic BDNF: Connecting Physiology to Therapy. **R&D Systems Cytokine Bulletin Newsletter** **2**. 2009. Endereço eletrônico: http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_cb09i2_synaptic_bdnf.aspx
- ❖ RICE, D. & BARONE, Jr., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives** (**108**): 511-533. 2000.
- ❖ SANCHEZ, M.; LADD, C. & PLOTSKY, P. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology evidence from rodent and primate models. **Development & Psychopathology** **13**:419–449. 2001.
- ❖ SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; JAMES, B.M. & KENDRICK, K.M. Neural encoding of olfactory recognition memory. **Journal of Reproduction and Development** **51**: 547-558. 2005.
- ❖ SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews** **11**: 65-76. 1986.

- ❖ SCOBAY, M.J.; BERTERA, S.; SOMERS, J.P.; WATKINS, S.C.; ZELEZNIK, A.J. & WALKER, W.H. Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. **Endocrinology** **142**: 948-954. 2001.
- ❖ SHIPLEY, M.T.; McLEAN, J.H. & ENNIS, M. Olfactory system. In: Paxinos G (Editor), **The rat nervous system**, Academic Press: San Diego, 899-926, 1995.
- ❖ SILVA, A.J.; KOGAN, J.H.; FRANKLAND, P.W. & KIDA, S. CREB and memory. **Annual Reviews in Neuroscience** **21**: 127-148. 1998.
- ❖ STAMAKIS, A.; MANTELAS, A.; PAPAIOANNOU, A.; PONDIKI, S.; FAMELI, M. & STYLIANOPOULOU, F. Effect of neonatal handling on serotonin 1A sub-type receptors in the rat hippocampus. **Neuroscience** (**140**): 1-11. 2006.
- ❖ STOCKHORST, U. & PIETROWSKY, R. Olfactory perception, communication, and to nose-to-brain pathway. **Physiology & Behavior**, **83**: 3-11. 2004.
- ❖ STRUTHERS, R.S.; VALE, W.W.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P.E. & MONTMINY, M.R. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. **Nature** **350**: 622-624. 1991.
- ❖ SULLIVAN, R.M. Developmental changes in olfactory behavior and limbic circuitry. **Chemical Senses** **1**: i152-i153. 2005.
- ❖ SULLIVAN, R.M. Unique Characteristics of Neonatal Classical Conditioning: The Role of the Amygdala and Locus Coeruleus. **Integrative Physiological and Behavioral Science** **36(4)**: 293-307. 2001.
- ❖ SULLIVAN, R.M.; McGAUGH, J.L. & LEON, M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trail olfactory learning in neonatal rats. **Developmental Brain Research**, **60**: 219-228. 1991.
- ❖ SULLIVAN, R.M.; STACKENWALT, G.; NASR, F.; LEMON, C. & WILSON, D.A. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic β -receptor or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonate rats. **Behavioral Neuroscience** **114**: 957-962. 2000.
- ❖ SULLIVAN, R.M. & WILSON, D.A. Molecular biology of early olfactory memory. **Learning & Memory** **10**: 1-4. 2003.
- ❖ SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A.; LEMON, C. & GERHARDT, G.A. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. **Brain Research** **643**: 306-309. 1994.

- ❖ SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A. & LEON, M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. **Journal of Neuroscience** **9**: 3998-4006. 1989.
- ❖ SEVERINO, G.S.; FOSSATI, I.A.; PADOIN, M.J.; GOMES, C.M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G.L.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & LUCION A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology & Behavior** **81** (3): 489-98. 2004.
- ❖ TAKEDA, H.; KITAOKA, Y.; HAYASHU, Y.; KUMAI, T.; MUNEMASA, Y.; FUJINO, H.; KOBAYASHI, S. & UENO, S. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of CREB in NMDA-induced retinal neurotoxicity. **Brain Research**. **1184**: 306-315. 2007.
- ❖ TODESCHIN, A.S.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; JACOB, M.H.V.; ARANDA, B.C.C.; JACOBS, S.; FERNANDES, M.C.; RIVEIRO, M.F.M.; SANVITTO, G.L. & LUCION, A.B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. **Hormones and Behavior** **56**: 93–100. 2009.
- ❖ TRAN, H.; CHEN, H.; WALZ, A.; POSTHUMUS, J.C. & GONG, Q. Influence of olfactory epithelium on Mitral/Tufted cel dendritic outgrowth. **PLoS ONE** (3): 1-8. 2008.
- ❖ ULLAL, G.R.; MICHALSKI B.; Xu, B.; RACINE, R.J.;& FAHNESTOCK, M. NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naïve and kindled rat hippocampus. **Neurochemistry International**, **50**: 866–871. 2007.
- ❖ VANKOV, A.; Herve-Minvielle, A.; & SARA, S.J. Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. **European Journal of Neuroscience** **7**:1180–1187. 1995.
- ❖ van OERS, H.J.; de KLOET, E.R. & LEVINE, S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. **J. Neuroendocrinology** **11**:581–588. 1999.
- ❖ VÁZQUEZ, D. M. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology** **23**: 663-700. 1998.
- ❖ VAZQUEZ, V., PENIT-SORIA, J., DURAND, C., BESSON, MJ., GIROS, B., DAUGE, V. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. **J Neurosci**. **25**: 4453-4462. 2005.

- ❖ VICENTIC, D.; FRANCIS, D.; MOFFETT, M.; LAKATOS, A.; ROGGE, G. HUBERT, G.W.; HARLEY, J. & KUCHAR, M.J. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. **Neuroscience (140):** 355-365. 2006.
- ❖ WALKER, C.-D., DESCHAMPS, S., PROULX, K., TU, M., SALZMAN, C., WOODSIDE, B., LUPIEN, S., GALLO-PAYET, N., RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry & Neuroscience. 29.** 2004.
- ❖ WALKER, C.-D., KUDREIKIS, K., SHERRARD, A., JOHNSTON, C. C. Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. **Develop Brain Research 140:** 253-261. 2003.
- ❖ WARD, O.B.; WARD, I.L.; DENNING, J.H.; FRENCH, J.A. & HENDRICKS, S.E. Postparturitional testosterone surge in male offspring of rats stressed and/or fed ethanol during late pregnancy. **Hormones and behavior 41:** 229-235 (2002).
- ❖ WEAVER, I.C.G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F.A.; D'ALESSIO, A.C.; SHARMA, S.; SECKL, J.R.; DYMOV, S.; SZYF, M. & MEANEY, M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience 7:** 847-854. 2004.
- ❖ WILSON, D.A. & LEON, M. Noradrenergic modulation of olfactory bulb excitability in the postnatal rat. **Developmental Brain Research 42:** 69-75. 1988.
- ❖ WINKELMANN-DUARTE, E.C.; TODESCHIN, A.S.; FERNANDES, M.C.; BITTENCOURT, L.C.; PEREIRA, G.A.M.; SAMIOS, V.N.; SCHUH, A.F.S.; Mandarim-de Lacerda, C.A. & LUCION, A.B. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain Research 1170:** 20-30. 2007.
- ❖ WISTE, A.K.; ARANGO, V.; ELLIS, S.P.; MANN, J.J. & UNDERWOOD, M.D. Norepinephrine and serotonin imbalance in the locus coeruleus in bipolar disorder. **Bipolar Disord. 10:** 349–359. 2008
- ❖ WOO, C.C. & LEON, M. Distribution and development of beta-adrenergic receptors in the rat olfactory bulb. **The Journal of Comparative Neurology 352:** 1-10. 1995a.
- ❖ WOO, C.C. & LEON, M. Early olfactory enrichment and deprivation both decrease β -adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. **The Journal of Comparative Neurology 360:** 634-642. 1995b.
- ❖ WOOD, R.I. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. **Hormones and Behavior 32:** 40-45. 1997.

- ❖ YI, S.-J., BARAM, T. Z. Corticotropin-Releasing Hormone Mediates the Response to Cold Stress in the Neonatal Rat without Compensatory Enhancement of the Peptide's Gene Expression. **Endocrinology**. **135**: 2364-2368. 1994.
- ❖ YUAN, Q.; HARLEY, C.W.; BRUCE, J.C.; DARBY-KING, A. & McLEAN, J.H. Isoproterenol increase CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depletion olfactory bulbs in rat pups only at dose that produce odor preference learning. **Learning & Memory** **7**: 413-421. 2000.
- ❖ YUAN, Q.; HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; NEVE, R.L. & McLEAN, J.H. Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. **Journal of Neuroscience** **23**: 4760-4765. 2003b.