



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

Influência de feromônios da urina de ratos machos no comportamento sexual de ratas *Wistar* adultas manipuladas no período neonatal

Dissertação de Mestrado

Bruno Carlo Cerpa Aranda

Porto Alegre

2011



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

Influência de feromônios da urina de ratos machos no comportamento sexual de ratas *Wistar* adultas manipuladas no período neonatal

Bruno Carlo Cerpa Aranda

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion
Co-orientadora: Dra. Cármen Marilei Gomes

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

Porto Alegre

2011

Agradecimentos

A minha mãe, **Jacqueline Elizabeth Cerpa Diaz**, pelo amor, carinho e por sempre priorizar o estudo dos filhos.

Ao Professor Dr. **Aldo Bolten Lucion** pela orientação e confiança desde a iniciação científica.

À Professora Dra. **Cármem Marilei Gomes**, pela co-orientação.

Ao Professor Dr. **Gilberto Luiz Sanvitto** pelas discussões e pelos conselhos.

À **Luisa Amália Diehl** pelo grande auxílio na realização das dosagens hormonais e à Professora **Carla Dalmaz** por possibilitar as dosagens em seu laboratório.

Às colegas de laboratório com que muito aprendi, em termos de pesquisa e amizade, desde o tempo de iniciação científica, **Márcia Scherem de Azevedo, Ana Lúcia Cecconello, Caroline Perinazzo da Veiga, Silvana Jacobs e Natália Uriarte**.

Aos colegas de laboratório **Adolfo Rodrigues Reis e Cláudio Felipe Kolling da Rocha** pela amizade e pelos churrascos.

As minhas irmãs **Yara e Tâmara** e ao meu irmão **Milton**.

À equipe do laboratório 11, pela amizade, pelas discussões, auxílio em dúvidas e por manterem sempre o laboratório funcionando.

A minha Linda, **Vanise**, que sempre esteve ao meu lado.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS | 3 |
| SUMÁRIO..... | 4 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 5 |
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| RESUMO | 8 |
| INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1. FEROMÔNIOS | 10 |
| 2. PERÍODO NEONATAL | 15 |
| 3. MANIPULAÇÃO NEONATAL | 16 |
| 4. MANIPULAÇÃO NEONATAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA | 19 |
| JUSTIFICATIVA..... | 28 |
| OBJETIVO GERAL | 29 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 29 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 1. ANIMAIS | 30 |
| 2. MANIPULAÇÃO NEONATAL..... | 30 |
| 3. COLETA DE URINA..... | 32 |
| 4. VERIFICAÇÃO DO CICLO ESTRAL..... | 33 |
| 5. EXPOSIÇÃO A URINA DO MACHO OU SOLUÇÃO SALINA..... | 34 |
| 6. REGISTRO DO COMPORTAMENTO SEXUAL..... | 36 |
| 7. COLETA DE SANGUE E DOSAGENS HORMONAIS | 37 |
| 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 37 |
| RESULTADOS..... | 38 |
| 1. COMPORTAMENTO SEXUAL | 38 |
| 2. DOSAGENS HORMONAIS | 42 |
| DISCUSSÃO | 44 |
| CONCLUSÕES | 51 |
| PERSPECTIVAS..... | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54 |

Lista de Abreviaturas

- ✓ ACTH Hormônio Adrenocorticotrófico
- ✓ Ang II Angiotensina II
- ✓ ANOVA Análise de Variância
- ✓ APOM Área Pré-Óptica Medial
- ✓ AVPV Núcleo Periventricular Anteroventral
- ✓ BO Bulbo Olfatório Principal
- ✓ BOA Bulbo Olfatório Acessório
- ✓ CRH Hormônio Liberador de Corticotropina
- ✓ FSH Hormônio Folículo Estimulante
- ✓ HPA Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal
- ✓ HPG Eixo Hipotálamo Hipófise Gonadal
- ✓ LC Locus Coeruleos
- ✓ LH Hormônio Luteinizante
- ✓ MeA Núcleo Medial da Amígdala
- ✓ MePD Amígdala Medial Pósterio-Dorsal
- ✓ OVN Órgão Vomeronasal
- ✓ OVX Ratas Ovariectomizadas
- ✓ PHRE Período Hiporresponsivo ao Estresse
- ✓ PRL Prolactina
- ✓ PVN Núcleo Paraventricular
- ✓ SON Núcleo Supra-Óptico
- ✓ VMH Hipotálamo Ventromedial

Lista de Figuras

- Figura 1: Localização do epitélio olfatório principal e do órgão vomeronasal e projeções para o bulbo olfatório e bulbo olfatório acessório (A). Projeções do bulbo olfatório acessório e a participação no controle da função reprodutiva de fêmeas e convergência com vias do bulbo olfatório principal (B). 11*
- Figura 2: Variações nos níveis plasmáticos de estradiol, progesterona, prolactina, LH e FSH em ratas durante o ciclo estral (Freeman, 2006)..... 22*
- Figura 3: Durante a manipulação neonatal o experimentador retira a mãe da caixa residência e manipula os filhotes durante um minuto e após, recoloca a ninhada e a mãe no ninho (A). Este procedimento é repetido do 1º dia pós-natal até o 10º. No 21º dia, a mãe era retirada e as fêmeas foram separadas até a realização do experimento (B). 31*
- Figura 4: Coleta de urina em gaiola metabólica. O rato previamente selecionado permanecia 24 horas na gaiola metabólica com água e comida à vontade. A urina foi coletada em um recipiente refrigerado e em seguida congelada até a realização do experimento. 33*
- Figura 5: Demonstração da exposição à solução de urina através de um spray manual. A solução salina era aplicada da mesma forma. 34*
- Figura 6: Desenho experimental - as ratas foram borrifadas com um spray manual contendo urina do macho ou solução salina, totalizando sete exposições durante 1 hora, em intervalos de 10 minutos. Após 75 minutos da última exposição realizou-se o registro do comportamento sexual por 15 minutos e imediatamente a seguir a coleta de sangue por punção cardíaca. 35*
- Figura 7: Efeito da estimulação por urina de ratos machos ou solução salina sobre o quociente de lordose de ratas não-manipuladas e manipuladas. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas via seguido de*

| | |
|---|------------------|
| <p><i>Bonferroni (# P < 0.01 comparando Não-manipuladas-Salina com Manipuladas-Salina; * P < 0.05 comparando Manipuladas-Salina com Manipuladas-Urina)......</i></p> | <p><i>38</i></p> |
| <p><i>Figura 8: Frequência de monta dos machos obtida em sessões de observação comportamental junto às fêmeas, que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.</i></p> | <p><i>39</i></p> |
| <p><i>Figura 9: Frequência de lordoses de fêmeas manipuladas e não-manipuladas que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.</i></p> | <p><i>40</i></p> |
| <p><i>Figura 10: Frequência de intromissões dos machos obtida em sessões de observação comportamental junto às fêmeas que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni (*P < 0.05 comparando Não-manipuladas-Salina com Manipuladas-Salina).</i></p> | <p><i>41</i></p> |
| <p><i>Figura 11: Concentração plasmática de estradiol em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o período neonatal. Na noite do proestro, as ratas foram expostas à urina ou à solução salina setenta e cinco minutos antes do registro do comportamento sexual. O plasma foi coletado imediatamente após o registro comportamental. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.</i></p> | <p><i>42</i></p> |
| <p><i>Figura 12: Concentração plasmática de progesterona em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o período neonatal. Na noite do proestro, as ratas foram expostas à urina ou à solução salina setenta e cinco minutos antes do registro do comportamento sexual. O plasma foi coletado imediatamente após o registro comportamental. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.</i></p> | <p><i>43</i></p> |

Resumo

A manipulação neonatal (MN) é um modelo experimental que examina como alterações ambientais no início da vida afetam estruturas neurais levando a modificações neuroendócrinas e comportamentais estáveis. Estas modificações estão relacionadas às alterações no cuidado materno que podem provocar alterações no desenvolvimento dos filhotes.

Ratos manipulados, tanto machos quanto fêmeas, apresentam redução do comportamento sexual. Em fêmeas, a manipulação neonatal provoca diversas alterações morfológicas em regiões do sistema nervoso central relacionadas com o controle da reprodução, como a área pré-óptica medial, amígdala medial e o bulbo olfatório. Além disso, ratas manipuladas apresentam ciclos anovulatórios e alterações em concentrações hormonais, como ausência do pico de hormônio luteinizante (LH), diminuição da concentração plasmática de estradiol, prolactina, hormônio folículo estimulante e LH na tarde do proestro.

Trabalhos demonstram que feromônios presentes na urina de ratos modulam a fisiologia reprodutiva de ratas, agindo através do órgão vomeronasal e do bulbo olfatório acessório, induzindo alterações na secreção de esteróides gonadais. A estimulação feromonal através da aplicação de urina de machos provoca a ativação de estruturas neurais relacionadas à facilitação do comportamento de lordose.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratas adultas (90 dias) não-manipuladas e manipuladas durante o período neonatal, os efeitos do estímulo olfatório por feromônios da urina de machos sobre o comportamento sexual e concentração de esteróides gonadais. Para isso, foi realizada a borrifação de solução salina ou urina de ratos próxima às narinas de ratas manipuladas e não-manipuladas na noite do proestro. Este procedimento foi

realizado com um *spray* manual a cada 10 minutos durante uma hora. Setenta e cinco minutos após o término da aplicação com o *spray* foi registrado o comportamento sexual e imediatamente após foi coletado o sangue para dosagem de estradiol e progesterona.

Os resultados do trabalho confirmam dados anteriores em que a manipulação neonatal altera o comportamento sexual diminuindo o quociente de lordose e a frequência de intromissões penianas. Além disso, ratas manipuladas expostas à solução salina apresentaram uma tendência à diminuição da concentração de progesterona após o comportamento sexual quando comparadas às ratas não-manipuladas. Assim, podemos inferir que ratas manipuladas respondem menos às estimulações olfatórias e táteis realizadas pelo macho durante o acasalamento.

O estímulo prévio com a urina de ratos machos reverteu o efeito da manipulação neonatal sobre o quociente de lordose, enquanto os níveis de progesterona não diferem dos observados nas ratas não-manipuladas. Assim, o aumento do quociente de lordose em ratas manipuladas que foram estimuladas com urina de ratos machos antes do comportamento sexual pode estar relacionado à elevação na concentração de progesterona.

Introdução

1. Feromônios

Os animais desenvolveram estratégias de comunicação específicas para identificar e atrair parceiros, além de discernir o estado social dos indivíduos da mesma espécie. Em muitas espécies, esta troca de informações envolve a emissão e detecção de feromônios - uma classe distinta e ainda mal conhecida de sinais químicos específicos de gênero e espécie que fornecem informações sobre o status social e sexual do indivíduo (Dulac & Torello, 2003; Tirindelli *et al.*, 2009). Os feromônios podem ser proteínas, pequenas moléculas ou a combinação destas (Touhara & Vosshall, 2009).

O termo feromônio foi introduzido por Karlson e Luscher em 1959. Eles definiram como "substâncias secretadas para fora de um indivíduo e recebidas por um segundo indivíduo da mesma espécie, no qual eles liberam uma reação específica, por exemplo, um comportamento determinado ou processo de desenvolvimento" (Karlson & Luscher, 1959; Brennan & Zufall, 2006). Em mamíferos, os estímulos feromonais podem ser derivados da urina, fezes e/ou glândulas cutâneas (Rekwot *et al.*, 2001), e são detectados principalmente pelo órgão vomeronasal (OVN), podendo também ser detectados pelo epitélio olfatório principal (Wysocki *et al.*, 1980; Halpern & Martínez-Marcos, 2003; Luo *et al.*, 2003).

O sistema olfatório principal, que é constituído pelo epitélio olfatório principal, bulbo olfatório principal e suas projeções (Figura 1), é capaz de perceber um grande número de odores, incluindo algumas substâncias voláteis que surgem a partir de feromônios (Lin *et al.*, 2004; Shipley *et al.*, 2004), enquanto o sistema olfatório acessório, que é constituído pelo OVN, pelo bulbo olfatório acessório (BOA) e suas projeções, detecta principalmente (Luo *et al.*, 2003), mas não exclusivamente, os feromônios (Restrepo *et al.*, 2004; Baxi *et al.*, 2006).

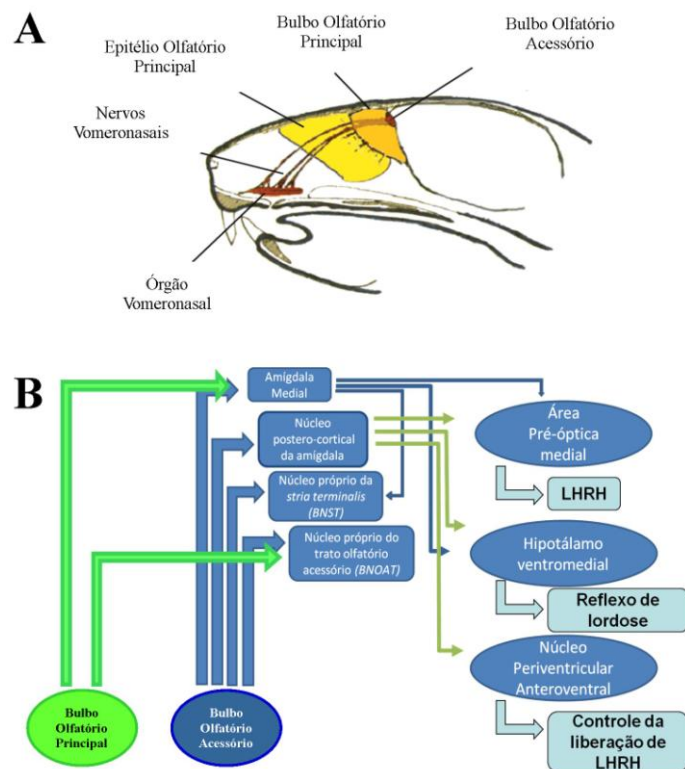


Figura 1: Localização do epitélio olfatório principal e do órgão vomeronasal e projeções para o bulbo olfatório e bulbo olfatório acessório (A). Projeções do bulbo olfatório acessório e participação no controle da função reprodutiva de fêmeas e convergência com vias do bulbo olfatório principal (B).

Os efeitos fisiológicos e hormonais da estimulação feromonal através do OVN são diretamente mediados por projeções para o BOA (Firestein,

2001; Shipley *et al.*, 2004). Assim, paralelamente ao sistema olfatório principal, a maioria dos mamíferos possui um sistema vomeronasal, ou sistema olfatório acessório (Halpern & Martínez-Marcos, 2003; Shipley *et al.*, 2004).

O BOA envia axônios para o núcleo medial da amígdala (MeA), núcleo posterior cortical da amígdala (PCoA), núcleo próprio do trato olfatório acessório e para o núcleo próprio da estria terminal (BNST – bed nucleus of the stria terminalis) (Shipley *et al.*, 2004; Tirindelli *et al.*, 2009). Além disso, o núcleo MeA possui projeções para o BNST e para a área pré-óptica medial (APOM) (Bressler & Baum, 1996), bem como para o hipotálamo ventromedial (VMH) (Rajendren & Moss, 1993; Shipley *et al.*, 2004). Já o PCoA tem projeções para o núcleo periventricular anteroventral (AVPV), VMH e projeções indiretas para a APOM (Shipley *et al.*, 2004), estando assim relacionadas com a modulação de comportamentos sociais e reprodutivos. Além disso, existem convergências entre as projeções do sistema olfatório acessório e o sistema olfatório principal (Pro-Sistiaga *et al.*, 2007), assim, tanto o bulbo olfatório principal quanto o acessório se projetam para vias classicamente consideradas apenas do sistema olfatório principal (núcleo lateral do trato olfatório, amígdala cortical anterior) ou apenas do sistema olfatório acessório (amígdala anterior ventral, núcleo próprio do trato olfatório acessório e núcleo anteroventral medial da amígdala) (Shipley *et al.*, 2004).

Feromônios e comportamento sexual

A percepção dos odores influencia e/ou determina muitas fases do processo reprodutivo, como o reconhecimento do parceiro no comportamento sexual (López *et al.*, 1999; Brennan & Zufall, 2006), e durante a realização de comportamentos maternos, na interação mãe-filhote (Del Cerro, 1998; Lévy *et al.*, 2004). O reconhecimento do estado reprodutivo do parceiro é fundamental para o desenvolvimento dos comportamentos pré-copulatórios, que vão resultar no comportamento sexual (Pfaff *et al.*, 2006; Vandenberg, 2006).

Feromônios presentes na urina do macho interferem na fisiologia reprodutiva da fêmea, como na regularização do ciclo estral, aumento da receptividade e estimulação de secreção de esteróides gonadais (Mora & Cabrera, 1994; Mora *et al.*, 1994; Mora & Sánchez-Criado, 2002; 2004; Haga *et al.*, 2010). Além disso, lesões no BOA e destruição do OVN resultam em um déficit da memória feromonal e redução do comportamento sexual de ratas (Keller *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstraram que ratas apresentam aumento da imunorreatividade para proteína FOS (um indicativo de aumento na atividade neuronal) no BOA após exposição a determinados componentes da urina do macho, tanto em ratos como em camundongos (Halem *et al.*, 1999; Inamura *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2000)

Sabe-se, também, que ratas com idade avançada ou ratas jovens em estro persistente ou com ciclo irregular voltam a ter ciclos estrais regulares após exposição à urina do rato macho. Este efeito é mediado pela

estimulação do órgão vomeronasal da fêmea por feromônios oriundos do macho (Mora & Cabrera, 1997) e é precedido pela liberação do LHRH (Mora & Sánchez-Criado, 2002), acompanhada do aumento nas concentrações plasmáticas de LH, de FSH, de estradiol e progesterona (Mora *et al.*, 1994).

A receptividade sexual em ratas OVX pode ser induzida por uma alta dose de estradiol, porém, estradiol e progesterona são necessários para a expressão completa de comportamentos proceptivos. A receptividade sexual também pode ser melhorada ao longo de algumas horas na ausência de progesterona, expondo ratas com uma dose baixa de estradiol a repetidos acasalamentos com machos (Rajendren *et al.*, 1990; 1991; Rajendren & Moss, 1993; Auger *et al.*, 1997). O protocolo de repetidos acasalamentos varia entre os estudos, mas, em geral, uma fêmea é colocada junto com um macho por 15 minutos e depois volta para a gaiola residência por 15 min. Este ciclo é repetido a cada 30 minutos geralmente de 2-5 h, produzindo aumentos significativos nos quocientes lordose entre 1 e 2 h após o início do primeiro acasalamento (Bennett *et al.*, 2001). Este aumento da receptividade é aparentemente resultado da ativação de receptores de progesterona, pois é bloqueada por injeção de antagonistas destes receptores (Auger *et al.*, 1997).

Durante os acasalamentos repetidos, as fêmeas são expostas a uma diversidade de estímulos sensoriais que podem mediar o aumento da receptividade induzido pelo acasalamento. Além dos estímulos tateis, como a estimulação vaginocervical realizada pela intromissão peniana (Rajendren & Moss, 1994; Bennett *et al.*, 2001), os estímulos feromonais são muito

importantes, pois lesões no OVN suprimem a potenciação da receptividade (Rajendren *et al.*, 1990; Rajendren & Moss, 1994).

2. Período neonatal

Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido e, durante os primeiros dias de vida, o encéfalo passa por diversos processos fundamentais, como a organização funcional das redes neurais, a proliferação, migração e diferenciação neuronal, além de gliogênese e mielinização (Rice & Barone Jr, 2000).

Experiências sensoriais durante o período pós-natal podem levar a alterações no desenvolvimento neural e, conseqüentemente, no comportamento dos filhotes. Estas modificações morfofisiológicas e comportamentais podem permanecer ao longo da vida do animal. (Liu *et al.*, 2000; Levine, 2001; Padoin *et al.*, 2001; Papaioannou *et al.*, 2002; de Azevedo *et al.*, 2010).

Ao nascerem, os ratos são altriciais. Como diversos outros mamíferos, necessitam do cuidado materno para alimentação, termorregulação e para diminuir a exposição a estímulos estressores (Sapolsky & Meaney, 1986), mantendo baixos os níveis de corticosterona (Moriceau & Sullivan, 2004; Moriceau *et al.*, 2004). Portanto, o cuidado materno é constituído de elementos voltados para nutrição, estimulação e proteção da prole (posturas de amamentação, lambidas e construção e proteção do ninho, respectivamente).

Assim, experiências sensoriais no período neonatal tem como consequência alterações no comportamento materno e na relação mãe-filhote, o que pode estar relacionado com as alterações dos processos de desenvolvimento do sistema nervoso. (Liu *et al.*, 1997; de Azevedo *et al.*, 2010).

3. Manipulação neonatal

Diversos modelos de estimulação neonatal são utilizados para examinar o modo pelo qual alterações ambientais no início da vida podem afetar estruturas neurais, levando a modificações comportamentais e neuroendócrinas estáveis. (Levine, 1962; Denenberg, 1964; Levine, 1994; Meerlo *et al.*, 1999; Panagiotaropoulos *et al.*, 2004). Dentre os modelos mais utilizados estão a separação materna (a mãe é separada da ninhada durante alguns minutos ou até horas) e a manipulação neonatal (onde a ninhada é manipulada pelo experimentador).

Em ratos, a manipulação neonatal consiste na breve retirada da mãe do ninho e manipulação dos filhotes pelo experimentador, geralmente alguns minutos por dia, durante as primeiras duas semanas pós-natal. Esse procedimento, aparentemente inofensivo, altera a interação mãe-filhote, fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal em ratos (de Azevedo *et al.*, 2010), e tem como consequência diversas alterações comportamentais, metabólicas e endócrinas que podem permanecer no animal adulto (Gomes *et al.*, 2005; Donadio *et al.*, 2009; Todeschin *et al.*, 2009).

Ratas lactantes apresentam variações naturais no cuidado materno (Meaney, 2001). Assim, podemos distinguir em uma população de lactantes as mães muito-cuidadoras (que apresentam uma maior frequência de lambidas) das mães pouco-cuidadoras (que apresentam uma menor frequência de lambidas). Os filhotes de mães muito-cuidadoras apresentam características similares aos filhotes manipulados no período neonatal (Cameron *et al.*, 2008b). De fato, a manipulação neonatal altera a interação mãe-filhote, aumentando a frequência de lambidas (de Azevedo *et al.*, 2010). Ratas filhas de mães muito-cuidadoras apresentam menor grau de lordose e menor quociente de lordose do que fêmeas de mães pouco-cuidadoras (Cameron *et al.*, 2008a; Cameron *et al.*, 2008b; Cameron *et al.*, 2011). Estas fêmeas filhas de mães muito-cuidadoras também apresentam alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), como diminuição da concentração plasmática de LH e progesterona na tarde do proestro (Cameron *et al.*, 2008a). Além disso, variações no cuidado materno influenciam diferentemente a expressão de receptores de estradiol (ER) α nas fêmeas destas ninhadas em regiões que controlam o cuidado materno e a função reprodutiva. Assim, fêmeas filhas de mães muito-cuidadoras apresentam uma maior expressão de ER- α na APOM (Champagne *et al.*, 2006) e menor expressão de ER- α e pER- α (receptores de estradiol - α fosforilados) no núcleo anteroventral periventricular (Cameron *et al.*, 2008a).

A manipulação neonatal provoca alterações de longo prazo no eixo HPA, caracterizadas por uma diminuição do medo a ambientes novos e ao gato (Padoin *et al.*, 2001), e redução da ansiedade, pois permanecem mais

tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Meerlo *et al.*, 1999; Severino *et al.*, 2004). Além disso, ratos manipulados apresentam menor secreção de CRH, ACTH e corticosterona frente a novos estímulos estressantes e um retorno mais rápido às concentrações basais de corticosterona (Levine, 1993; Plotsky & Meaney, 1993; Padoin *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004; Madruga *et al.*, 2006). Estes animais apresentam um aumento de receptores de glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal (Meaney *et al.*, 1985), o que pode provocar um aumento do *feedback* negativo durante o estresse.

Diversas alterações morfológicas no sistema nervoso central são encontradas em animais manipulados, tanto em machos quanto em fêmeas, como redução no número e volume de células no *Locus Coeruleus* (Lucion *et al.*, 2003), e redução de células ocitocinérgicas parvocelulares no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (Todeschin *et al.*, 2009). Em fêmeas, há uma redução no número de células no núcleo supra-óptico (SON) e no PVN (Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007), na área pré-óptica medial (APOM) (Camozzato *et al.*, 2009), amígdala medial pósterodorsal (MePD) e AVPV (Camozzato, 2006).

Recentemente, foram encontradas alterações morfológicas na estrutura do bulbo olfatório principal (BO). Já com 11 dias, machos apresentam diminuição da densidade numérica de células mitrais e de células da camada glomerular que persistem ao longo da vida dos animais, enquanto que, em fêmeas, estas alterações são observadas apenas na idade adulta (de Azevedo, dados não publicados). Estas alterações podem estar relacionadas

a deficiências no aprendizado olfatório encontradas em filhotes manipulados, importante para o reconhecimento do odor materno através da preferência pela maravalha do ninho (Rainecki et al., 2009).

4. Manipulação neonatal e função reprodutiva

Além de promover alterações na atividade do eixo HPA, a manipulação causa modificações na função reprodutiva. Ratos machos manipulados realizam menos montas (Padoin *et al.*, 2001) e as fêmeas manipuladas apresentam menor quociente de lordose (Padoin *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006a; Rainecki *et al.*, 2008).

Para melhor compreender as alterações provocadas pela manipulação neonatal na fisiologia reprodutiva e no comportamento sexual de ratas, segue uma breve revisão sobre o assunto.

Controle neuroendócrino da função reprodutiva

O hipotálamo é um importante centro integrador de informações internas e ambientais, garantindo a homeostase do organismo, a coordenação de funções viscerais e a iniciação de comportamentos, tais como alimentação, defesa e reprodução (Simerly, 2004). A função reprodutiva é regulada por regiões específicas do hipotálamo que controlam a hipófise e gônadas, formando o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG).

Um dos hormônios responsáveis pela regulação da função reprodutiva dentro do eixo HPG é o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), também chamado de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Os neurônios que sintetizam e secretam esse decapeptídeo integram e controlam aspectos periféricos e centrais de reprodução, incluindo o início da puberdade e o comportamento sexual (Sisk & Foster, 2004; Maeda *et al.*, 2010). Em roedores, LHRH é produzido por uma população pequena e difusa de neurônios espalhados no hipotálamo rostral, na área pré-óptica medial (APOM) e no prosencéfalo basal, incluindo o septo e banda diagonal de Broca (Wu *et al.*, 1997).

A secreção de LHRH na eminência mediana regula a síntese e secreção das gonadotrofinas: do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH) pela hipófise anterior. O LH e o FSH, por sua vez, controlam o desenvolvimento e a função das gônadas masculinas e femininas e a liberação de esteróides gonadais na corrente sanguínea. Esses hormônios esteróides gonadais são transportados através do sistema circulatório, e como parte de suas ações no organismo, voltam para o hipotálamo e hipófise, inibindo a liberação de LHRH e LH, completando um circuito de retroalimentação negativa (Maffucci & Gore, 2009). Entretanto, nas fêmeas, pouco antes da ovulação, a retroalimentação negativa realizada pelo estradiol muda para retroalimentação positiva através de um mecanismo que ainda não é totalmente compreendido, mas, sem dúvida, envolve entradas sensíveis a variações de estradiol para neurônios LHRH (Maffucci & Gore, 2009).

Diversos mediadores fazem parte do mecanismo pelo qual o estradiol modula secreção de LHRH. Alguns desses mediadores são estimulatórios para a secreção de LHRH como a noradrenalina (NA) (Anselmo-Franci *et al.*, 1997), neuropeptídeo Y (Leupen *et al.*, 1997), angiotensina II (Dornelles & Franci, 1998), kisspeptina (Thompson & Murphy, 2010) e óxido nítrico (Rettori *et al.*, 1993; McCann *et al.*, 2003), e alguns são inibitórios, como a β -endorfina e a interleucina-1 (Herbison, 1998; McCann *et al.*, 2003).

Ciclo estral

O ciclo estral da rata é composto por quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro), que exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais (estrógeno e progesterona), de prolactina (PRL) e gonadotrofinas – LH e FSH, como mostrado na Figura 2 (Matthews Jr & Kenyon, 1984; Freeman, 2006).

Estas variações hormonais estão associadas a alterações comportamentais, como na noite da fase proestro, em que a rata passa a estar sexualmente receptiva ao macho. Além disso, ocorrem mudanças na mucosa vaginal, como a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período, que permitem a identificação da fase do ciclo através do esfregaço vaginal.

A ovulação é o evento central do ciclo reprodutivo das fêmeas e requer picos de gonadotrofinas e PRL no período pré-ovulatório, bem como a elevação das concentrações de estradiol e progesterona. A variação das

concentrações dos esteróides gonadais atua como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas, sincronizando os eventos ovulatórios com os comportamentos reprodutivos, para que ocorra o sucesso reprodutivo (Smith *et al.*, 1975; Freeman, 2006).

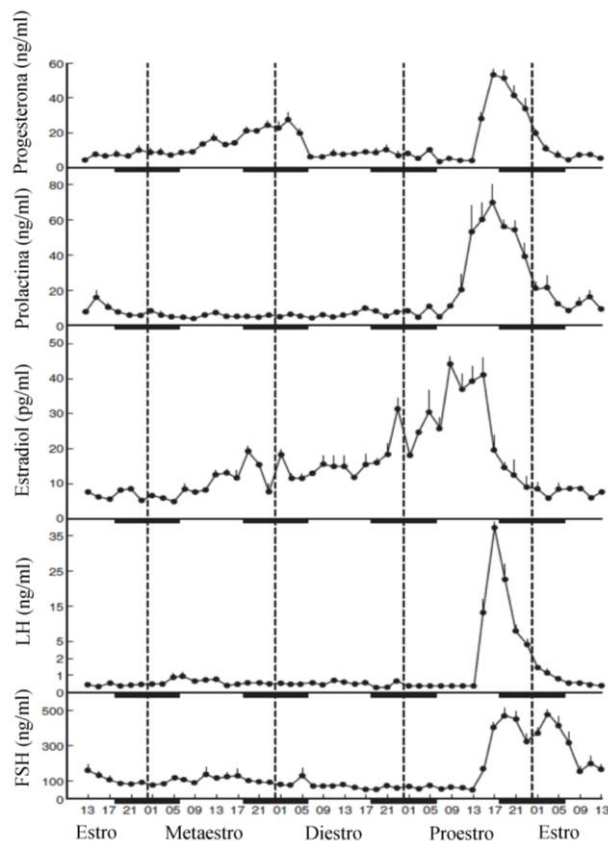


Figura 2: Variações nos níveis plasmáticos de estradiol, progesterona, prolactina, LH e FSH em ratas durante o ciclo estral (Freeman, 2006).

A concentração plasmática de progesterona começa a aumentar quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório do LH, atingindo o pico juntamente com este e retorna os valores basais na manhã do estro. Um segundo pico de progesterona inicia ao meio dia do metaestro, mantendo-se na madrugada do diestro II e caindo para valores basais no início da manhã (Butcher *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1975; Gomes *et al.*, 2005; Freeman, 2006).

Comportamento sexual em ratas

O comportamento sexual da rata ocorre na noite da fase proestro (chamado de “estro comportamental” por alguns autores) e pode ser dividido em três componentes: atrativo, proceptivo (investigação da genitália do macho, pequenas corridas e saltos, vocalizações, contatos físicos) e receptivo (o reflexo de lordose). O comportamento de lordose é a postura receptiva da fêmea, na qual há flexão dorsal da coluna vertebral quando o macho realiza o comportamento de monta. Esta postura é a indicação mais proeminente de que a rata está sexualmente receptiva (Pfaff *et al.*, 1994; Pfaff *et al.*, 2006) e facilita a inserção peniana pela qual o macho realiza a estimulação vaginocervical durante a cópula. Essa estimulação induz aumento de concentração plasmática de hormônios como a PRL e a progesterona na fêmea, que são necessários para o sucesso reprodutivo, isto é, a implantação do blastocisto (Adler *et al.*, 1970; Forcelledo *et al.*, 1982; Bennett *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 2003).

A expressão da lordose em roedores requer a atividade coordenada de neurônios do prosencéfalo, mesencéfalo, tronco encefálico e medula espinhal (Pfaff, 1980). Dentre as estruturas envolvidas estão o hipotálamo ventromedial (VMH), o núcleo medial da amígdala (MeA), a área pré-óptica, o septo lateral, a substância cinzenta do mesencéfalo e o bulbo olfatório (Nance *et al.*, 1975; Rajendren *et al.*, 1991; Rajendren & Moss, 1993; Pfaff *et al.*, 1994; Flanagan-Cato *et al.*, 2001). O VMH é um local crítico para a modulação da expressão da lordose, e a macrocircuitaria proposta para lordose incluem projeções do VMH para substância cinzenta periaquedutal, desta para

formação reticular e desta para neurônios motores da medula espinhal, que controlam os músculos envolvidos no reflexo de lordose (Flanagan-Cato *et al.*, 2001; Pfaff *et al.*, 2006; Pfaff *et al.*, 2008).

A circuitaria da lordose é inibida tonicamente e o VMH é considerado o principal sítio envolvido com a facilitação da lordose, cuja atividade é modulada por estrógeno e progesterona (Barfield *et al.*, 1983). A aplicação local de estradiol e progesterona no VMH é suficiente para provocar o comportamento de lordose, e o bloqueio dos receptores de estradiol e progesterona diminuem o comportamento reprodutivo (Pfaff *et al.*, 2006). Estrógeno e progesterona aumentam a atividade neuronal em neurônios no VMH que se projetam para a substância cinzenta periaquedutal, (provavelmente por aumentar sensibilidade a neurotransmissores e neuropeptídeos). Assim, esteróides gonadais desinibem o circuito da lordose, determinando uma maior probabilidade das fêmeas exibirem o comportamento em resposta à estimulação sensorial adequada, isto é, a monta (Etgen *et al.*, 1999). De fato, o comportamento de lordose é regulado por interações entre estruturas neurais responsáveis pela sua expressão e os esteróides gonadais (Pfaff *et al.*, 1994; Pfaff *et al.*, 1996; Pfaff *et al.*, 2006; Mazzucco *et al.*, 2008; Guerra-Araiza *et al.*, 2009).

Apesar de uma alta dose de estradiol também poder induzir a comportamentos sexuais, estradiol e progesterona são necessários para o início da receptividade sexual e para a expressão completa de comportamentos proceptivos. A expressão dos receptores de progesterona é altamente dependente de estradiol, mediada principalmente por receptores de

estradiol na APOM e no VMH (Mazzucco *et al.*, 2008; Quadros & Wagner, 2008). Existe também uma forte correlação entre a indução da expressão de receptores de progesterona no hipotálamo com a realização de comportamentos reprodutivos em fêmeas de roedores. Após o início da administração de estradiol, o aumento nos níveis de receptores de progesterona e comportamento reprodutivo são paralelos, bem como as quedas após o término do tratamento (Pfaff *et al.*, 2006). Assim, progesterona e metabólitos da progesterona produzidos no encéfalo tem um importante papel na facilitação da lordose através dos receptores de progesterona (PR) do tipo A e B (PR-A e PR-B) (Guerra-Araiza *et al.*, 2009).

Efeitos da manipulação neonatal sobre a função reprodutiva de fêmeas

Além da redução do comportamento sexual, fêmeas manipuladas apresentam ciclos estrais anovulatórios (Gomes *et al.*, 1999; Raineiki *et al.*, 2008) e uma diminuição da concentração plasmática de estradiol, PRL, FSH e LH durante a tarde do proestro, bem como ausência do pico de LH, apesar de apresentarem ciclos estrais regulares, compostos por quatro fases (Gomes *et al.*, 2005; Raineiki *et al.*, 2008).

A manipulação neonatal também provoca alterações estruturais no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, como uma redução da densidade de células e do diâmetro do soma neuronal na APOM em fêmeas (Camozzato *et al.*, 2009). Contudo, apresentam um aumento no conteúdo de LHRH (Gomes *et al.*, 2005) e uma diminuição da atividade noradrenérgica e óxido-nitrérgica na

APOM na tarde do proestro, que estaria relacionada com a diminuição da secreção de LHRH (Raineiki *et al.*, 2008).

Apesar de o *Locus coeruleus* ser uma importante estrutura relacionada ao estresse, ele possui projeções para a APOM que estimulam a liberação de LHRH, isso porque, em uma sequência de eventos simplificada, noradrenalina (NA) do *Locus coeruleus* estimula a enzima óxido nítrico sintase (NOS), levando à produção de óxido nítrico (NO). Esse neurotransmissor gasoso atinge os axônios dos neurônios LHRH induzindo excitação dos grânulos secretores de LHRH (Rettori *et al.*, 1993). Apesar da diminuição do número de células no *Locus coeruleus* encontrada em ratas manipuladas (Lucion *et al.*, 2003) não significar necessariamente uma diminuição de atividade noradrenérgica, esta redução, juntamente com a diminuição da atividade noradrenérgica e óxido-nitrérgica na APOM, bem como a redução do número de células nesta região, podem explicar a ausência de pico de LH e ciclos anovulatórios, por sinergicamente alterarem o mecanismo central gerador da ovulação (Raineiki *et al.*, 2008)

A manipulação também provoca alterações no sistema angiotensinérgico, relacionadas tanto ao eixo HPA quanto ao HPG. A angiotensina II (Ang II) no sistema nervoso central modula o pico pré-ovulatório de LH, pois estimula a liberação de LHRH pela área pré-óptica medial (APOM) (Dornelles & Franci, 1998). A estimulação provocada pela Ang II é dependente de esteróides gonadais, sendo inibida em ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (Steele, 1992).

A expressão dos receptores de Ang II em alguns núcleos hipotalâmicos é dependente de estradiol e progesterona (Donadio *et al.*, 2005; 2006). A manipulação neonatal reduz a densidade de receptores de Ang II na APOM de fêmeas na tarde do proestro, o que pode diminuir a ação excitatória da Ang II nos neurônios LHRH (Gomes *et al.*, 2006b). Assim, a diminuição da concentração plasmática de estradiol na tarde do proestro pode estar envolvida na diminuição dos receptores de Ang II na APOM de ratas manipuladas, o que converge para a não geração do pico pré-ovulatório de LH.

Além disso, os níveis de progesterona plasmática após o comportamento sexual também estão reduzidos em ratas manipuladas (Gomes *et al.*, 2006a). Esta elevação da concentração de progesterona é importante para o sucesso reprodutivo, pois é necessária para a implantação do blastocisto (Adler, 1969; Adler *et al.*, 1970). Tanto as estimulações vaginocervicais realizadas pelas intromissões penianas (Bennett *et al.*, 2001) quanto os estímulos olfatórios oriundos do macho (Mora & Sánchez-Criado, 2004; Tomioka *et al.*, 2005) provocam a liberação desta progesterona. Desta forma, tanto a resposta às estimulações vaginocervicais quanto a estimulação olfatória podem estar deficientes em ratas manipuladas.

Justificativa

A manipulação neonatal altera o eixo HPG e o comportamento reprodutivo de fêmeas, diminuindo a capacidade reprodutiva e a probabilidade de ocorrer o sucesso reprodutivo (Gomes *et al.*, 2005; Rainecki *et al.*, 2008). Feromônios presentes na urina de ratos machos podem interferir na fisiologia reprodutiva de fêmeas, como na regularização do ciclo estral e na secreção de esteróides gonadais (Mora & Cabrera, 1997; Mora & Sánchez-Criado, 2002) Desta forma, a estimulação com a urina de ratos machos podem atuar na facilitação do comportamento sexual de ratas manipuladas no período neonatal, bem como atuar sobre a secreção de esteróides ovarianos, de modo a restaurar parâmetros relacionados ao sucesso reprodutivo.

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratas adultas não-manipuladas e manipuladas no período neonatal, os efeitos do estímulo olfatório por feromônios da urina de machos na noite do proestro sobre o comportamento sexual e a concentração plasmática de esteróides gonadais após o comportamento sexual.

Objetivos Específicos

Em ratas manipuladas e não-manipuladas no período neonatal, e previamente expostas à urina do macho na noite do proestro, avaliar:

- Comportamento sexual das fêmeas 75 min após a exposição;
- As concentrações plasmáticas de estradiol após 90 min à exposição;
- As concentrações plasmáticas de progesterona após 90 min à exposição.

Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade *Wistar* provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório CREAL/UFRGS). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e luz controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12h), e tiveram livre acesso à água e ração padrão, não ultrapassando o limite de 5 ratos (mínimo 2) por caixa (41 comprimento x 34 largura x 17 altura em cm). Todos os procedimentos foram realizados seguindo o *Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* e as recomendações para utilização de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNec). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFRGS (número de registro : 2008146)

2. Manipulação Neonatal

Quarenta ratas prenhas foram acompanhadas ao longo do final da gestação e o dia do nascimento dos filhotes foi considerado dia zero (D0). No D1 as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes e após as ratas com suas ninhadas foram divididas em dois grupos (Figura 3 - A):

Não-manipuladas (controle): animais que não foram tocados pelos experimentadores nem pelos bioteristas durante os 10 primeiros dias após o nascimento. Após este período, as caixas eram limpas conforme a rotina do biotério.

Manipuladas: animais que foram separados da mãe e manipulados durante 1 minuto por dia, nos 10 primeiros dias pós-natal. A manipulação consiste em retirar a mãe da caixa-residência e colocá-la em uma caixa separada enquanto os filhotes são afastados do ninho e gentilmente manipulados, todos juntos, pelo pesquisador, durante 1 minuto (Figura 3 - B). Logo após, os filhotes são devolvidos para sua caixa-residência e a mãe é devolvida ao ninho.

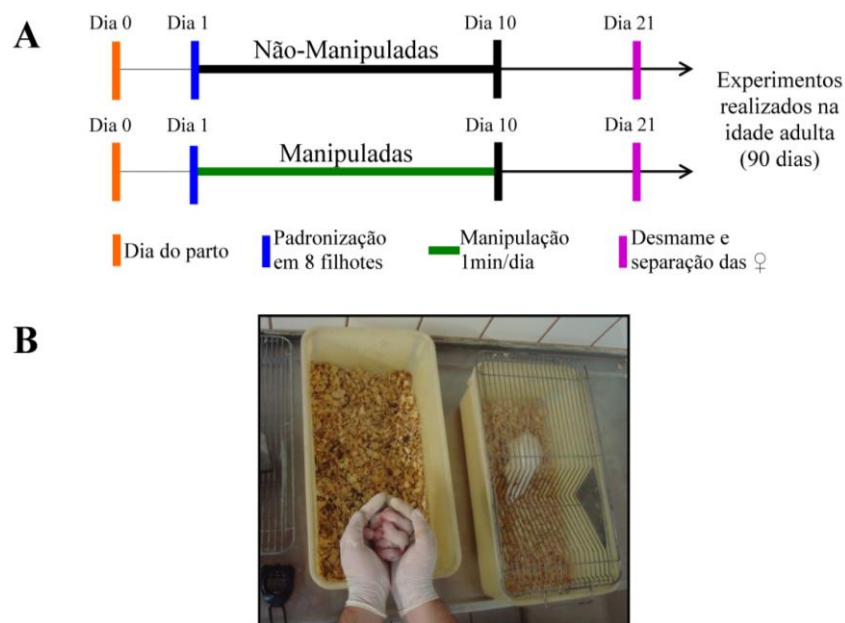


Figura 3: Durante a manipulação neonatal o experimentador retira a mãe da caixa residência e manipula os filhotes durante um minuto e após, recoloca a ninhada e a mãe no ninho (A). Este procedimento é repetido do 1º dia pós-natal até o 10º. No 21º dia, a mãe era retirada e as fêmeas foram separadas até a realização do experimento (B).

No 21° dia pós-natal foi realizado o desmame das ninhadas, ou seja, os filhotes foram separados da mãe, e as fêmeas colocadas em caixas separadas dos machos, não ultrapassando o limite de 5 ratas por caixa (41 comprimento x 34 largura x 17 altura em cm) até a continuidade dos experimentos (Figura 3 - A).

3. Coleta de urina

Para a realização da coleta de urina, primeiramente foi necessária a realização de um teste de desempenho sexual de ratos machos que seriam utilizados. Esse teste de desempenho sexual consiste em avaliar, durante 10 minutos, o comportamento do macho perante uma fêmea receptiva.

Para induzir a receptividade nas fêmeas utilizadas para o teste de desempenho sexual foi realizado o procedimento cirúrgico de ovariectomia (retirada dos ovários), sob anestesia com ketamina e xilazina (respectivamente, 100 e 20 mg/Kg). Quinze dias após a retirada dos ovários, induziu-se a receptividade sexual por injeções subcutâneas de benzoato de estradiol (benzo-ginoestril ap 5mg - SARSA, RJ) na dose de 2 µg/rata, 48 horas antes do teste, e progesterona (Sigma) na dose de 500 µg/rata, mais benzoato de estradiol na dose de 2 µg/rata, 6 horas antes do teste. Os machos que, ao serem colocados com as fêmeas, apresentaram mais de seis intromissões penianas no período de dez minutos, foram considerados como sexualmente ativos.

Para a coleta da urina, os ratos sexualmente ativos foram colocados em gaiolas metabólicas (25 comprimento x 22 Largura x 22 altura em cm) individualizadas por 24 h (Figura 4), sendo a urina congelada a -20°C e armazenada para uso posterior. Cada rato foi colocado na gaiola metabólica uma vez por semana.



Figura 4: Coleta de urina em gaiola metabólica. O rato previamente selecionado permanecia 24 horas na gaiola metabólica com água e comida à vontade. A urina foi coletada em um recipiente refrigerado e em seguida congelada até a realização do experimento.

4. Verificação do ciclo estral

A verificação do ciclo estral da rata se dá através da coleta do esfregaço vaginal com solução salina (0,9%) diariamente e verificação em microscópio óptico. No experimento, ratas não-manipuladas e manipuladas (controles) selecionadas após três ciclos estrais regulares foram expostas à urina de ratos machos adultos ou à solução salina na noite do proestro.

5. Exposição a urina do macho ou solução salina

Na noite do proestro, após trinta minutos de apagadas as luzes, foram iniciados os tratamentos com solução de urina ou solução salina. As exposições foram administradas por meio um “*spray*” manual contendo urina proveniente de ratos machos adultos sexualmente ativos (urina previamente coletada em gaiola metabólica), ou solução salina 0,9% (Figura 5). Cada borrifação continha 50 µl de solução.



Figura 5: Demonstração da exposição à solução de urina através de um *spray* manual. A solução salina era aplicada da mesma forma.

A exposição foi realizada à distância de 1 cm das narinas, a cada 10 minutos durante 1 hora na noite do proestro (Figura 6), totalizando sete borrifações (Mora & Cabrera, 1994; Mora & Cabrera, 1997; Mora & Sánchez-Criado, 2002).

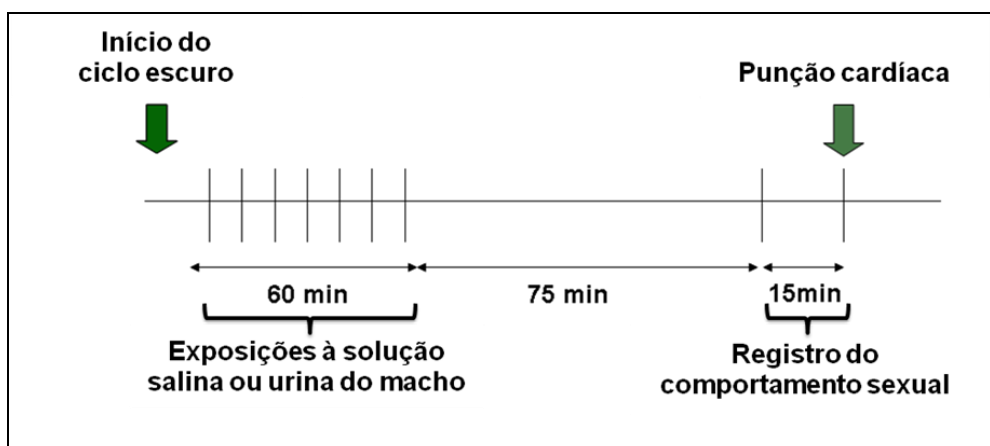


Figura 6: Desenho experimental - as ratas foram borrifadas com um *spray* manual contendo urina do macho ou solução salina, totalizando sete exposições durante 1 hora, em intervalos de 10 minutos. Após 75 minutos da última exposição realizou-se o registro do comportamento sexual por 15 minutos e imediatamente a seguir a coleta de sangue por punção cardíaca.

Assim, foram obtidos quatro grupos experimentais:

Não-manipuladas-Salina: ratas que não foram manipuladas durante o período neonatal e que foram expostas a solução salina antes do comportamento sexual na noite do proestro.

Não-manipuladas-Urina: ratas que não foram manipuladas durante o período neonatal e que foram expostas a urina de machos antes do comportamento sexual na noite do proestro.

Manipuladas-Salina: ratas manipuladas durante o período neonatal e que foram expostas a solução salina antes do comportamento sexual na noite do proestro.

Manipuladas-Urina: ratas manipuladas durante o período neonatal e que foram expostas a urina de machos antes do comportamento sexual na noite do proestro.

6. Registro do comportamento sexual

Para o registro do comportamento sexual, os animais foram colocados em caixas de observação com dimensões de 70 x 70 x 35 cm com paredes de acrílico, o que permite ampla visualização dos animais. O chão das mesmas foi coberto com maravalha.

Inicialmente, um macho sexualmente ativo foi retirado da caixa residência e colocado na caixa de observação por um período de dez minutos para adaptação ao novo ambiente. A fêmea foi colocada junto ao macho 75 minutos após a última exposição com *spray*, iniciando-se imediatamente a sessão de registro do comportamento sexual de 15 minutos (Figura 6).

A sessão foi registrada com filmadora de vídeo digital com função de filmagem noturna e com utilização de luzes vermelhas. O filme foi analisado por um observador treinado usando o programa de análise comportamental “The Observer” (Noldus Information Technology). Foram analisados os parâmetros de frequência de lordoses das fêmeas, além a frequência de montas e a frequência de intromissões penianas realizadas pelos machos. O quociente de lordose foi obtido através da divisão do número de lordoses pelo número de montas. A filmagem de cada animal foi identificada com um código, de forma que o observador dos vídeos não identificasse a qual grupo pertencia o animal.

7. Coleta de sangue e dosagens hormonais

Noventa minutos após a última exposição à solução salina ou urina do rato macho (i.e. imediatamente após o registro do comportamento sexual), as ratas eram anestesiadas com ketamina e xilazina (respectivamente, 100 e 20 mg/Kg). Com uma seringa heparinizada o sangue foi coletado através do ventrículo esquerdo e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos sob refrigeração (4°C). O plasma foi congelado e armazenado em Freezer - 70°C.

Para as dosagens hormonais foi realizada a extração prévia dos hormônios, e em seguida realizado o ensaio pela técnica de EIA (Enzyme Immunoassay) de acordo com as instruções do fabricante para dosagem de estradiol e progesterona (Estradiol EIA Kit e Progesterona EIA Kit; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

8. Análise estatística

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

Para todas as análises foi efetuada a comparação através de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida, quando necessário, de post-test de *Bonferroni*.

Resultados

1. Comportamento Sexual

Quanto ao quociente de lordose (Figura 7) foi encontrado um efeito significativo da manipulação [$F_{(1,49)} = 9,74$; $p < 0,05$], no entanto não foi observado efeito significativo da aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 1,46$; $p = 0,23$]. Foi encontrado também efeito significativo para a interação entre manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 7,63$; $p < 0,05$]. O teste de *Bonferroni* mostrou que houve redução significativa do quociente de lordose no grupo Manipulado-Salina quando comparado ao grupo Não-manipulado-Salina ($P < 0.001$) e Manipulado - Urina ($P < 0.05$).

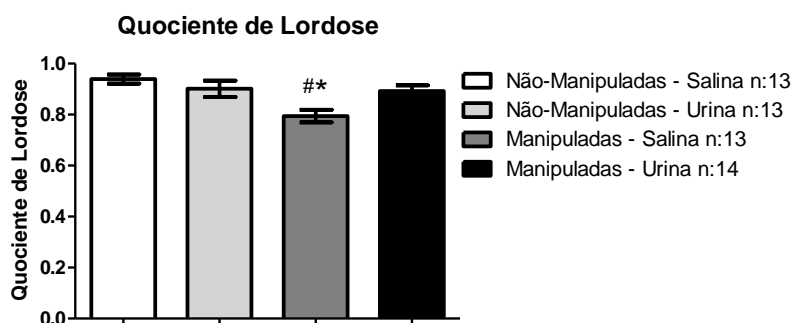


Figura 7: Efeito da estimulação por urina de ratos machos ou solução salina sobre o quociente de lordose de ratas não-manipuladas e manipuladas. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas via seguido de *Bonferroni* (# $P < 0.01$ comparando Não-manipuladas-Salina com Manipuladas-Salina; * $P < 0.05$ comparando Manipuladas-Salina com Manipuladas-Urina).

Quanto à frequência de montas dos machos durante a realização do comportamento sexual com fêmeas não-manipuladas e manipuladas expostas a solução de salina ou de urina (Figura 8) não foi observado efeito da manipulação [$F_{(1,49)} = 0,34$; $p = 0,56$] ou da aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 0,06$; $p = 0,81$], bem como efeito da interação entre manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 0,00$; $p = 0,96$].

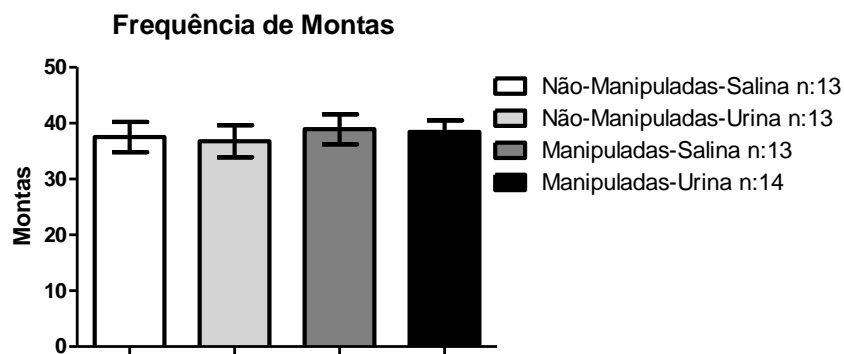


Figura 8: Frequência de monta dos machos obtida em sessões de observação comportamental junto às fêmeas, que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.

A Figura 9 mostra a frequência de lordoses de fêmeas não-manipuladas e manipuladas expostas à solução de salina ou de urina durante a realização do comportamento sexual. Não foi observado efeito da manipulação [$F_{(1,49)} = 0,37$; $p = 0,55$] ou da aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 0,05$; $p = 0,82$], bem como efeito da interação entre manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 1,13$; $p = 0,29$].

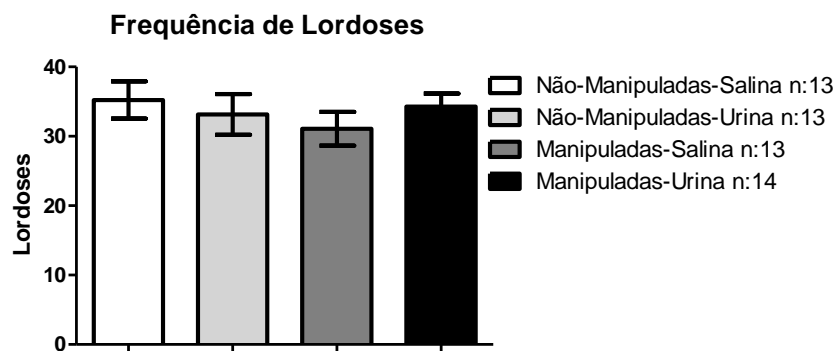


Figura 9: Frequência de lordoses de fêmeas manipuladas e não-manipuladas que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.

Quanto à frequência de intromissões dos machos durante a realização do comportamento sexual (Figura 10) não foi observado efeito significativo da manipulação [$F_{(1,49)} = 2,86$; $p = 0,10$] e nem da aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 0,41$; $p = 0,52$], entretanto foi observado efeito significativo para a interação entre manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,49)} = 4,57$; $p < 0,05$]. O teste de *Bonferroni* mostrou que houve redução significativa na frequência de intromissões realizadas pelos machos em fêmeas do grupo Manipulado-Salina quando comparado à frequência de intromissões de machos durante o comportamento sexual com fêmeas dos grupos Não-manipulado-Salina ($P < 0.05$).

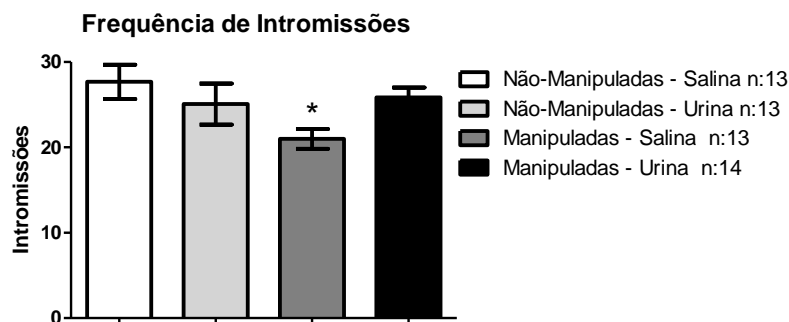


Figura 10: Frequência de intromissões dos machos obtida em sessões de observação comportamental junto às fêmeas que receberam estimulação por urina de ratos machos ou solução salina. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias seguida de *Bonferroni* (* $P < 0.05$ comparando Não-manipuladas-Salina com Manipuladas-Salina).

2. Dosagens hormonais

Foi observado efeito significativo da manipulação [$F_{(1,20)} = 4,74$; $p < 0,05$] quanto a concentração plasmática de estradiol após o comportamento sexual, contudo não houve efeito significativo da aplicação de urina [$F_{(1,20)} = 1,31$; $p = 0,27$] e da interação entre a manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,20)} = 0,04$; $p = 0,85$]. O *Post-test* de *Bonferroni* não detectou diferença significativa entre os grupos.

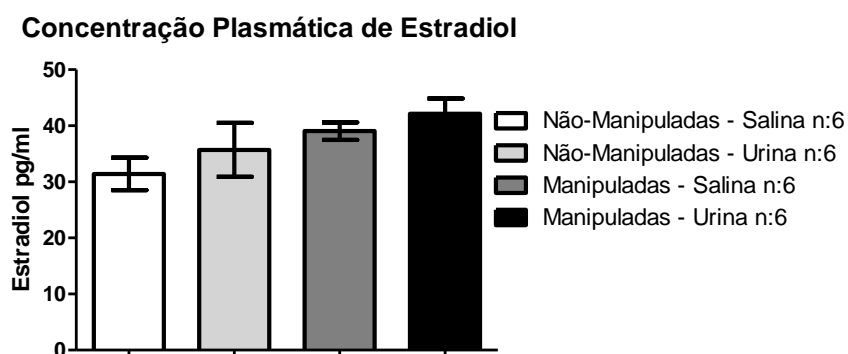


Figura 11: Concentração plasmática de estradiol em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o período neonatal. Na noite do proestro, as ratas foram expostas à urina ou à solução salina setenta e cinco minutos antes do registro do comportamento sexual. O plasma foi coletado imediatamente após o registro comportamental. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias seguida de *Bonferroni*.

A Figura 12 mostra a concentração plasmática de progesterona logo após o registro do comportamento sexual nas ratas não-manipuladas e manipuladas previamente expostas à solução salina ou à solução de urina. Não foi observado efeito significativo da manipulação [$F_{(1,20)}= 3,91$; $p= 0,06$], da aplicação de urina [$F_{(1,20)}= 0,96$; $p= 0,34$] e da interação entre a manipulação e aplicação de urina [$F_{(1,20)}= 0,53$; $p= 0,47$].

Concentração Plasmática de Progesterona

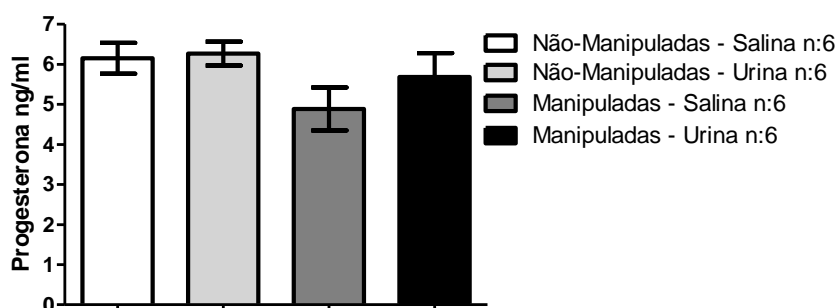


Figura 12: Concentração plasmática de progesterona em ratas não-manipuladas e manipuladas durante o período neonatal. Na noite do proestro, as ratas foram expostas à urina ou à solução salina setenta e cinco minutos antes do registro do comportamento sexual. O plasma foi coletado imediatamente após o registro comportamental. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias.

Discussão

A manipulação neonatal pode alterar o desenvolvimento dos filhotes promovendo alterações neuroendócrinas, metabólicas e até estruturais no SNC que podem permanecer ao longo da vida. Fêmeas manipuladas no período neonatal apresentam uma redução na capacidade reprodutiva, como diminuição do comportamento sexual (Padoin *et al.*, 2001) e alterações nas concentrações dos hormônios esteróides sexuais (estradiol e progesterona), bem como diminuição no pico de LH na tarde do proestro (Gomes *et al.*, 2005) e ocorrência de ciclos anovulatórios (Gomes *et al.*, 1999). Assim, as fêmeas manipuladas apresentam uma diminuição em potencial do sucesso reprodutivo.

A percepção dos odores é determinante em muitas fases do processo reprodutivo (López *et al.*, 1999; Brennan & Zufall, 2006). O reconhecimento do estado reprodutivo do parceiro é fundamental para o desenvolvimento dos comportamentos pré-copulatórios (Pfaff *et al.*, 2006; Vandenberg, 2006). Sendo assim, o bom funcionamento do sistema olfatório principal e acessório é fundamental para o processo reprodutivo.

Ratas manipuladas no período neonatal apresentaram uma diminuição na preferência olfatória pelos machos sexualmente ativos, isto é, em um teste realizado na noite do proestro, onde a fêmea pode explorar duas áreas, uma contendo um macho sexualmente ativo e a outra um macho castrado ou outra

fêmea, ratas manipuladas não passam mais tempo explorando o macho sexualmente ativo (Rainecki, 2006). Isso pode estar relacionado com a diminuição da motivação sexual e com o não reconhecimento do macho sexualmente ativo, visto que a manipulação provoca a diminuição do número de células na camada mitral e glomerular do bulbo olfatório (de Azevedo, não publicados) e em estruturas relacionadas ao processamento da informação olfatória e feromonal de ratas adultas, como a amígdala medial, área pré-óptica medial e núcleo periventricular anteroventral (Shipley *et al.*, 2004; Camozzato, 2006; Camozzato *et al.*, 2009).

Tendo em vista que a manipulação provoca uma diminuição do comportamento sexual e alterações no sistema olfatório, e que feromônios oriundos de ratos machos provocam alterações na fisiologia reprodutiva de fêmeas, neste trabalho foi realizado em ratas não-manipuladas e manipuladas um procedimento de exposição à solução salina (não estimuladas) ou a uma solução de urina de machos (com estimulação olfatória). A exposição foi realizada através de um *spray* manual contendo solução salina ou urina, uma borrifada a cada dez minutos por uma hora. Após setenta e cinco minutos do final da exposição, foi analisado o comportamento sexual.

Neste trabalho, demonstramos que ratas manipuladas que foram expostas a uma solução salina antes do registro do comportamento sexual (grupo Manipuladas-Salina), ou seja, que não receberam estimulação feromonal prévia, apresentam uma diminuição do quociente de lordose. Este resultado vai ao encontro de trabalhos anteriores onde a manipulação diminuiu o comportamento sexual de fêmeas (Padoin *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2005;

Raineki *et al.*, 2008). Entretanto, nas ratas manipuladas que foram estimuladas com a urina de ratos machos antes do comportamento sexual (grupo Manipuladas-Urina), o quociente de lordose foi elevado em relação ao grupo Manipuladas-Salina, retornando aos níveis de quociente de lordose das ratas não-manipuladas. Portanto, a estimulação prévia com a urina reverteu o efeito da manipulação sobre o quociente de lordose de fêmeas.

Dessa forma, a estimulação feromonal através do epitélio olfatório principal e do epitélio do órgão vomeronasal promovida pela urina pode ter aumentado a atividade de regiões que atuam na modulação do comportamento sexual das ratas manipuladas. Diversos componentes da urina de ratos machos são detectados pelo OVN, provocando a ativação neuronal no BOA (Tsujikawa & Kashiwayanagi, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2000), BNST, APOM e em diversas regiões do complexo amigdalóide em ratas fêmeas (Halem *et al.*, 1999). Alguns desses núcleos tem um importante papel na modulação do comportamento sexual de fêmeas, além de possuírem eferências para o VMH (Bian *et al.*, 2008), uma importante região hipotalâmica reguladora do comportamento de lordose (Pfaff *et al.*, 2006). Essa modulação pode ser através de projeções indiretas para o VMH, bem como através da ativação de regiões hipotalâmicas que regulam a liberação de estradiol e progesterona, que podem atuar na facilitação da lordose no VMH.

Esta resposta à urina ocorreu apesar da manipulação neonatal provocar alterações morfológicas no bulbo olfatório (de Azevedo, não publicados) e possuírem diminuição na preferência olfatória de machos

sexualmente ativos (Rainecki, 2006), o que pode estar relacionado a uma deficiência na capacidade olfatória de detecção de feromônios. Entretanto, a estimulação realizada no experimento pode ser considerada uma superestimulação, já que uma grande quantidade de urina é borrifada próxima às narinas. Assim, pode-se sugerir que as ratas manipuladas tenham uma deficiência na percepção de feromônios, que foi compensada por uma superestimulação feromonal realizada antes do comportamento sexual.

A aplicação de urina no grupo Não-manipulado não alterou o quociente de lordose. Isso porque ratas do grupo Não-manipuladas–Salina (controle) tem um quociente de lordose muito próximo do valor máximo para o comportamento (próximo de 1). Conseqüentemente, era esperado que a aplicação de urina não elevasse o quociente de lordose no grupo Não-manipuladas-Urina.

A análise da frequência de intromissões realizadas pelos machos durante o comportamento sexual é um parâmetro importante a ser analisado, visto que a estimulação vaginocervical (Adler, 1969; Adler *et al.*, 1970; Bennett *et al.*, 2001), bem como a estimulação feromonal (Mora & Sánchez-Criado, 2004; Tomioka *et al.*, 2005) influenciam o comportamento sexual, além de elevarem a concentração plasmática de progesterona (Bennett *et al.*, 2002). Além disso, em protocolos de repetidos acasalamentos, onde a fêmea ovariectomizada, exposta a uma baixa dose de estradiol é colocada várias vezes consecutivas junto ao macho, ocorre aumento da concentração plasmática de progesterona e elevação da receptividade (Bennett *et al.*, 2001) dependente da ativação de receptores de progesterona (Auger *et al.*, 1997).

Esta elevação da receptividade é influenciada tanto pela estimulação vaginocervical (Rajendren & Moss, 1994; Bennett *et al.*, 2001) como pela estimulação feromonal efetuada pela presença do macho (Rajendren *et al.*, 1990; Rajendren & Moss, 1994), visto que tanto o bloqueio das intromissões como lesões no OVN suprimem a potenciação da receptividade.

A frequência de intromissões realizadas pelos machos nas fêmeas foi menor no grupo Manipuladas-Salina, confirmando dados anteriormente publicados (Gomes *et al.*, 2006a). Assim, estas ratas receberam uma menor estimulação vaginocervical durante a realização do comportamento sexual, o que poderia estar relacionado com a diminuição da concentração plasmática de progesterona após o comportamento sexual em ratas manipuladas. Já no grupo Manipuladas-Urina, a frequência de intromissões não diferiu das ratas do grupo Não-manipuladas, indicando que a sensibilidade feromonal está atuando decisivamente sobre o quociente de lordose, e assim sobre as intromissões.

A exposição à urina não modificou a concentração de estradiol após o comportamento, tanto em ratas Não-manipuladas quanto em ratas manipuladas. Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da manipulação provocando um aumento da concentração de estradiol após o comportamento sexual ($p=0,04$), apesar de o *post-test* não ter detectado diferença entre os grupos. Trabalhos anteriores demonstram que a concentração plasmática de estradiol na tarde do proestro é inferior em ratas manipuladas (Gomes *et al.*, 2005; Raineiki *et al.*, 2008), entretanto, na noite do proestro, esta diferença não persiste. Na noite do proestro, imediatamente

após o comportamento sexual também não há alteração da concentração de estradiol em ratas manipuladas (Gomes *et al.*, 2006a). Esta não correspondência com os dados publicados pode ser atribuída a diferenças nos protocolos, como nas técnicas de dosagem hormonal e a previa intervenção do experimentador durante a aplicação do *spray*.

Neste trabalho, observamos uma tendência à diminuição da concentração de progesterona no grupo Manipuladas-Salina após o comportamento sexual ($p=0,061$). Apesar de trabalhos anteriores demonstrarem que a concentração de progesterona durante a tarde e a noite do proestro não estejam alteradas em ratas manipuladas quando comparadas a ratas não-manipuladas (Gomes *et al.*, 2005), após o comportamento sexual (onde a rata é submetida a estímulos táteis e olfatórios oriundos do macho), ratas manipuladas apresentam menor concentração plasmática de progesterona (Gomes *et al.*, 2006a). Com a aplicação de urina anterior à realização do comportamento sexual, os níveis plasmáticos de progesterona não apresentaram diferença quando comparados aos de ratas não-manipuladas. Assim, a aplicação previa do *spray* contendo urina dos machos pode ter aumentado a sensibilidade aos estímulos do macho, tendo atuado na liberação de progesterona, o que poderia também facilitar o comportamento de lordose.

Apesar de a estimulação feromonal provocar a liberação de progesterona (Mora & Sánchez-Criado, 2004; Gomes *et al.*, não publicados), ratas não-manipuladas expostas à urina antes do comportamento sexual não tiveram alteração na progesterona plasmática quando comparadas à Não-

manipuladas-Salina. Isto porque durante o comportamento sexual, a rata está exposta a estímulos sensoriais olfatórios e táteis realizados pelo macho, o que pode ter levado a um estado de elevação da concentração plasmática de progesterona de tal forma que o efeito da estimulação prévia com a urina de ratos machos pode estar camuflado pelos efeitos destas estimulações durante o comportamento sexual.

Contudo, podemos especular que, em ratas manipuladas expostas à solução salina, as estimulações sensoriais realizadas durante o comportamento sexual provocaram uma tendência à menor liberação de progesterona quando comparadas com ratas não-manipuladas. Já em ratas manipuladas que foram estimuladas com solução de urina previamente ao comportamento sexual, a concentração de progesterona não diferiu do grupo de ratas não-manipuladas.

Assim, através de um estímulo feromonal anterior à realização do comportamento sexual na noite do proestro, foi possível reverter o efeito da manipulação sobre o comportamento sexual, bem como elevar a secreção de progesterona, sendo que esta elevação pode estar envolvida com o mecanismo facilitador do comportamento de lordose nestas ratas. Assim, o sistema de reconhecimento de feromônios em ratas manipuladas, que aparentemente pode estar modificado, possui integridade estrutural e capacidade de resposta para uma super-estimulação com urina de ratos machos.

Conclusões

A manipulação neonatal altera o comportamento sexual de fêmeas, diminuindo quociente de lordose e o número de intromissões recebidas, o que mostra uma deficiência na função reprodutiva provocada pela manipulação. O estímulo com a urina de ratos machos reverte o efeito da manipulação neonatal sobre o quociente de lordose, mostrando que ratas manipuladas respondem à super-estimulação olfatória. Isso mostra que apesar das mudanças estruturais no SNC, foi possível restaurar um comportamento alterado pela manipulação neonatal.

A concentração plasmática de progesterona após o comportamento sexual em ratas manipuladas tende a ser menor que fêmeas não-manipuladas, indicando que ratas manipuladas respondem menos a estímulos realizados pelos machos (táteis e olfatórios), durante a cópula. Ratas manipuladas pré-estimuladas com urina do macho apresentaram concentração plasmática de progesterona após o comportamento sexual iguais as de ratas não-manipuladas, indicando que a estimulação olfatória provocou a liberação de progesterona e pode ter aumentado a sensibilidade aos estímulos do macho. Esta elevação na concentração de progesterona pode estar relacionada com o aumento no quociente de lordose.

Entretanto, apesar da importância em elevar o comportamento sexual das fêmeas manipuladas, a presença de ciclos anovulatórios é o principal

limitante para o sucesso reprodutivo, mesmo que ocorram intromissões e ejaculação dos machos. Desta forma, devemos analisar se outros parâmetros relacionados ao sucesso reprodutivo podem ser restaurados, como as concentrações hormonais de estradiol e LH na tarde do proestro e os ciclos anovulatórios.

Perspectivas

Para compreender melhor como feromônios oriundos de ratos machos atuam na função reprodutiva de ratas manipuladas, algumas questões devem ser verificadas:

- Deve ser realizado um aumento do n amostral para as dosagens hormonais de progesterona;
- Realização de imunohistoquímica para c-fos, para verificar a atividade neuronal em regiões relacionadas à detecção e processamento de informação feromonal, como o bulbo olfatório e a amígdala medial;
- Realização de imunohistoquímica para c-fos, para verificar a atividade neuronal em regiões relacionadas à modulação do comportamento sexual, como o hipotálamo ventromedial;
- Verificar se a exposição prévia em diferentes fases do ciclo estral, ou exposição continuada à urina de machos reverte o quadro de ciclos anovulatórios em fêmeas manipuladas;
- Através de coletas seriadas de plasma, verificar a resposta hormonal (estradiol, progesterona e corticosterona) de ratas expostas à urina durante diversas fases do ciclo estral.

Referências

- ADLER, N. T. *Effects of the male's copulatory behavior on successful pregnancy of the female rat.* **Journal of Comparative and Physiological Psychology** 69(4): 613-622, 1969.
- ADLER, N. T.; RESKO, J. A.; GOY, R. W. *The effect of copulatory behavior on hormonal change in the female rat prior to implantation.* **Physiology & Behavior** 5(9): 1003-1007, 1970.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M. *Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge.* **Brain Research** 767(2): 289-296, 1997.
- AUGER, A. P.; MOFFATT, C. A.; BLAUSTEIN, J. D. *Progesterone-Independent Activation of Rat Brain Progesterone Receptors by Reproductive Stimuli.* **Endocrinology** 138(1): 511-514, 1997.
- BARFIELD, R. J.; RUBIN, B. S.; GLASER, J. H.; DAVIS, P. G. (1983). Sites of action of ovarian hormones in the regulation of oestrous responsiveness in rats. Hormones and behaviour in higher vertebrates. Berlin: Springer-Verlag: 2–17.
- BAXI, K. N.; DORRIES, K. M.; EISTHEN, H. L. *Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones?* **Trends in Neurosciences** 29(1): 1-7, 2006.
- BENNETT, A. L.; BLASBERG, M. E.; BLAUSTEIN, J. D. *Sensory Cues Mediating Mating-Induced Potentiation of Sexual Receptivity in Female Rats.* **Hormones and Behavior** 40(1): 77-83, 2001.
- BENNETT, A. L.; BLASBERG, M. E.; BLAUSTEIN, J. D. *Mating Stimulation Required for Mating-Induced Estrous Abbreviation in Female Rats: Effects of Repeated Testing.* **Hormones and Behavior** 42(2): 206-211, 2002.
- BIAN, X.; YANAGAWA, Y.; CHEN, W. R.; LUO, M. *Cortical-Like Functional Organization of the Pheromone-Processing Circuits in the Medial Amygdala.* **Journal of Neurophysiology** 99(1): 77-86, 2008.
- BRENNAN, P. A.; ZUFALL, F. *Pheromonal communication in vertebrates.* **Nature** 444(7117): 308-315, 2006.
- BRESSLER, S. C.; BAUM, M. J. *Sex comparison of neuronal fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation.* **Neuroscience** 71(4): 1063-1072, 1996.

- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. *Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat.* **Endocrinology** 94(6): 1704-1708, 1974.
- CAMERON, N.; HA, G. K.; ERSKINE, M. S. *Effect of Adrenalectomy on Mating-Induced Prolactin Surges and Pseudopregnancy in the Female Rat.* **Neuroendocrinology** 78(3): 138-146, 2003.
- CAMERON, N.; DEL CORPO, A.; DIORIO, J.; MCALLISTER, K.; SHARMA, S.; MEANEY, M. J. *Maternal Programming of Sexual Behavior and Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Function in the Female Rat.* **PLoS ONE** 3(5): e2210, 2008a.
- CAMERON, N. M.; FISH, E. W.; MEANEY, M. J. *Maternal influences on the sexual behavior and reproductive success of the female rat.* **Hormones and Behavior** 54(1): 178-184, 2008b.
- CAMERON, N. M.; SOEHNGEN, E.; MEANEY, M. J. *Variation in Maternal Care Influences Ventromedial Hypothalamus Activation in the Rat.* **Journal of Neuroendocrinology** 23(5): 393-400, 2011.
- CAMOZZATO, T. S. C. *Alterações morfológicas na área pré-óptica medial, núcleo periventricular anteroventral e amígdala medial pósterodorsal induzidas pela manipulação neonatal.* 2006.
- CAMOZZATO, T. S. C.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; PADILHA, C. B.; MIGUEL, S. P. R.; BONZANINI, L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FERNANDES, M. C.; LUCION, A. B. *Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats.* **Brain Research** 1247: 92-99, 2009.
- CHAMPAGNE, F. A.; WEAVER, I. C. G.; DIORIO, J.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. *Maternal Care Associated with Methylation of the Estrogen Receptor- α 1b Promoter and Estrogen Receptor- α Expression in the Medial Preoptic Area of Female Offspring.* **Endocrinology** 147(6): 2909-2915, 2006.
- DE AZEVEDO, M. S.; DE SOUZA, F. L.; DONADIO, M. V. F.; LUCION, A. B.; GIOVENARDI, M. *Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior.* **Psychology & Neuroscience** 3: 73-78, 2010.
- DEL CERRO, M. C. R. *Role of the vomeronasal input in maternal behavior* **Psychoneuroendocrinology** 23(8): 905-926, 1998.
- DENENBERG, V. H. *Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation.* **Psychological Review** 71(5): 335-351, 1964.
- DONADIO, M. V.; JACOBS, S.; COREZOLA, K. L.; DA SILVA MELO, D. A.; DIAS, H. B.; REICHEL, C. L.; FRANCI, C. R.; JECKEL-NETO, E. A.; LULHIER, F.; LUCION, A. B. *Neonatal handling reduces renal function in adult rats.* **Kidney and Blood Pressure Research** 32(4): 286-292, 2009.
- DONADIO, M. V. F.; GOMES, C. M.; SAGAE, S. C.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. *Angiotensin II receptors are upregulated by estradiol and progesterone in the locus coeruleus, median*

- preoptic nucleus and subfornical organ of ovariectomized rats. Brain Research* 1065(1-2): 47-52, 2005.
- DONADIO, M. V. F.; GOMES, C. M.; SAGAE, S. C.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. *Estradiol and progesterone modulation of angiotensin II receptors in the arcuate nucleus of ovariectomized and lactating rats. Brain Research* 1083(1): 103-109, 2006.
- DORNELLES, R. C. M.; FRANCI, C. R. *Action of AT1 subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. Neuropeptides* 32(1): 51-55, 1998.
- DULAC, C.; TORELLO, A. T. *Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. Nat Rev Neurosci* 4(7): 551-562, 2003.
- ETGEN, A. M.; CHU, H.-P.; FIBER, J. M.; KARKANIAS, G. B.; MORALES, J. M. *Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. Behavioural Brain Research* 105(1): 93-103, 1999.
- FIRESTEIN, S. *How the olfactory system makes sense of scents. Nature* 413(6852): 211-218, 2001.
- FLANAGAN-CATO, L. M.; CALIZO, L. H.; DANIELS, D. *The Synaptic Organization of VMH Neurons That Mediate the Effects of Estrogen on Sexual Behavior. Hormones and Behavior* 40(2): 178-182, 2001.
- FORCELLEDO, M. L.; MORALES, P.; VERA, R.; QUIJADA, S.; CROXATTO, H. B. *Role of ovarian and adrenal progesterone in the regulation of ovum transport in pregnant rats. Biology of Reproduction* 27(5): 1033-1041, 1982.
- FREEMAN, M. E. (2006). *Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. D. N. Jimmy, Ph.D, M. P. Tonyet al. St Louis, Academic Press: 2327-2388.
- GOMES, C. M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. *Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1239-1242, 1999.
- GOMES, C. M.; RAINEKI, C.; DE PAULA, P. R.; SEVERINO, G. S.; HELENA, C. V. V.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. *Neonatal handling and reproductive function in female rats. Journal of Endocrinology* 184(2): 435, 2005.
- GOMES, C. M.; DONADIO, M. V. F.; ANSELMO-FRANCI, J.; FRANCI, C. R.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. *Neonatal handling induces alteration in progesterone secretion after sexual behavior but not in angiotensin II receptor density in the medial amygdala: Implications for reproductive success. Life Sciences* 78(25): 2867-2871, 2006a.
- GOMES, C. M.; DONADIO, M. V. F.; FRANSKOVIKI, I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. *Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. Brain Research* 1067(1): 177-180, 2006b.

- GOMES, C. M.; SOUZA, L. M. D.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B.; FRANCI, C. R. *Male urine exposure activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and olfactory sites in the central nervous system of female rats on proestrous.* não publicados.
- GUERRA-ARAIZA, C.; GÓMORA-ARRATI, P.; GARCÍA-JUÁREZ, M.; ARMENGUAL-VILLEGAS, A.; MIRANDA-MARTÍNEZ, A.; LIMA-HERNÁNDEZ, F. J.; CAMACHO-ARROYO, I.; GONZÁLEZ-FLORES, O. *Role of Progesterone Receptor Isoforms in Female Sexual Behavior Induced by Progestins in Rats.* **Neuroendocrinology** 90(1): 73-81, 2009.
- HAGA, S.; HATTORI, T.; SATO, T.; SATO, K.; MATSUDA, S.; KOBAYAKAWA, R.; SAKANO, H.; YOSHIHARA, Y.; KIKUSUI, T.; TOUHARA, K. *The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor.* **Nature** 466(7302): 118-122, 2010.
- HALEM, H. A.; CHERRY, J. A.; BAUM, M. J. *Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice.* **Journal of Neurobiology** 39(2): 249-263, 1999.
- HALPERN, M.; MARTÍNEZ-MARCOS, A. *Structure and function of the vomeronasal system: an update.* **Progress in Neurobiology** 70(3): 245-318, 2003.
- HERBISON, A. E. *Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons.* **Endocrine Reviews** 19(3): 302, 1998.
- INAMURA, K.; KASHIWAYANAGI, M.; KURIHARA, K. *Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine.* **European Journal of Neuroscience** 11(7): 2254-2260, 1999.
- KARLSON, P.; LUSCHER, M. *'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances.* **Nature** 183(4653): 55-56, 1959.
- KELLER, M.; PIERMAN, S.; DOUHARD, Q.; BAUM, M. J.; BAKKER, J. *The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice.* **European Journal of Neuroscience** 23(2): 521-530, 2006.
- LEUPEN, S. M.; BESECKE, L. M.; LEVINE, J. E. *Neuropeptide Y Y1-receptor stimulation is required for physiological amplification of preovulatory luteinizing hormone surges.* **Endocrinology** 138(7): 2735, 1997.
- LEVINE, S. *Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy.* **Science** 135(3506): 795, 1962.
- LEVINE, S. *The Psychoendocrinology of Stress.* **Annals of the New York Academy of Sciences** 697(1): 61-69, 1993.
- LEVINE, S. *The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. The Influence of Maternal Factors.* **Annals of the New York Academy of Sciences** 746(1): 275-288, 1994.
- LEVINE, S. *Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat.* **Physiology & Behavior** 73(3): 255-260, 2001.

- LÉVY, F.; KELLER, M.; POINDRON, P. *Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior** 46(3): 284-302, 2004.*
- LIN, W.; ARELLANO, J.; SLOTNICK, B.; RESTREPO, D. *Odors Detected by Mice Deficient in Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit A2 Stimulate the Main Olfactory System. **J. Neurosci.** 24(14): 3703-3710, 2004.*
- LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. *Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. **Science** 277(5332): 1659-1662, 1997.*
- LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.; MEANEY, M. *Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology** 12(1): 5-12, 2000.*
- LÓPEZ, H. H.; OLSTER, D. H.; ETTEMBERG, A. *Sexual Motivation in the Male Rat: The Role of Primary Incentives and Copulatory Experience. **Hormones and Behavior** 36(2): 176-185, 1999.*
- LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M.; WINKELMAN, E. C.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A. *Neonatal Handling Reduces the Number of Cells in the Locus Coeruleus of Rats. **Behavioral neuroscience** 117(5): 894-903, 2003.*
- LUO, M.; FEE, M. S.; KATZ, L. C. *Encoding Pheromonal Signals in the Accessory Olfactory Bulb of Behaving Mice. **Science** 299(5610): 1196-1201, 2003.*
- MADRUGA, C.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. *Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. **Behavioural Brain Research** 166(2): 241-246, 2006.*
- MAEDA, K.-I.; OHKURA, S.; UENOYAMA, Y.; WAKABAYASHI, Y.; OKA, Y.; TSUKAMURA, H.; OKAMURA, H. *Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. **Brain Research** 1364: 103-115, 2010.*
- MAFFUCCI, J. A.; GORE, A. C. *Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. **International review of cell and molecular biology** 274: 69- 127, 2009.*
- MATTHEWS JR, M.; KENYON, R. *Four-versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. **Physiology & Behavior** 33(1): 65-67, 1984.*
- MAZZUCCO, C. A.; WALKER, H. A.; PAWLUSKI, J. L.; LIEBLICH, S. E.; GALEA, L. A. M. *ER[alpha], but not ER[beta], mediates the expression of sexual behavior in the female rat. **Behavioural Brain Research** 191(1): 111-117, 2008.*
- MCCANN, S.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V.; YU, W. *The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. **Current pharmaceutical design** 9(5): 381-390, 2003.*

- MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H.; BODNOFF, S. R.; INY, L. J.; TATAREWICZ, J. E.; SAPOLSKY, R. M. *Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions.* **Behavioral neuroscience** 99(4): 765-770, 1985.
- MEANEY, M. J. *Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations.* **Annual Review of Neuroscience** 24(1): 1161-1192, 2001.
- MEERLO, P.; HORVATH, K. M.; NAGY, G. M.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J. M. *The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity.* **Journal of Neuroendocrinology** 11(12): 925-933, 1999.
- MORA, O. A.; CABRERA, M. M. *Pheromonal male-induced diestrus and cyclicity in aging intact and young estrogenized female rats.* **Biology of Reproduction** 50(3): 603, 1994.
- MORA, O. A.; CABRERA, M. M.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. *Hormonal pattern of the pheromonal restoration of cyclic activity in aging irregularly cycling and persistent-estrus female rats.* **Biology of Reproduction** 51(5): 920-925, 1994.
- MORA, O. A.; CABRERA, M. M. *The pheromonal restoration of cyclic activity in young estrogenized persistent estrus female rats is a vomeronasal effect.* **Life Sciences** 60(7): 493-498, 1997.
- MORA, O. A.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. *Effect of Adrenergic Blockade on the Pheromonal Restoration of Cyclic Activity in Young Oestrogen-Primed Persistent Oestrous Female Rats.* **Journal of Neuroendocrinology** 14(3): 200-206, 2002.
- MORA, O. A.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. *Involvement of the corticoadrenal hormones in the pheromonal restoration of reproductive activity in aging rats.* **Life Sciences** 74(26): 3285-3290, 2004.
- NANCE, D. M.; SHRYNE, J.; GORSKI, R. A. *Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones.* **Hormones and Behavior** 6(1): 59-64, 1975.
- PADOIN, M. J.; CADORE, L. P.; GOMES, C. M.; BARROS, H. M. T.; LUCION, A. B. *Long-Lasting Effects of Neonatal Stimulation on the Behavior of Rats.* **Behavioral neuroscience** 115(6): 1332-1340, 2001.
- PANAGIOTAROPOULOS, T.; PAPAIOANNOU, A.; PONDIKI, S.; PROKOPIOU, A.; STYLIANOPOULOU, F.; GEROZISSIS, K. *Effect of Neonatal Handling and Sex on Basal and Chronic Stress-Induced Corticosterone and Leptin Secretion.* **Neuroendocrinology** 79(2): 109-118, 2004.
- PAPAIOANNOU, A.; DAFNI, U.; ALIKARIDIS, F.; BOLARIS, S.; STYLIANOPOULOU, F. *Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain.* **Neuroscience** 114(1): 195-206, 2002.
- PFSAFF, D. W. (1980). Estrogens and brain function: Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior, Springer-Verlag New York.

- PFAFF, D. W.; SCHWANZEL-FUKUDA, M.; PARHAR, I. S.; LAUBER, A. H.; MCCARTHY, L. M.; KOW, L. M. *GnRH neurons and other cellular and molecular mechanisms for simple mammalian reproductive behaviors. Recent progress in hormone research* 49: 1, 1994.
- PFAFF, D. W.; SAKUMA, Y.; KOW, L. M.; LEE, A. W. L.; EASTON, A. (2006). Hormonal, Neural, and Genomic Mechanisms for Female Reproductive Behaviors, Motivation, and Arousal. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). D. N. Jimmy, Ph.D, M. P. Tonyet al. St Louis, Academic Press: 1825-1920.
- PFAFF, D. W.; KOW, L. M.; LOOSE, M. D.; FLANAGAN-CATO, L. M. *Reverse engineering the lordosis behavior circuit. Hormones and Behavior* 54(3): 347-354, 2008.
- PFAUS, J. G.; MARCANGIONE, C.; SMITH, W. J.; MANITT, C.; ABILLAMAA, H. *Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. Brain Research* 741(1-2): 314-330, 1996.
- PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. *Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. Molecular Brain Research* 18(3): 195-200, 1993.
- PRO-SISTIAGA, P.; MOHEDANO-MORIANO, A.; UBEDA-BAÑÓN, I.; DEL MAR, A. J. M.; MARCOS, P.; ARTACHO-PÉRULA, E.; CRESPO, C.; INSAUSTI, R.; MARTINEZ-MARCOS, A. *Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. The Journal of Comparative Neurology* 504(4): 346-362, 2007.
- QUADROS, P. S.; WAGNER, C. K. *Regulation of Progesterone Receptor Expression by Estradiol Is Dependent on Age, Sex and Region in the Rat Brain. Endocrinology* 149(6): 3054-3061, 2008.
- RAINEKI, C. (2006). Manipulação neonatal, aprendizado olfatório e reprodução em ratos. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia., Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RAINEKI, C.; SZAWKA, R. E.; GOMES, C. M.; LUCION, M. K.; BARP, J.; BELLÓ-KLEIN, A.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. *Effects of Neonatal Handling on Central Noradrenergic and Nitric Oxidergic Systems and Reproductive Parameters in Female Rats. Neuroendocrinology* 87(3): 151-159, 2008.
- RAINEKI, C.; DE SOUZA, M. A.; SZAWKA, R. E.; LUTZ, M. L.; DE VASCONCELLOS, L. F. T.; SANVITTO, G. L.; IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; CAMMAROTA, M.; LUCION, A. B. *Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. Neuroscience* 159(1): 31-38, 2009.
- RAJENDREN, G.; DUDLEY, C. A.; MOSS, R. L. *Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. Neuroendocrinology* 52(4): 368-372, 1990.

- RAJENDREN, G.; DUDLEY, C. A.; MOSS, R. L. *Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats.* **Physiology & Behavior** 50(4): 705-710, 1991.
- RAJENDREN, G.; MOSS, R. L. *The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system.* **Brain Research** 617(1): 81-86, 1993.
- RAJENDREN, G. V.; MOSS, R. L. *Vomeronasal organ-mediated induction of fos in the central accessory olfactory pathways in repetitively mated female rats.* **Brain Research Bulletin** 34(1): 53-59, 1994.
- REKWOT, P. I.; OGWU, D.; OYEDIPE, E. O.; SEKONI, V. O. *The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction.* **Animal Reproduction Science** 65(3-4): 157-170, 2001.
- RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A. M.; SCHAEFER, M. L.; LIN, W. *Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice.* **Hormones and Behavior** 46(3): 247-256, 2004.
- RETTORI, V.; BELOVA, N.; DEES, W. L.; NYBERG, C. L.; GIMENO, M.; MCCANN, S. M. *Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90(21): 10130, 1993.
- RICE, D.; BARONE JR, S. *Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models.* **Environmental Health Perspectives** 108(Suppl 3): 511, 2000.
- SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. *Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period.* **Brain Research Reviews** 11(1): 65-76, 1986.
- SEVERINO, G. S.; FOSSATI, I. A. M.; PADOIN, M. J.; GOMES, C. M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. *Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females.* **Physiology & behavior** 81(3): 489-498, 2004.
- SHIPLEY, M. T.; ENNIS, M.; PUCHE, A. C. (2004). *Olfactory System.* The Rat Nervous System (Third Edition). G. Paxinos. Burlington, Academic Press: 923-964.
- SIMERLY, R. B. (2004). *Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration.* The Rat Nervous System (Third Edition). G. Paxinos. Burlington, Academic Press: 335-368.
- SISK, C. L.; FOSTER, D. L. *The neural basis of puberty and adolescence.* **Nat Neurosci** 7(10): 1040-1047, 2004.
- SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. *The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin,*

Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy. **Endocrinology** 96(1): 219-226, 1975.

STEELE, M. K. *The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion.* **Trends in Endocrinology & Metabolism** 3(8): 295-301, 1992.

THOMPSON, E. L.; MURPHY, K. G. *Modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by selective ligands of the KISS1R.* **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)** 11(4): 432, 2010.

TIRINDELLI, R.; DIBATTISTA, M.; PIFFERI, S.; MENINI, A. *From Pheromones to Behavior.* **Physiological Reviews** 89(3): 921-956, 2009.

TODESCHIN, A. S.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; JACOB, M. H. V.; ARANDA, B. C. C.; JACOBS, S.; FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. F. M.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. *Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats.* **Hormones and Behavior** 56(1): 93-100, 2009.

TOMIOKA, M.; MURAYAMA, T.; KASHIWAYANAGI, M. *Increases in plasma concentration of progesterone by protease-sensitive urinary pheromones in female rats.* **Biological & pharmaceutical bulletin** 28(9): 1770-1772, 2005.

TOUHARA, K.; VOSSHALL, L. B. *Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors.* **Annual Review of Physiology** 71(1): 307-332, 2009.

TSUJIKAWA, K.; KASHIWAYANAGI, M. *Protease-Sensitive Urinary Pheromones Induce Region-Specific Fos-Expression in Rat Accessory Olfactory Bulb.* **Biochemical and Biophysical Research Communications** 260(1): 222-224, 1999.

VANDENBERGH, J. G. (2006). Pheromones and mammalian reproduction. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). D. N. Jimmy, Ph.D, M. P. Tonyet al. St Louis, Academic Press: 2041-2058.

WINKELMANN-DUARTE, E. C.; TODESCHIN, A. S.; FERNANDES, M. C.; BITTENCOURT, L. C.; PEREIRA, G. A. M.; SAMIOS, V. N.; SCHUH, A. F. S.; ACHAVAL, M. E.; XAVIER, L. L.; SANVITTO, G. L.; 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.

WYSOCKI, C. J.; WELLINGTON, J. L.; BEAUCHAMP, G. K. *Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ.* **Science** 207(4432): 781, 1980.

YAMAGUCHI, T.; INAMURA, K.; KASHIWAYANAGI, M. *Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat.* **Brain Research** 876(1-2): 211-214, 2000.