



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

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A ATIVIDADE
SEROTONÉRGICA , NORADRENÉRGICA E FOSFORILAÇÃO DO CREB NO
BULBO OLFATÓRIO DE FILHOTES DE RATOS**

Marcelo Alves de Souza

Porto Alegre – 2008



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

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A ATIVIDADE
SEROTONÉRGICA , NORADRENÉRGICA E FOSFORILAÇÃO DO CREB NO
BULBO OLFATÓRIO DE FILHOTES DE RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Porto Alegre – 2008

*“Ando de vagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais...
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe... e só levo a certeza de que muito pouco
eu sei... ou nada sei...” Renato Teixeira.*

“À minha família”

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a **Deus** por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer a cada dia que a vida é feita de alegrias, mas também de dificuldades, e que podemos contar com ele para as duas coisas.

Ao meu orientador **Professor Dr. Aldo Bolten Lucion** pelos ensinamentos, confiança, dedicação, paciência e preocupação com relação à minha orientação.

Aos professores **Dr. Martin Cammarota, Dr. Ivan Izquierdo e Dra. Lia Bevilaqua** do Centro de Memória da PUC, por disponibilizar seu laboratório cujo apoio e contribuição foram de fundamental importância para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao pós-doutorando **Raphael Szawka** do **Laboratório de Neuroendocrinologia da USP-RP** por contribuir para a realização experimental das dosagens.

Aos meus pais **Ercy Alves de Souza & Maria José Carlota de Souza**, por toda a ajuda, educação, sempre acreditando no meu trabalho e no meu esforço. E que apesar da distância de pouco mais 2 mil quilômetros, tenho certeza que momentos de incentivo e compreensão nunca falharam pela parte de vocês.

Às minhas irmãs **Elizângela, Elaine e Eliane** pela **atenção**, ajuda e principalmente carinho nas horas de momentos difíceis.

A **Li**, pela conquista do seu carinho, por ter me aceitado na sua vida, cujo apoio, paciência e amor tem sido parte importante dessa travessia.

Aos meus grandes amigos **Osni e Rosana** pela força, amizade e motivação nas horas de desabafos fora do laboratório. “Vocês fazem muita falta”.

Aos colegas de laboratório **Anelise, Fabi, Marcinha, Natália, Charlis, Maiara, Vanise, Ana Lúcia, Bruno, Marcelo Herberts, Silvana, Marcel, Ana Raquel, Ximena, Camila, Thiago, Caroline e Karin** pela atenção e bons momentos vividos durante esse período.

Aos meus grandes amigos e colegas do Centro de Memória (PUC) **Juliana Bonini, Weber, Janine, Jô, Ramon e Júlia** pela amizade, e auxílio enquanto estive trabalhando com vocês.

Ao **Fernando**, pela ajuda, amizade e companheirismo durante esse período”.

À bioterista **Ângela** pelo cuidado e compromisso com os animais durante a realização do trabalho.

Às secretárias da Pós-Graduação **Uira, Alice, Fabiana e Andréia** sempre atenciosas prestativas para com os nossos problemas.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia** por fazer parte dessa instituição.

Ao **CNPQ e FAPESP** por tornar viável economicamente a realização todos os experimentos do meu trabalho

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Relação mãe-filhote.....	11
1.2 Aprendizado olfatório.....	13
1.3 Aprendizado olfatório e NA	14
1.4 Via noradrenalina/CREB.....	16
1.5. Aprendizado Olfatório e 5-HT	18
1.6 Manipulação neonatal e Aprendizado Olfatório.....	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVO	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Experimento I.....	24
4.2 Experimento II.....	26
4.3 Experimento III	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Participação da noradrenalina na preferência olfatória de filhotes machos e fêmeas manipulados no período neonatal.....	32
6.2 Participação de 5-HT na preferência olfatória de filhotes machos e fêmeas manipulados no período neonatal	34
6.3 Conteúdo de CREB e CREBp no bulbo de filhotes machos.....	36
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO.....	43
9. REFERÊNCIAS	44
10. ANEXO.....	57
10.1 ARTIGO	58
Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups.....	58
Charlis Rainecki, ^a Marcelo Alves de Souza ^a , Raphael Escorsim Szawka, ^b Maiara Lenise Lutz, ^a Luiz Felipe Teer de Vasconcellos, ^a Gilberto Luiz Sanvitto, ^a Iván Izquierdo, ^c Lia Rejane Muller Bevilaqua, ^d Martín Cammarota, ^c and Aldo Bolten Lucion ^{a*}	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO	14
Figura 2. Foto ilustrativa do protocolo de manipulação neonatal	25
Figura 3. Esquema funcional do HPLC-ED	28
Figura 4. Conteúdo de NA, MHPG e MHPG/NA.....	33
Figura 5. Conteúdo de 5-HT, 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT	35
Figura 6. Conteúdo de CREB e CREBp.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** - Análise de Variância
- APOM** - Área pré-óptica medial
- BO** - Bulbo Olfatório
- CBP** - Proteína ligante ao CREB
- CRE** - Elemento responsivo ao AMPc
- CREB** - Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
- DHBA** - 3,4-dihydroxybenzylamine hydromide
- ECL** - Western blotting analysis system
- EDTA** - Ácido etilenodiamino-tetraacético
- EGTA** - Ácido etileniglicol-tetraacético
- 5-HT** - Serotonina
- 5-HIAA** - Ácido 5-hidroxiindoleacético
- HPLC-ED** - Cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica
- LC** - *locus coeruleus*
- L-NMMA** - N-mono-metil-L-arginina
- MCID** - Sistema de Análise de Imagem
- MHPG** - 3-Metoxi-4-Hidroxifeniletilenoglocol
- MR** - Manipulação repetida
- MU** - Manipulação única
- NA** - Noradrenalina
- NM** - Não-manipulado
- pCREB** - Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc fosforilado
- PKA** - proteína quinase dependente de AMPc
- PVDF** - Fluoreto de Polivinilidil
- PVN** - Núcleo paraventricular
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- TTBS** - Solução tampão fosfato tween

RESUMO

O Reconhecimento do odor maternal é fundamental para a sobrevivência de filhotes altriciais como os ratos, pois eles dependem da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e alimentação. Essa identificação da mãe nos primeiros dias de vida do filhote ocorre através do paradigma do aprendizado olfatório, que se dá pelo pareamento do cuidado maternal (estímulo tátil ou estímulo incondicionado) com o cheiro da mãe (estímulo condicionado). Esse estímulo tátil, aplicado pela mãe, atua sobre o *locus coeruleus* que emite uma projeção para o bulbo olfatório, promovendo a liberação de noradrenalina que resulta na fosforilação do fator de transcrição CREB (“Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc”). A fosforilação dessa proteína é o passo fundamental para a formação do aprendizado olfatório. O envolvimento da 5-HT nesse tipo de memória ainda não está bem esclarecido, mas postula-se que sua participação seria sinérgica a NA induzindo a fosforilação do CREB. Dessa forma, a manipulação neonatal que se caracteriza como um estímulo tátil induz por si só um aumento do comportamento maternal. Esse estímulo aparentemente não nocivo em ratos é capaz de interferir em filhotes fêmeas na preferência do odor materno, devido a alteração na via NA/CREB. Assim, o presente trabalho procurou analisar os efeitos da manipulação repetida sobre os níveis de fosforilação de CREB, NA e 5-HT no bulbo olfatório de filhotes aos sete dias de idade. Os resultados mostraram no bulbo olfatório dos filhotes machos um aumento da atividade 5-HT. Enquanto em ambos os sexos foi verificada uma redução *turnover* de NA. Assim, a redução da atividade noradrenérgica causada pelo procedimento de manipulação repetida, talvez seja a causa de possíveis alterações comportamentais e neuroendócrinas verificadas na relação mãe-filhote e na vida adulta.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relação mãe-filhote

Em mamíferos como roedores, primatas e humanos, a mãe é a fonte que garante proteção, temperatura ideal e nutrição para seus filhotes. Além dessa dependência, existe uma complexa interação entre mãe e filhote. Sendo essa relação pela mãe, mantida por estímulos visuais, olfatórios e auditivos relacionados à ninhada durante o desenvolvimento pós-natal (PRYCE & FELDON, 2001).

Filhotes de ratos, assim como a maior parte dos roedores nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, estímulos sonoros e visuais, praticamente inativos com relação à atividade locomotora e regulação da sua própria temperatura. A mãe por sua vez, próximo à data do parto inicia uma sequência de mudanças comportamentais que visa receber adequadamente os filhotes. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na região mamária e, alguns dias antes do parto, constroe o ninho com substrato disponível para acomodar a ninhada (TODESCHINI, 2002).

Após o parto, a rata lactante se destina a manter uma série de comportamentos com seus filhotes, sendo muitos cuidados ocorrendo a partir de estímulos originados pelos próprios filhotes. Dessa forma, a mãe fica a maior parte do tempo sobre os mesmos para assim mantê-los aquecidos (GROTA & ADER, 1969). Além de manter-se numa postura arqueada, o que faz com que as mamas fiquem mais expostas e facilite a ejeção do leite pelo estímulo de sucção (STERN & JOHNSON, 1990). No teste de comportamento maternal de lactantes com filhotes mortos e vivos, STERN & JOHNSON (1990), observaram que os filhotes neonatos

devem estar quentes, serem ativos e emitirem vocalização para que suas mães apresentem uma postura cifótica de amamentação.

As variações no cuidado maternal têm sido utilizadas como uma influência crítica no desenvolvimento do indivíduo. Em ratos, as variações no comportamento maternal, particularmente as variações no comportamento de lambar e limpar (licking/grooming) dos filhotes são os responsáveis por regular o desenvolvimento das respostas endócrinas, emocionais e cognitivas relacionadas ao estresse (MACRI et al., 2004; CHAMPAGNE et al., 2003; PRYCE et al., 2000; CALDJI et al., 2000; LIU et al., 1997; PLOTSKY & MEANEY, 1993).

O comportamento de lambar os filhotes é um importante estímulo tátil que pode influenciar no desenvolvimento social de fêmeas e machos quando adultos (BIRKE & SADLER, 1987; MOORE, 1992), além de possibilitar um comprometimento do comportamento maternal futuro, pois fêmeas que no período neonatal receberam maior quantidade de lambidas ficarão mais tempo com os filhotes e cuidarão mais destes quando forem mães (FRANCIS et al., 1999).

O comportamento maternal nos ratos ocorre com maior frequência nos primeiros dez dias após o parto (GROTA & ADER, 1969; 1975) principalmente na fase clara nas primeiras horas do dia (CHAMPAGNE et al., 2003) e diminui a partir daí. Depois de duas semanas após o nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame (REISBICK et al., 1975), que ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida.

Assim, esse cuidado dado pela mãe nos primeiros dias de vida é considerado um fator crítico para o desenvolvimento. Certos tipos de intervenções que visam estudar as

conseqüências da quebra dessa relação, já vêm sendo estudados atualmente, pois os mecanismos que medeiam essa atração ainda não estão esclarecidos.

1.2 Aprendizado olfatório

Após o nascimento, a identificação da mãe pelo filhote é uma característica essencial para um desenvolvimento normal do mesmo além de sua sobrevivência. Durante esse período, a dependência de ratos neonatos com relação às necessidades básicas do início da vida, está inteiramente ligada a sua mãe. O olfato atua de maneira crítica na mediação dessa atração mãe-filhote, pois o reconhecimento da mãe pelo filhote nos primeiros dias pós-parto ocorre pelo aprendizado olfatório (LEON 1998, SULLIVAN et al., 1989).

Em outros tipos de mamíferos, assim como em ratos o aprendizado olfatório ocorre pelo paradigma do condicionamento clássico, onde o pareamento do cuidado maternal (estímulo incondicionado) é associado com o cheiro da mãe (estímulo condicionado) (SULLIVAN 2003, LEON 1998).

Com o objetivo de verificar essa hipótese (SULLIVAN et al., 1991) mostrou que em filhotes de ratos o cuidado maternal pode ser ainda substituído pela estimulação tátil, que é realizado com o auxílio de um pincel, que visa mimetizar o comportamento de lambidas da mãe. Assim, quando estímulos aplicados no filhote com o pincel ao ser pareado com um novo odor, o filhote aprende a ter preferência por esse novo cheiro.

Como as lambidas da mãe, a estimulação tátil utilizando um pincel promove um aumento da atividade elétrica no principal núcleo noradrenérgico do SNC, o *locus coeruleus* (NAKAMURA et al., 1987). Este núcleo no período sensível, ou seja, do dia primeiro ao nono dia de vida em ratos libera enormes quantidades de noradrenalina para diversas regiões

do cérebro quando comparado com ratos neonatos após esse período (WINZER-SERHAN & LESLIC, 1999).

Como mostra a (fig. 1), uma das áreas que recebe densa projeção noradrenérgica do *locus coeruleos* é o bulbo olfatório (SULLIVAN et al., 2003).

Acredita-se que mudanças no amadurecimento do *locus coeruleos* provocadas pelo aparecimento de certos tipos de receptores ou auto-receptores adrenérgicos, determina o padrão de hiperatividade dessa estrutura e ao mesmo tempo da preferência ao aprendizado de um novo odor (SULLIVAN et al., 2003).



Figura 1. Representação esquemática da via noradrenérgica do LC para o BO. Para o filhote aprender a ter preferência por um odor é necessário o pareamento deste odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003).

1.3 Aprendizado olfatório e NA

A noradrenalina exerce uma ampla variedade de efeitos sobre a fisiologia animal. Como neurotransmissor desempenha diversos papéis no SNC, além de estar envolvida em uma gama de funções como: regulação do ciclo do sono, comportamento alimentar,

agressividade, variações de humor e modulação dos processos ligados à formação de memória (GIBBS & SUMMERS, 2004).

A noradrenalina do cérebro pode potencialmente agir sobre nove diferentes subtipos de receptores e produzir diferentes tipos de efeitos. Vários tipos celulares contêm receptores para esse neurotransmissor, entre eles, os astrócitos, as células gliais e as células endoteliais. Esses adrenoceptores podem ser classificados dentro de três subclasses: α -1; α -2; e os β -receptores. Cada um possuindo três subtipos e todos presentes no cérebro (GIBBS & SUMMERS, 2004).

No bulbo olfatório de ratos neonatos durante as duas primeiras semanas de vida, receptores do tipo α -1 e β -1 adrenérgicos já estão funcionais (MCLEAN & SHIPLEY, 1991). Essa região em resposta a liberação de noradrenalina do *locus coeruleus*, atua de maneira a manter respostas necessárias e prolongadas para a aquisição da preferência ao odor nas células mitrais (WILSON & SULLIVAN, 1991). Dessa maneira, o desempenho deste neurotransmissor parece particularmente ter um importante papel na indução do aprendizado e plasticidade neural durante o início do desenvolvimento (MCLEAN et al., 1999, YUAN et al., 2003).

Através de experimentos, SULLIVAN *et al.*, (1994) demonstraram que lesão bilateral no *locus coeruleus* com 6-OHDA em ratos neonatos faz com que haja uma redução do conteúdo de noradrenalina no bulbo olfatório desses animais, impedindo que os mesmos aprendam a ter preferência por um determinado odor. Assim, a liberação de noradrenalina por meio de projeções desse núcleo é extremamente necessária para a formação do vínculo mãe-filhote nos primeiros dias de vida.

1.4 Via noradrenalina/CREB

A noradrenalina liberada do LC pela estimulação tátil age no bulbo olfatório via β -adrenoceptores (WILSON & SULLIVAN, 1994; LANGDON et al., 1997; YUAN et al., 2000). Trabalhos realizados por LANGDON (1997) injetando um agonista β -adrenérgico (isoproterenol) no bulbo olfatório de ratos neonatos e pareando a um novo odor, verificou que esse agonista também consegue promover a indução da preferência olfatória dos filhotes, substituindo dessa forma o estímulo das pinceladas..

SULLIVAN (1989) e YUAN (2000) mostraram ainda que para haver a preferência ou o aprendizado para um determinado cheiro, a liberação de noradrenalina no bulbo olfatório tem que exibir-se em concentrações ideais. Isso foi comprovado quando doses do agonista β -adrenérgico (isoproterenol) era aplicado no bulbo de ratos neonatos em diferentes concentrações. Em seguida, os filhotes eram submetidos ao teste de preferência olfatória utilizando o pareamento com um determinado odor. Segundo SULLIVAN (1991) e LANGDON (1997) as doses do agonista β -adrenérgico (isoproterenol) quando aplicado no filhote momentos antes do teste, apresentava um perfil de curva em “U” invertida. Assim, doses muito baixas ou doses altas eram ineficazes na indução do aprendizado. Enquanto doses moderadas resultavam numa preferência efetiva pelo novo cheiro.

A ativação de receptores adrenérgicos no bulbo olfatório (estímulo incondicionado) é o sinal necessário para o início do processo de fosforilação do fator de transcrição CREB (“cyclic AMP responsive element binding protein”), (MCLEAN et al., 1999). Diversas pesquisas já têm relatado a participação do CREB na regulação de uma variedade de funções biológicas, incluindo eventos de sinalização intracelular, proliferação da pituitária

(STRUTHERS et al., 1991), diferenciação sexual do SNC (AUGER et al., 2001) e modulação dos processos relacionados ao aprendizado e memória (Cammarota et al., 2000).

A proteína CREB faz parte da família de fatores de transcrição denominada de CREB/ATF, que incluem no mínimo dez produtos gênicos distintos. A ativação transcricional mediada por CREB depende da presença de uma proteína nuclear denominada CBP (“CREB Binding protein”). A ligação de CBP especificamente à forma fosforilada do CREB, permite assim o início do processo da transcrição de determinados genes (CHRIVIA et al., 1993, SILVA et al., 1998).

A cascata de eventos pelo qual o CREB é recrutado durante o aprendizado não têm sido bem esclarecida. Pois, sua regulação é modulada por uma ampla variedade de sinais extracelulares (GIBBS & SUMMERS, 2004). Acredita-se que exposições diretas a neurotransmissores possam gerar um aumento da concentração de AMPc permitindo que a subunidade catalítica da proteína Kinase A transloque para o núcleo. No núcleo a “Kinase A” atua fosforilando inúmeros fatores, entre eles a proteína CREB no sítio (serina 133). Após a ativação da mesma, ela se liga a regiões promotoras e induz a transcrição de genes imediatos (MCLEAN et al., 1999).

Os produtos protéicos desses genes atuam ativando a transcrição de genes de resposta mais tardia relacionados à proliferação celular. Levando a mudanças que envolvem processos ligados a plasticidade neuronal. Assim, a fosforilação dessa proteína pode ser um passo inicial para o desenvolvimento de formação de memória a longo - prazo (MCLEAN et al., 1999).

Os primeiros estudos que mostraram o papel crítico do CREB nos processos de formação de memória foram conduzidos em *Aplysia* e *Drosophila*. Subseqüentemente estudos mais recentes estão incluindo outras espécies de vertebrados, em particular, ratos e camundongos (GIBBS & SUMMERS, 2004). Além da participação do CREB nos processos

ligados ao aprendizado e memória em ratos adultos, a fosforilação dessa proteína está envolvida na indução da preferência olfatória de ratos neonatos. Pois, trabalhos realizados por MCLEAN (1999), mostram que filhotes aos seis dias de idade submetidos ao teste do condicionamento de preferência olfatória, apresentam após dez minutos de teste um aumento dos níveis da fosforilação da proteína CREB comparado com filhotes controle. Revelando ser a ativação desse fator um dos passos iniciais para a formação desse tipo de aprendizado/preferência em ratos neonatos.

1.5. Aprendizado Olfatório e 5-HT

A serotonina (5-HT) ocupa um lugar de destaque entre os diferentes tipos de neurotransmissores. Por estar relacionada com numerosas funções fisiológicas, incluindo a ingestão alimentar, termorregulação, regulação do ciclo circadiano, locomoção, comportamento sexual, vigília, nocicepção e migração neuronal, está também envolvida em muitas doenças psiquiátricas como a depressão, ansiedade, agressividade e déficits de memória, (WILKINSON & DOURISH, 1991; PARENT *et al.*, 1981; SARI, 2004).

O sistema serotoninérgico contém um limitado, mas bem definido número de células (OLIVIER & OORSCHOT, 2005). Os corpos celulares (soma) dos neurônios serotoninérgicos estão localizados principalmente na região do tronco cerebral, mais especificamente nos núcleos da rafe, e se projetam para todas as regiões encefálicas (PARENT, DESCARRIES & BEAUDET, 1981; STEINBUSCH, 1981).

A multiplicidade de funções fisiológicas e comportamentais nas quais a serotonina está envolvida se deve em parte, a sua larga distribuição no sistema nervoso central (SNC) e

pela sua diversidade de receptores (SARI, 2004). Mais de 14 subtipos de receptores serotoninérgicos têm sido determinados por técnicas moleculares e farmacológicas, sendo classificados em 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, (citado anteriormente), 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆, e 5-HT₇.

Entre as várias fibras serotoninérgicas que se originam dos núcleos da rafe, muitas delas se dirigem para o bulbo olfatório (ANAREDA et al., 1980). Estas fibras mostram uma distribuição laminar específica dentro do bulbo inervando preferencialmente a camada glomerular (MCLEAN & SHIPLEY, 1987).

O papel da serotonina na olfação tem permanecido obscuro, apesar do fato de haver no bulbo olfatório uma densa inervação serotoninérgica (McLean et al., 1996). Todavia, estudos têm relacionado o envolvimento da função serotoninérgica no bulbo com paradigma do condicionamento de preferência olfatória em ratos neonatos durante o desenvolvimento pós-natal (MCLEAN et al., 1993).

Experimentos comportamentais mostram ainda que a diminuição na capacidade de aprendizado de ratos neonatos durante testes de preferência a um determinado odor, resulta na falta de 5-HT dentro do bulbo olfatório (MCLEAN et al., 1993). Segundo MCLEAN (1996) outra forma de afetar o condicionamento da preferência olfatória de filhotes neonatos seria o bloqueio de receptores 5-HT₂ com o antagonista “ritanserin”. Indicando dessa forma o envolvimento do sistema serotoninérgico na aquisição de um novo odor.

HARLEY & MCLEAN (2006) mostraram que em adição ao circuito básico *locus coeruleus* - bulbo olfatório, uma importante interação ocorre ente a noradrenalina e a serotonina dentro do bulbo olfatório durante o aprendizado olfatório (LANGDON et al., 1997). Agindo sobre β -receptores, o isoproterenol (agonista noradrenérgico) mostra um efeito de uma curva dose resposta em “U” invertida para tal aprendizado. Pesquisas têm

previamente demonstrado que essa curva dose resposta do isoproterenol, pode ser alterada com manipulações da atividade serotoninérgica no bulbo olfatório (SULLIVAN & WILSON, 2003). Além disso, lesões de fibras 5-HT dentro do bulbo mostraram desviar a curva de isoproterenol para a direita, onde altas doses desse agonista são requeridas para garantir o aprendizado. Enquanto agonistas dos receptores 5-HT_{2A/2C} podem mudar a curva para a esquerda. Mostrando possivelmente um papel fundamental desses receptores no condicionamento do aprendizado olfatório (SULLIVAN & WILSON, 2003).

É possível que ações de ambas as entradas serotoninérgicas e noradrenérgicas e/ou interneurônios para o bulbo olfatório, possam participar sinergicamente na indução da fosforilação do CREB facilitando o processo do aprendizado. Acredita-se por fim que o processo de ativação do CREB pela interação 5-HT/NA, seja mediado pela elevação dos níveis de AMPc nas células mitrais no bulbo olfatório (MCLEAN et al., 1999)

1.6 Manipulação neonatal e Aprendizado Olfatório

A estimulação neonatal é um modelo experimental utilizado para examinar os mecanismos pelos quais variações no ambiente no início da vida podem afetar o desenvolvimento do Sistema Nervoso, dando origem a diversas alterações (LIU et al., 1997).

Em ratos, a manipulação neonatal consiste tipicamente em “manipular” os animais por alguns minutos, em geral durante as duas primeiras semanas de vida. Esse procedimento, aparentemente não nocivo ao indivíduo, tem com conseqüência, na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo a ambientes novos (DENEMBERG 1964; MEANEY et al., 1996; PADOIN et al., 2001). No entanto, nós temos demonstrado recentemente que a manipulação

neonatal, um estímulo aparentemente inofensivo, está relacionada a uma diminuição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas (PADOIN et al., 2001; GOMES et al., 1999). Além disso, aquela intervenção logo após o nascimento está inteiramente relacionada a uma significativa diminuição da ovulação, sendo que a maioria das fêmeas estudadas tem ciclos anovulatórios (GOMES et al., 1999).

Sabe-se ainda que animais manipulados quando adultos tem um resposta atenuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal quando expostos a estímulos estressores, comparados a ratos controle que não foram manipulados. Ou seja, ratos machos e fêmeas manipulados na infância, apresentam uma secreção de corticosterona (MEANEY et al., 1993; SEVERINO et al., 2001) e prolactina menor do que animais não manipulados frente a novos estímulos estressantes. Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não-manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do Sistema Nervoso Central ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (LEVINE, 1994).

Estudos demonstram ainda que ratos adultos manipulados precocemente apresentam uma maior densidade de receptores para glicocorticóides no hipocampo (MEANEY et al., 1993). Postula-se que esta seria a causa das diferenças entre animais estimulados e não estimulados durante a infância e submetidos a situações estressoras na vida adulta.

Além da estimulação tátil dos filhotes, a manipulação neonatal rompe a relação mãe-filhote. Vários estudos, inclusive do nosso laboratório mostram que os efeitos da manipulação pós-natal poderiam ser mediados por alterações da interação mãe-filhote (LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998). Assim, os efeitos comportamentais e neuroendócrinos observados são provavelmente devidos à estimulação da mãe através do comportamento de lambe os filhotes

e ficar sobre o ninho. Dessa forma, esse tipo de intervenção executado pelo experimentador seria um estímulo para aumentar o comportamento maternal.

Com o objetivo de analisar os possíveis efeitos do aumento do comportamento maternal induzida pela manipulação neonatal sobre a preferência olfatória de filhotes de ratos aos 7 dias de idade, estudos recentes do nosso laboratório revelaram que filhotes machos e fêmeas submetidos ao protocolo de manipulação neonatal apresentam perfis comportamentais diferentes no teste de preferência ao odor materno (RAINEKI, 2007). Permanecendo obscuro as razões e os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios demonstraram que a manipulação realizada durante a primeira semana de vida é capaz de alterar a preferência do odor materno em filhotes fêmeas, mas não em filhotes machos, devido supostamente à interferência na via noradrenalina/CREB. Adicionalmente a essa via, existiria uma participação sinérgica do sistema serotoninérgico no processo da facilitação desse tipo de aprendizado, mas os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos.

3. OBJETIVO

Verificar em filhotes machos e fêmeas, se o aumento da estimulação tátil induzido pela manipulação foi capaz de alterar no bulbo olfatório o conteúdo de noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), bem como seus metabólitos.

Avaliar o conteúdo de CREB e CREBp no bulbo olfatório de filhotes machos manipulados durante a primeira semana de vida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Essas ratas tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes aleatórios. Os animais que foram utilizados quando adultos, aos 21 dias de vida foram desmamados e mantidos em caixas com no máximo 5 ratos até a idade adulta. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 18 horas e com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida constante em torno de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.1 Experimento I

Manipulação Neonatal

A manipulação neonatal consistiu em levar a ninhada para uma sala anexa ao biotério, com mesmo fotoperíodo e temperatura; separar os filhotes da mãe, que foi mantida em uma caixa ao lado; e manipulá-los gentilmente por 1 minuto, utilizando-se luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho. Após essa manipulação todos os filhotes foram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe, conforme figura II.

Grupo não-manipulado (controle): animais que não sofreram qualquer tipo de manipulação, tanto do experimentador quanto dos bioteristas, até o 7º dia após o nascimento.

Grupo manipulação única: animais que foram manipulados durante 1 minuto, apenas no 7º dia após o nascimento.

Grupo manipulação repetida: animais que foram manipulados durante 1 minuto por dia, durante os 7 primeiros dias após o nascimento. Os procedimentos de manipulação iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes, sendo considerado o dia 1.

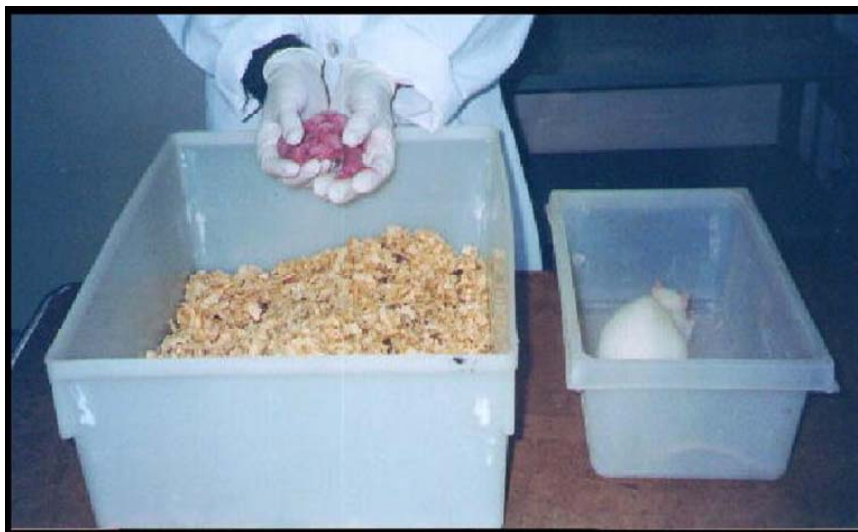


Figura II. Foto ilustrativa do protocolo de manipulação neonatal.

4.2 Experimento II

Coleta e quantificação da NA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA e CREB e CREBp

Nesse procedimento, ratos filhotes machos e fêmeas dos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulação repetida foram decapitados no 7º dia após o nascimento, sendo utilizado apenas um filhote de cada ninhada. Os filhotes do grupo não-manipulado foram decapitados o mais breve possível após ser retirada do ninho. Os filhotes do grupo manipulação única foram manipulados por 1 minuto apenas no 7º dia e após foram devolvidos ao ninho junto a mãe, 15 minutos após os mesmos foram decapitados o mais breve possível. Os filhotes do grupo manipulação repetida foram manipulados todos os dias, do 1º ao 7º dia. No 7º dia pós-natal, após a manipulação, os filhotes foram devolvidos ao ninho e a mãe, e 15 minutos após os ratos foram decapitados o mais breve possível. Em seguida, o bulbo olfatório foi retirado e congelado no isopentano em gelo seco e armazenado em -70°C para posteriormente serem utilizados para quantificação de NA ; MHPG; 5-HT e 5-HIAA por HPLC-ED e CREB e pCREB por *western blot*.

Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED)

Os Bulbos olfatórios foram homogeneizados em 500 µL de uma solução que continha ácido perclórico a 0.2 M, 0.1 mM EDTA e 75 µM 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, padrão interno,; Aldrich, Milwaukee E.U.A.). OS homogenatos foram centrifugados 20 min a 12000 g e o sobrenadante foi filtrada em um filtro de 0.22-µm que se dividiu em duas partes para

análise de MHPG e NA, 5-HT e 5-HIAA, respectivamente. No pellet restante, o conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford. Conforme a figura III, as amostras foram injetadas por um injetor automático (SIL-10Advp; Shimadzu) para análise no HPLC-ED. A separação foi executada a 35 °C por um 250 x 4-mm coluna de fase reversa C18 (Purospher Star, 5 µm,; Merck, Darmstadt, a Alemanha), precedida por uma pré-coluna *electrochemical flow cell* 4 x 4-mm C18. (Lichrospher, 5 µm, Merck). A fase Móvel foi bombeada por uma bomba de dual-pistão (LC-10Advp; Shimadzu) e amostras foram analisadas por um detector eletroquímico (VT-03, Década; Antec Leyden, O Países Baixos). Para análise de MHPG, antes de injeção no HPLC, a amostra foi hidrolizadas a ácido e aquecida durante 5 minutos a 94 ° C em ordem para desconjugar o MHPG livre, como previamente descreveu. A fase móvel consistiu em 100 mM fosfato de dihidrogênio de sódio, 10 mM cloreto de sódio, 0.1 mM EDTA, 0.26 mM de sódio, 1- ácido octanesulfônico (Sigma, St. o Louis, E.U.A.), e 16% metanol (Lichrosolv, Merck), pH 3.5 ajustado com ácido fosfórico. A taxa de fluxo era 0.5 mL/min e o potencial do detector 0.65 vs de V. em situ Ag/AgCl referência elétrodo. Para análise de NA, 5-HT e 5-HIAA, a fase móvel consistiu em 100 mM fosfato de dihidrogênio de sódio, 10 mM cloreto de sódio, 0.1 mM EDTA, 0.95 mM de sódio - ácido octanesulfônico e 16% metanol, pH 3.5. A taxa de fluxo era 0.6 mL/min e o potencial do detector, 0.60 V. Os dados da cromatografia foram analisados usando o programa Classe-VP software (Shimadzu). NA, MHPG, 5-HT e 5-HIAA foram identificadas por pico de retenção de tempo. A quantificação foi realizada através da curva interna de calibração-padrão (DHBA como padrão interno) baseado na área abaixo dos picos.

HPLC-ED

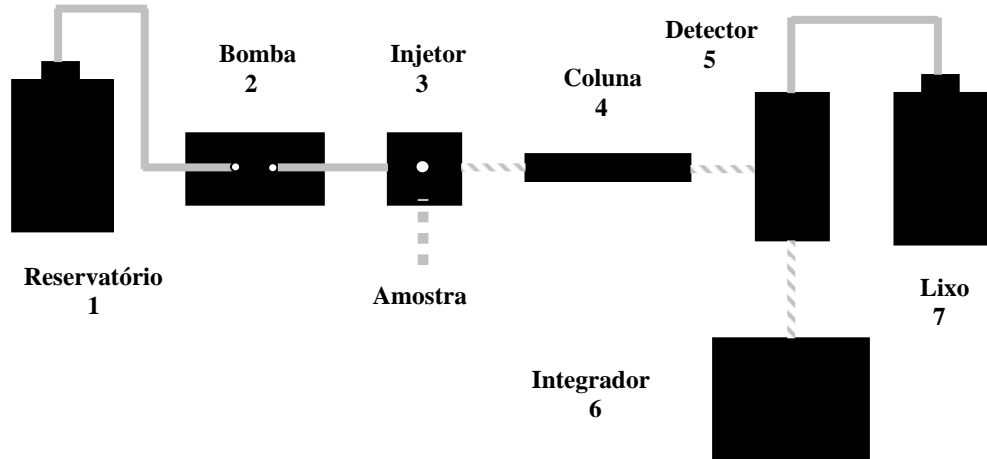


Figura III. Esquema funcional do HPLC: 1 – Reservatório de solvente (fase móvel), 2 – Bomba de alta pressão ou alta performance, 3 – Injetor, injetor da amostra, 4 – Coluna de separação C18 (fase estacionária), 5 – Detector (Eletroquímico), 6 – Integrador (Computador -dados analisados), 7 – Reservatório; Amostras são descartadas.

4.3 Experimento III

Western Blots

Os bulbos olfatórios congelados foram homogeneizados em 500 μ L de tampão de homogeneização (Tris-HCl 20mM, pH 7,4 contendo ortovanadato de sódio 1mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, fluoreto de sódio 50mM e fenilmetilsulfonil fluoreto 1mM). Desse homogeneizado determinou-se o conteúdo de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). Posteriormente, quantidades iguais de proteína (30 μ g para cada amostra) foram carregadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação de acordo com a sua mobilidade. Após, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, EUA). A efetividade da separação das proteínas no gel e a sua transferência para a membrana foram verificadas pela coloração da membrana com *Ponceou S*. A seguir, a membrana foi colocada em tampão salina Tween-Tris (TTBS; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo 0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de Tween 20) contendo albumina 5% por 2 horas a temperatura ambiente para bloquear os sítios inespecíficos. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos a membrana foi incubada *overnight*, a 4°C, com anticorpos primários que reconhecem os seguintes antígenos: pCREB na Ser-133 (pCREB; 1:1000, *Upstate Biotechnology*, EUA) ou CREB (1:4000, *Santa Cruz Biotechnology*, EUA). Posteriormente, a membrana foi lavada em TTBS e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho IgG, na concentração de 1:20000 diluído em TTBS. A membrana foi lavada novamente com TTBS e após a imunoratividade foi detectada pela alteração de quimioluminescência (ECL *Western blotting analysis system*, Amersham). A análise

densitométrica dos filmes foi realizada com o auxílio do programa *MCID Image Analysis System* (versão 5.02, *Imaging Research*, Canadá)

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos através de média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado para a admissão de valores dados como significativos foi de ($p < 0,05$).

Para as comparações entre os grupos para os conteúdos de NA, MHPG, MHPG/NA, 5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, CREB e CREBp no bulbo olfatório foi usado uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de *Newman Keuls*.

6. RESULTADOS

6.1 Participação da noradrenalina na preferência olfatória de filhotes machos e fêmeas manipulados no período neonatal

A figura 4 mostra o conteúdo de NA, MHPG e a razão MHPG/NA no bulbo olfatório de filhotes machos e fêmeas nos três grupos: não-manipulados, manipulação única e manipulação repetida.

De acordo (fig. 4A), um efeito significativo foi encontrado para o conteúdo de NA no bulbo olfatório dos machos. Segundo o teste de *Newman-Keuls*, os grupos manipulação repetida e manipulação única apresentaram um aumento no conteúdo de NA no bulbo olfatório [$F_{(2,23)}= 13,29$; $p<0,0001$] quando comparado com o grupo não-manipulado. Nas fêmeas, também houve uma diferença significativa, onde o grupo manipulação única apresentou uma diminuição do conteúdo de NA [$F_{(2,21)}= 4,36$; $p<0,02$] quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulação repetida.

Para o conteúdo do metabólito (MHPG) no bulbo olfatório dos machos (fig. 4B), nenhum efeito significativo foi encontrado entre os grupos [$F_{(2,23)}=2,97$; $p=0,07$]. Ao contrário dos machos, as fêmeas do grupo manipulação repetida apresentou uma diminuição significativa da taxa de MHPG [$F_{(2,21)}=7,11$; $p<0,004$] comparado ao grupo não-manipulado.

A (fig. 4C) mostra que o mesmo efeito foi observado em ambos os sexos para a razão MHPG/NA. Segundo *Newman-Keuls* o grupo manipulação repetida de machos e fêmeas apresentaram uma redução desse valor ($[F_{(2,23)}=5,10$; $p<0,01$; $F_{(2,21)}=4,75$; $p<0,02$] respectivamente), quando comparados aos demais grupos.

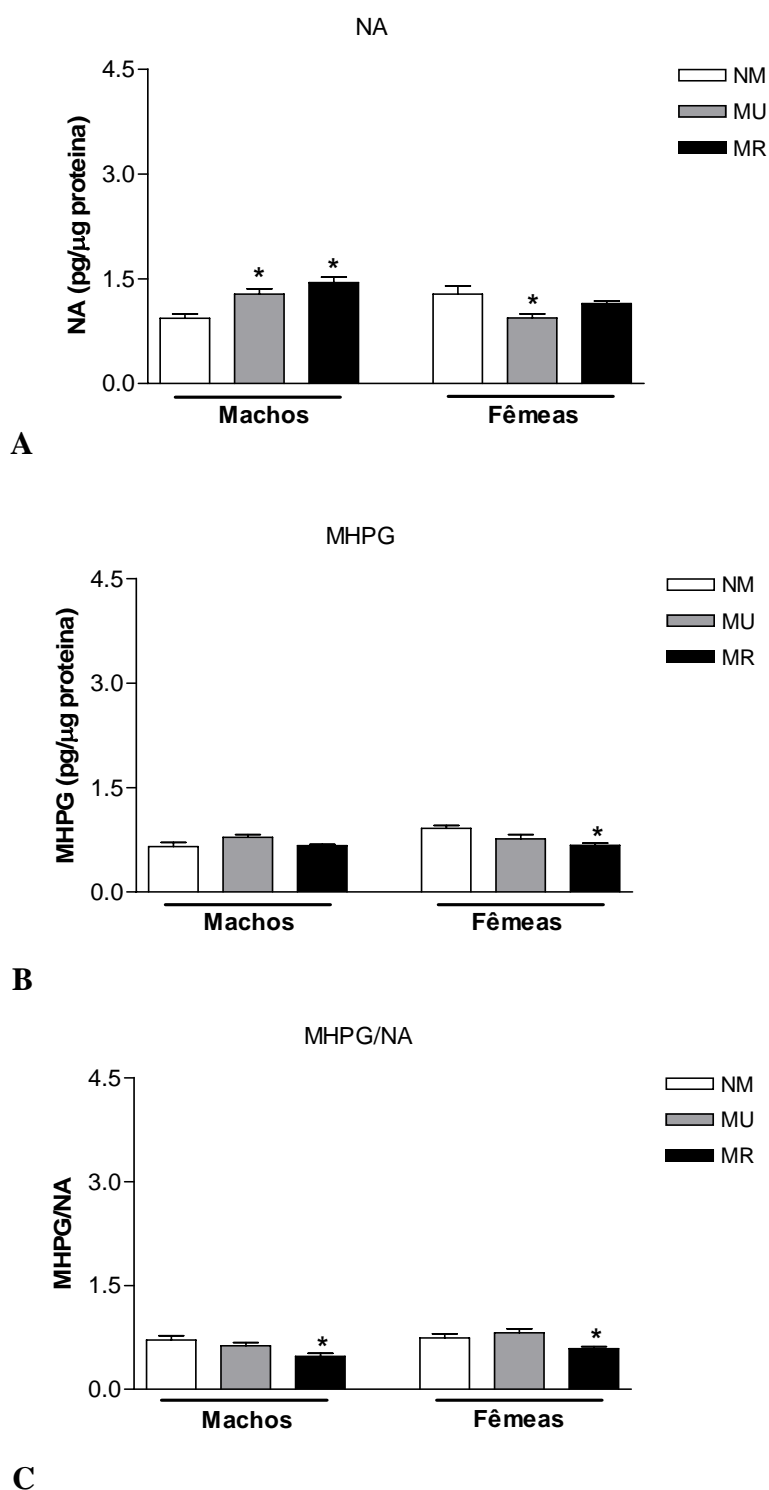


Figura 4. Conteúdo de NA (**A**), MHPG (**B**), razão MHPG/NA (**C**) no bulbo olfatório de filhotes machos e fêmeas aos 7 dias de idade. NM=não-manipulado (machos, n=9; fêmeas, n=9); MU=manipulação única (machos, n=9; fêmeas, n=8); MR=manipulação repetida (machos, n=8; fêmeas, n=7). Todos os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando uma ANOVA de uma via, seguido pós-teste de Newman Keuls. Para todos os grupos foi considerado um $p < 0,05$.

6.2 Participação de 5-HT na preferência olfatória de filhotes machos e fêmeas manipulados no período neonatal

A figura 5 mostra o conteúdo de 5-HT, 5-HIAA e a razão 5-HIAA/5-HT de filhotes machos e fêmeas dos grupos: não-manipulados, manipulação única e manipulação repetida.

Segundo a (fig. 5A), nenhuma alteração significativa com relação ao conteúdo de 5-HT foi observada [$F_{(2,20)}=2,43$; $p=0,11$; $F_{(2,21)}=2,51$; $p=0,10$] em machos e fêmeas respectivamente.

Para os machos, com relação ao conteúdo de 5-HIAA. Foi observado um efeito significativo (fig. 5B). Os resultados mostraram que tanto os machos do grupo manipulação repetida quanto a manipulação única apresentaram um aumento do metabólito [$F_{(2,20)}=15,67$ $p<0,0001$] comparado com os machos do grupo não-manipulado. Para as fêmeas, nenhuma alteração significativa foi observada [$F_{(2,21)}=1,77$; $p=0,19$] nos grupos analisados.

A figura (5C) mostra a taxa de 5-HIAA/5-HT para os filhotes machos. Segundo *Newman-Keuls* foi verificado um aumento dessa taxa no grupo manipulação repetida [$F_{(2,20)}=3,59$ $p<0,04$] quando comparado com os grupos manipulação única e não-manipulado. Em contrapartida, para as fêmeas nenhuma alteração significativa com relação a essa razão foi observada nos três grupos estudados [$F_{(2,21)}=0,18$; $p=0,83$].

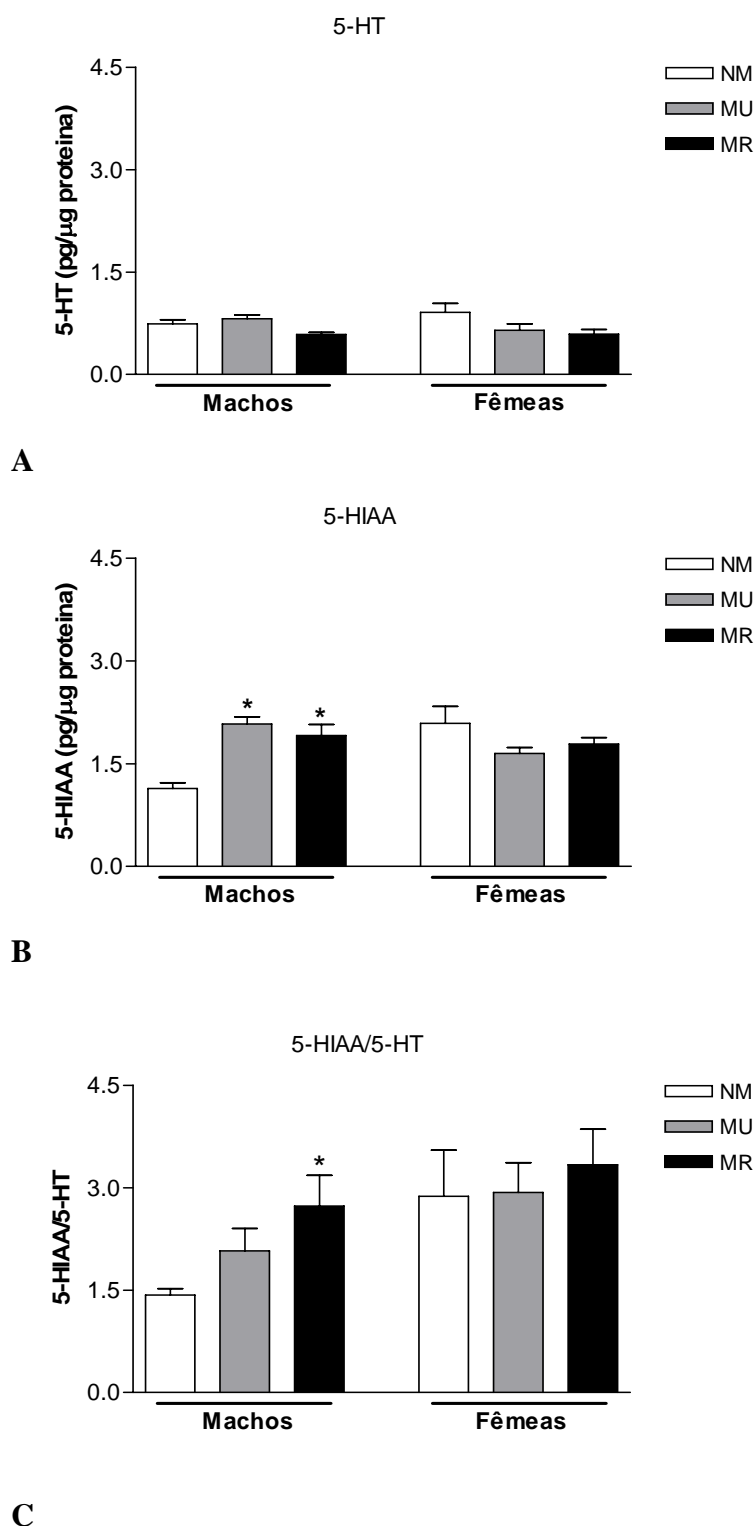


Figura 5. Conteúdo de 5-HT (A), (B) 5-HIAA e (C) razão 5-HIAA/5-HT no bulbo olfatório de filhotes machos e fêmeas aos 7 dias de idade. NM=não-manipulado (machos e fêmeas, n=9); MU=manipulação única (machos e fêmeas, n=8); MR=manipulação repetida (machos e fêmeas, n=7). Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados usando uma ANOVA de uma via, seguido do teste de Newman-Keuls. Foi considerado para todos os dados um $p < 0,05$.

6.3 Conteúdo de CREB e CREBp no bulbo de filhotes machos

Em machos (Fig. 6), observamos alterações significativas no conteúdo de CREB total e CREBp entre os grupos. Através do teste *Newman-Keuls*, foi verificado para o grupo manipulação única uma redução nos níveis de CREBp [$F_{(2,12)}=26,81$; $p<0,0001$] comparado com os grupos não-manipulado e manipulação repetida. Para o conteúdo de CREB, foi registrado um aumento no grupo manipulação repetida [$F_{(2,15)}=8,44$; $p<0,0035$] quando comparado aos demais grupos.

A

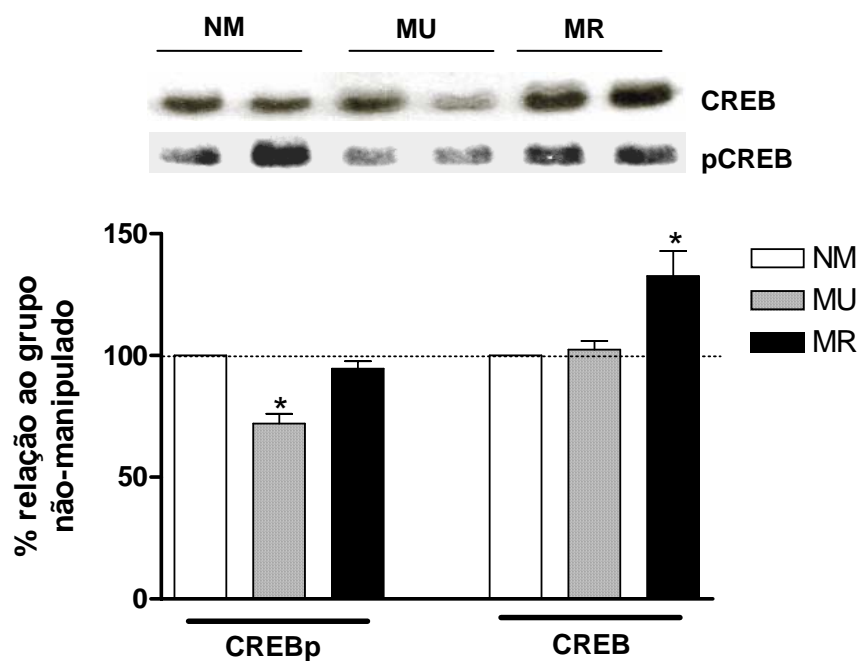


Figura 6. Conteúdo de CREB e CREBp bulbo olfatório de filhotes machos aos 7 dias de idade. Acima a figura representativa dos western blots para CREB e CREBp. Abaixo a porcentagem da densidade óptica de CREB e CREBp em relação ao grupo não-manipulado. Os dados foram expressos pela média \pm EPM e analisados utilizando como teste, uma ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls. Foi para comparar os grupos tratados com o grupo não-manipulado. Para o CREBp n=5 para todos os grupos e para o CREB n=5 para o grupo não-manipulado e n=6 o restante dos grupos.

7. DISCUSSÃO

As alterações ou interferências no período neonatal, como a manipulação ou separação materna, podem provocar diversos distúrbios, modificando o comportamento da mãe em relação a sua prole (LEVINE, 2001). Assim, a qualidade da relação mãe-filhote e o ambiente vivido após o nascimento são de extrema importância para o estabelecimento das respostas comportamentais, defensivas e reprodutivas do indivíduo quando adulto (CAMERON et al., 2005; KAUFMAN et al., 2000; CARLSON & EARLS, 1997).

Nossos resultados mostram que um único episódio de uma única manipulação neonatal realizada por um minuto no sétimo dia não induziu maiores mudanças na atividade noradrenérgica e serotonérgica no bulbo olfatório de filhotes em ambos os sexos. Todavia, uma relação inversa foi verificada nos níveis de fosforilação da proteína CREB. Enquanto os filhotes fêmeas manipulados apresentaram um aumento na fosforilação (RAINEKI, 2007), os filhotes machos revelaram uma diminuição da mesma.

Apesar dos resultados bioquímicos obtidos nesse estudo, a preferência ao odor materno visto no grupo manipulação única testado através do paradigma do aprendizado olfatório, permaneceram inalterados em ambos os sexos (RAINEKI, 2007).

Acreditamos que essa diferença na fosforilação do CREB observada em filhotes machos, seja devido a um desequilíbrio da atividade do sistema serotonérgico, havendo uma tendência ao aumento da atividade nesse sistema. Em contrapartida, segundo MCLEAN (1999) uma ação de cooperatividade existiria entre o sistema serotonérgico e noradrenérgico para que haja o aprendizado olfatório. Dessa maneira, podemos inferir que um fino desbalanço nesse sistema no grupo analisado, poderia estar induzindo um aumento da

atividade de fosfatases, as quais agiriam desfosforilando o CREB (PRICE et al., 2004). Ainda não sabemos o padrão de atividade dessas enzimas em filhotes dos diferentes sexos.

Estudos prévios desenvolvidos por PAPAIOANNOU (2002), indicaram que os efeitos da manipulação são diferentes em fêmeas e machos. Segundo MOORE (1997) haveria uma interação diferente entre mãe e filhotes. Onde naturalmente, as mesmas permaneceriam muito mais tempo cuidando dos filhotes machos do que filhotes fêmeas (MOORE et al., 1997). Além disso, estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que filhotes manipulados na infância apresentam comportamentos diferentes com relação à preferência sexual na idade adulta (RAINEKI, 2007). Assim, para MORICEAU & SULLIVAN (2005), os odores associados na infância são de importância fundamental na idade adulta, embora o papel desse odor mude da infância (reconhecimento da mãe) para a vida adulta (reprodução).

Por outro lado, o procedimento de uma breve separação materna acompanhada da manipulação repetida durante a primeira semana de vida, resulta em uma diminuição da preferência ao odor materno apenas em filhotes de ratos fêmeas, enquanto em machos, essa mesma alteração comportamental não é verificada (RAINEKI, 2007).

Quando observamos os efeitos das manipulações repetidas, verificamos uma redução da atividade noradrenérgica comum em machos e fêmeas. As alterações observadas nessa idade podem ainda permanecer estáveis a longo-prazo. Algumas alterações promovidas pela manipulação ocorrem em áreas do SNC na qual estão envolvidas com a percepção de odores, em especial com a percepção de ferormônios, ou seja, áreas que fazem parte do sistema olfatório acessório como amígdala medial e área pré-óptica medial (SÁNCHEZ-ANDRADE et al. 2005; STOCKHORST & PIETROWSKY, 2004; BRENNAN & KEVERNE, 1997).

Segundo RAINEKI (2007), o procedimento de manipulação neonatal durante os sete primeiros dias induz a uma diminuição da atividade do sistema noradrenérgico na APOM.

Importante núcleo para desempenho de comportamentos relacionados à reprodução tanto em machos quanto em fêmeas (GUARRACI & CLARK, 2006; PAREDES 2003; KATO & SAKUMA, 2000; PAREDES et al., 1998; WOOD, 1997).

Paralelo a essas mudanças, esse tipo de estimulação aplicado em filhotes de ratos durante os 11 primeiros dias de vida, promove uma redução do número de células no *locus coeruleos*, o principal núcleo noradrenérgico do SNC de ratos em ambos os sexos (LUCION et al., 2003)

Devido à presença de autoreceptores adrenérgicos inibitórios, esse núcleo noradrenérgico o “*locus coeruleos*” não apresenta uma regulação própria durante os nove primeiros dias de vida, também chamado de período sensível (SULLIVAN et al., 2003). Lesões dessa estrutura induzidas pela manipulação neonatal poderiam explicar as conseqüentes alterações observadas no sistema noradrenérgico nesses animais. Pois, a integridade dessa estrutura é essencial para o condicionamento do aprendizado olfatório (SULLIVAN et al., 1994).

Apesar de haverem diferenças na fosforilação do CREB no grupo manipulação única em machos e fêmeas, não foram verificadas mudanças nos níveis de fosforilação da mesma proteína no grupo manipulação repetida. Não sabemos quais e como tais mudanças na atividade noradrenérgica acompanhadas dos níveis de fosforilação do CREB se comportaram em machos e fêmeas em cada um dos dias durante a primeira semana do experimento. Da mesma forma que existe doses ótimas para a NA, também existiriam doses ótimas para a expressão da proteína CREB para haver a formação da memória olfatória. Uma super-expressão do CREB poderia interferir com o aprendizado por acionar a atividade de repressores da sua ativação (YUAN et al., 2003).

Porém, segundo as alterações observadas em nossos achados, provavelmente outros sistemas, como o serotoninérgico poderia agir ativando a fosforilação do CREB (PRICE et al., 1998). Acredita-se que assim como a noradrenalina, o sistema serotoninérgico a partir a ativação de receptores 5-HT₂ presentes no bulbo olfatório promoveriam ou intensificariam um aumento de AMPc através do sistema de segundos mensageiros, como o fosfatidil inositol (MCLEAN et al., 1999).

Nossos resultados revelaram ainda um aumento atividade do sistema serotoninérgico (5-HIAA/5-HT) em filhotes machos, mas não em fêmeas. O aumento da atividade desse sistema induzido pela manipulação poderia ter mantido os níveis de fosforilação da proteína CREB no bulbo olfatório desses filhotes machos, de forma a “compensar” a baixa atividade do sistema noradrenérgico. Acreditamos ainda na possibilidade do aumento da atividade do sistema serotoninérgico ter induzido a elevação da expressão de CREB como substrato adicional, com o propósito de manter os níveis de fosforilação.

De acordo com a nossa pesquisa, experimentos realizados por SMYTHE (1994) mostraram que estimulações repetidas durante a primeira semana de vida promoveram um aumento do *turnover* de 5-HT (5-HIAA/5-HT) no hipocampo e também no córtex frontal de ratos neonatos aos 7 dias, não havendo alterações tanto no conteúdo de 5-HT, quanto na densidade de receptores dessas estruturas. Assim, como no bulbo olfatório esse tipo de intervenção tem um efeito similar sobre o sistema serotoninérgico em diferentes estruturas do SNC.

Pesquisas têm mostrado que muitos outros neurotransmissores além da noradrenalina, também estão envolvidos no condicionamento do aprendizado olfatório em neonatos. (CORNEWELL JONES et al., 1990; SULLIVAN, MCGAUGH & LEON, 1991; SULLIVAN & WILSON, 1991; SULLIVAN, WISON, LEMON, & GERHARDT, 1994, SULLIVAN et

al., 1992). Como exemplo, a ativação de receptores dopaminérgicos, especificamente os receptores tipo D₁ que em outros estudos tem demonstrado serem necessários durante período condicionamento. Com a finalidade de facilitar o processo de aprendizado em filhotes neonatos (WELDON et al., 1991).

Portanto, a manipulação neonatal repetida é capaz de alterar a atividade noradrenérgica e serotonérgica no bulbo olfatório de filhotes de ratos. No entanto, essa intervenção age de maneira diferente em filhotes machos e fêmeas. Essa diferença sexual dos efeitos da intervenção ambiental já se manifesta nos primeiros dias após o nascimento. Além disso, pode-se dizer que além do envolvimento da via noradrenalina/CREB, a presença de outros neurotransmissores na efetividade desse tipo de condicionamento em filhotes seja de fundamental importância.

8. CONCLUSÃO

Nós mostramos que as mudanças relacionadas à fosforilação do CREB, atividade NA e 5-HT no bulbo olfatório mostram-se divergentes quando filhotes são submetidos a um único estímulo ou a estímulos repetidos. Assim, podemos concluir que o procedimento de manipulação repetida reduz a atividade noradrenérgica no bulbo olfatório de filhotes aos 7 dias de idade de ambos os sexos. Já a atividade serotoninérgica aumenta em machos, mas não está alterada em fêmeas. É possível que este aumento da atividade serotoninérgica em machos seja a explicação para a expressão da preferência pelo odor familiar que foi normal nos filhotes machos, mas reduzida nas fêmeas, como demonstrado em trabalhos anteriores em nosso laboratório. No entanto, a manipulação repetida dos filhotes machos não alterou a fosforilação do CREB no bulbo olfatório, assim como não altera em fêmeas, previamente demonstrado. Nossos resultados, assim como outras alterações neuroendócrinas e comportamentais causadas pela manipulação e verificadas na vida adulta, têm sido cada vez mais evidentes. Entretanto, a participação de outros mecanismos moleculares na mediação das respostas de estímulos nessa idade, ainda precisa ser esclarecida. Desse modo, mais estudos são necessários na tentativa de descobrir o envolvimento de possíveis moléculas e novas vias que poderiam ser afetadas pelo procedimento da manipulação neonatal.

9. REFERÊNCIAS

ARANEDA, S.; BOBILLIER, P.; BUDA, M.; PUJOL, J.F. Retrograde axonal transporte following injection of [³H] serotonin in the olfactory bulb: I. Biochemical study. **Brain Research**. v.196, p. 405-415.

AUGER, A.P.; HEXTER, D.P.; MCCARTY, M.M. Sex difference in the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in neonate rat brain. **Brain Research**. v. 890, p. 110-117, 2001.

BIRKE, L. I. A.; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**. v.20, p. 85-99, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976

BRENNAN, P.A; KEVERNE, E.B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**. v.51, p. 457-481, 1997.

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

CAMERON, N.M.; CHAMPAGNE, F.A.; PARENT, C.; FISH, E.W.; OZAKI-KURODA, K.; MEANEY, M.J. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.29, p. 843-865, 2005.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; ARDENGHI, P.; PARATCHA, G.; STEIN, M.V.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**. v.76 p. 36-46, 2000.

CARLSON, M.; EARLS, F. Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania. **Annual New York Academy of Sciences**. v.807, p. 419-428, 1997.

CHAMPAGNE, F. C.; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**. v.79, p. 359-371, 2003.

CHRIVIA, J.C.; KWOK, R.P.S.; LAMB, N.; HAGIWARA, M.; MONTMINY, M.R.; AND GOODMAN, R.H. **Nature**. v. 365, p. 855-859, 1993.

CORNWELL, J.C.; PALFAI, T.; YOUNG, T.; DESAI, J.; KRASENBAUM, D.; & MORRISON, J. Impaired Hoarding and olfactory learning in DSP-4-treated rats and control cagemates. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**. v.36, p. 707-711, 1990.

DENENBERG, V. H.; MORTON, J. R. C. Effects of environment complexity and social groupings upon modification of emotional behavior. **Journal of Comparative Physiology**. v.55, p. 242-246, 1962.

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

FLEMING, A.S.; O'DAY, D.H.; KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.23, p. 673-685, 1999.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; LIU, D.; MEANEY, M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**. v.286, p. 1155-1158, 1999 (b).

GIBBS, E.M.; SUMMERS, R.J. Adrenaline and Noradrenaline. In: RIELDEL G, PLATT B. From Messengers to Molecules: Memories Are Made of These. School of Medical Sciences College of Life and Medicine. University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, U.K – **Neuroscience Intelligence Unit**. 2004.

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**. v.32, p. 1239-1242, 1999.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**. v.17, p. 722-729, 1969.

GROTA, L. J.; ADER, R. Behavior of lactating rats in dual chambered maternity cage. **Hormones and Behavior**. v.5, p. 275-282, 1975.

GUARRACI, F.A.; CLARK, A.S. Ibotenic acid lesions in the medial preoptic area disrupt the expression of partner preference in sexually receptive female rats. **Brain Research**. v.1076, p.163-170, 2006.

HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; MCCANN, J.; MCLEAN, J.H. β 1-adrenoceptor or α 1-adrenoceptor activation initiates early preference learning in rat pups: support for the mitral cell/cAMP model of odor preference learning. **Learning & Memory**. v.13, p. 8-13, 2006.

LANGDON, P.E.; HARLEY, C.W.; MCLEAN, J.H. Increased β adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. **Developmental Brain Research**, v.102, p.291-293, 1997.

LEON, M. Catecholaminergic contributions to early learning. **Advances in Pharmacology**. v.42, p. 961-964, 1998.

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

LEVINE, S. Primary social relationship influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**. v.73, p. 255-260, 2001.

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 response to stress. **Science**. v.277, p. 1659-1662, 1997.

LUCION, A.B.; PADOIN, M.J.; PEREIRA, F.M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; SCHNEIDER, F.L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdale and frontal cortex of rats submitted to neonatal stimulation. In: **29th Annua Meeting of The society for Neuroscience**, Miami Beach, Flórida p. 617, 1999.

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

KATO, A.; SAKUMA, Y. Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behavior. **Brain Research**. v.862, p. 90-102, 2000.

MACRÍ, S.; MASON, G.; WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **European Journal of Neuroscience**. v.20, p. 1017-1024, 2004.

MCLEAN, J.H.; SHIPLEY, M.T. Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. specificity of serotonergic inputs in the adult rat. **The Journal of Neuroscience: the official journal of the society for neuroscience**. v.7, p. 3016-3028, 1987(a).

McLean JH, Shipley MT. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**. v.304, p. 467-477, 1991.

MCLEAN, J.H.; DARBY-KING, A.; SULLIVAN, R.M.; KING, S.R. Serotonergic influence on olfactory learning in the neonate rat. **Behavior and Neural Biology**. v.60, p. 152-162, 1993.

MCLEAN, J.H.; DARBY-KING, A.; HODGE, E. 5-HT₂ receptor involvement in conditioned olfactory learning in the neonate rat pup. **Behavior Neuroscience**. v.110, p. 1426-1434, 1996.

MCLEAN, J.H.; HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; YUAN, Q. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training.

Learning & Memory. v.6, p. 608-618, 1999

MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, M.; SHARAMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v.697, p. 70-85, 1993.

MOORE, C. L.; POWER, K. L. Variations in maternal care and individual differences in play, exploration and grooming of juvenile Norway rat offspring. **Developmental Psychobiology.** v.25, p. 165-182, 1992.

MORICEAU, S.; SULLIVAN, R.M. Neurobiology of infant attachment. **Developmental Psychobiology.** v.47, p. 230-242, 2005.

NAKAMURA, S.; KIMURA, F.; SAKAGUCHI, T. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. **Journal of Neurophysiology,** v.58 p. 510-524, 1987.

OLIVIER, B.; OORSCHOT, R.V. 5-HT_{1B} receptors and aggression: A review. **European Journal. Pharmacology.** v.526, p.207–217, 2005.

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**. v.115, p. 1332-1340, 2001.

PAPAIOANNOU, A.; GEROZISSIS, K.; PROKOPIOU, A.; BOLARIS, S.; STYLIANOPOULOU, F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and vulnerability to depressive behavior. **Behavioural Brain Research**. v.129, p. 131-139, 2002.

PAREDES, R.G.; TZSCHENTKE, T.; NAKACH, N. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. **Brain Research**. v.813, p.1-8, 1998.

PAREDES, R.G. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. **Scandinavian Journal of Psychology**, v.44, p. 203-212, 2003.

PARENT, A.; DESCARRIES, L.; BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. **Neuroscience**. v.6, p.115-138, 1981.

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

PRICE, T.L.; DARBY-KING, A.; HARLEY, C.W.; AND MCLEAN, J.H.. Serotonin plays a permissive role in conditioned olfactory learning induced by norepinephrine in the neonate rat. **Behavior. Neuroscience.** v.112, p. 1430-1437, 1998.

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology.** v.38, p. 239-251, 2001.

PRICE, D.M.; CHIK, C.L.; HO, A.K. Norepinephrine induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression in rat penealocyte: distinct roles of alpha-and beta-adrenergic receptors, **Endocrinology.** v.145, p. 5723-5733, 2004.

RAINEKI, C. Manipulação neonatal, aprendizado olfatório e reprodução em ratos. **Tese de doutorado.** (Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

RANGEL, S.; LEON, M. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. **Developmental Brain Research.** v.85, p. 187-191, 1995.

REISBICK, S; ROSENBLATT, J.S; MAYER, A.D. Decline of maternal behavior in the virgin lactating rat. **Journal of Comparative Physiological Psychology.** v.89, p. 722-732, 1975.

SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; JAMES, B.M.; KENDRICK, K.M. Neural encoding of olfactory recognition memory. **Journal of Reproduction and Development.** v.51, p. 547-558, 2005.

SARI, Y. Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.28, p. 565-582, 2004.

SEVERINO, GS.; 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 female. **Physiology & Behavior**. v.81, p. 489-498, 2004.

SILVA, A.J.; KOGAN, J.H.; FRANKLAND, P.W.; KIDA, S. CREB and Memory. **Annual Reviews in Neuroscience**, v.21, p. 127-148, 1998.

SMYTHE, J.W.; ROWE, W.B.; MEANEY, M.J. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. **Developmental Brain Research**. v.80, p. 83-4189, 1994.

STEINBUSCH, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**. v.6, p. 557-618, 1981.

STERN, J. M.; JOHNSON, S. K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. Effects of variations in quality and quantity of pup's stimuli. **Physiology & Behavior**. v.47, p. 993-1011, 1990.

STOCKHORST, U.; PIETROWSKY, R. Olfactory perception, communication, and to nose-to-brain pathway. **Physiology & Behavior**. v.83, p. 3-11, 2004.

STRUTHERS, R.S.; VALE, W.W.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P.E.; MONTMINY, M.R. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. **Nature**. v.350, p. 622-624, 1991.

SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A, LEON, M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. **Journal of Neuroscience**, v.9, p. 3998-4006, 1989.

SULLIVAN, R.M.; MCGAUGH, J.L.; LEON, M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. **Developmental Brain Research**. v.60, p. 219-228, 1991.

SULLIVAN, R.M., ZYZAK, D.R.; SKIERKOWSKI, P.; & WILSON, D.A. The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. **Developmental Brain Research**. v.70, p. 279-282, 1992.

SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A.; LEMON, C.; & GERHARDT, G.A. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. **Brain Research**. v.643, p. 306-309, 1994.

SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A. The locus coeruleus, norepinephrine, and memory in newborns. **Brain Research Bulletin**. v.35, p. 467-472, 1994.

SULLIVAN, R.M. Developing a sense of safety. The neurobiology of neonatal attachment. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1008, p. 122-131, 2003.

SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A. Molecular Biology of Early Olfactory Memory. A Review. **Learning & Memory**. v.10, p. 1-4, 2003.

TODESCHINI, A.S. Efeitos da manipulação e da separação maternal dos filhotes no período neonatal sobre o comportamento da mãe. **Dissertação de mestrado**. (Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002.

WELDON, D.A.; TRAVIS, M. L.; & KENNEDY, D.A. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. **Behavior Neuroscience**. v.105, p. 450-458, 1991.

WILKINSON, L.O.; DOURISH, C.T. **Serotonin and animal behavior**. In: PEROUTKA, S. (ed.). **Serotonin receptor subtypes, basic and clinical aspects**. New York: Wiley, 1991.

WILSON, D.A; & SULLIVAN, R.M. Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward. II Norepinephrine mediates a specific component of the bulb response to reward. **Behavioral Neuroscience**. v. 105, p. 843-849, 1991.

WINZER-SERHAN, U.H.; & LESLIE, F.M. Expression of α_{2A} adrenoceptors during rat neocortical development. **Journal of Neuroscience**. v. 38, p. 259-269, 1999.

WOOD, R.I. thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. **Hormones and Behavior**. v.32, p. 40-45, 1997.

YUAN, Q.; HARLEY, C.W.; BRUCE, J.C.; DARBY-KING, MCLEAN.; J.H. Isoproterenol increase CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depletion olfactory bulbs in rat pups only at dose that produce odor preference learning. **Learning & Memory**. v. 7, p. 413-421, 2000.

YUAN, Q.; HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; NEVE, R.L.; MCLEAN, J.H. Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. **Journal of Neuroscience**. v. 23, p. 4760-4765, 2003.

10. ANEXO

10.1 ARTIGO

Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups

Charlis Raineke,^a Marcelo Alves de Souza^a, Raphael Escorsim Szawka,^b Maiara Lenise Lutz,^a Luiz Felipe Teer de Vasconcellos,^a Gilberto Luiz Sanvitto,^a Iván Izquierdo,^c Lia Rejane Muller Bevilaqua,^d Martín Cammarota,^c and Aldo Bolten Lucion^{a*}