

Efeito da Manipulação Neonatal Sobre a Produção Hipotalâmica de Óxido Nítrico (NO) em Ratas em Diferentes Fases do Ciclo Estral

Marta Knijnik Lucion,
Charlis Rainecki,
Jaqueline Barp,
Adriane Belló-Klein
Janete Anselmo-Franci
Celso Rodrigues Franci
Aldo Bolten Lucion (orientador)

Resumo

Ratas manipuladas no período neonatal apresentam ciclos anovulatórios, diminuição do comportamento sexual e redução do estradiol, LH e FSH plasmático no proestro. O sistema NOérgico está envolvido na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, estimulando a secreção de GnRH. Objetivos: O presente estudo visa avaliar a produção de óxido nítrico (NO) na tarde do proestro e diestro em ratas manipuladas no período neonatal. Materiais e métodos: Ratas Wistar foram divididas em dois grupos: não manipulados e manipulados. A manipulação neonatal consiste no manuseio suave dos filhotes por 1 minuto por dia nos 10 primeiros dias de vida. Quando adultas, o ciclo estral foi verificado e ratas com 3 a 4 ciclos regulares, foram decapitadas no proestro e no diestro às 16 horas. Os cérebros foram retirados e congelados em isopentano e gelo seco, e estocados em -70°C . Posteriormente, a região hipotalâmica foi removida e homogeneizada em PBS (pH 7,4), o homogeneizado foi utilizado para quantificar a produção de NO através da técnica de nitritos e nitratos (metabólitos do NO). Os resultados foram expressos através da média \pm EPM e analisados por uma ANOVA de 2 vias (p menor que 0,05). Resultados: No proestro a concentração (mM) de nitratos e nitritos na região hipotalâmica de ratas manipuladas é significativamente menor do que em ratas não manipuladas (não manipuladas: 6.1 ± 0.5 n=9, manipuladas: $4.3\pm 0,9$ n=8 p=0,01), no diestro não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ratas não manipuladas 5.3 ± 0.5 n=8, manipuladas $5.7\pm 0,2$ n=7). Conclusão: Considerando que o NO estimula a secreção de GnRH, a redução na produção de NO hipotalâmico na tarde do proestro em ratas manipuladas no período neonatal poderia explicar a menor liberação de GnRH, resultando na diminuição da concentração plasmática de LH e FSH na tarde do proestro.

Palavras-chave: Manipulação neonatal, óxido nítrico, GnRH, reprodução, Locus Coeruleus, estresse.

Abstract

Adult female rats, handled in the neonatal period, show anovulatory estrous cycles, lower sexual behavior and reduction on the plasmatic concentrations of estradiol, LH and FSH in the proestrus. The NOergic system is involved in the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonads by stimulating GnRH secretion. Objectives: Present work was designed to analyze the production of nitric oxide (NO) in the proestrus and diestrus in female rats handled in the neonatal period. Materials and methods: Wistar rats were divided in two groups: handled and nonhandled. The neonatal handling consists in delicate manipulation of the pups for 1 minute during the first 10 days of life. When adults, the estrous cycle was verified and rats with 3 or 4 regular cycles were decapitate at 4 p.m. of estrus and diestrus. The brains were removed and frozen in isopentane and dried ice, and then stored at -70°C . The hypothalamic region was removed and homogenized in PBS (pH 7.4), the production of NO was measured by concentration of nitrites and nitrates (NO metabolites) technique procedure. The results were expressed as mean \pm SEM and analyzed by a two-way ANOVA (P menor que 0.05). Results: In the proestrus, the hypothalamic concentration (mM) of nitrites and nitrates of handled rats was significantly lower than the group nonhandled (nonhandled: 6.1 ± 0.5 n=9, handled: $4.3 \pm 0,9$ n=8 P=0,01). In diestrus, there was no difference between groups (nonhandled: 5.3 ± 0.5 n=8, handled: $5.7 \pm 0,2$ n=7). Conclusion: Considering that NO stimulates GnRH secretion, a reduction in the production of hypothalamic NO could explain the lower liberation of GNRH, and thus explain the anovulation.

Key Words: stress, female rats, Locus Coeruleus, neonatal handling, nitric oxide, reproduction

Introdução

A fase inicial do desenvolvimento dos animais se mostra importante na estruturação da personalidade e de sistemas neurais. Muitas espécies, como o homem e os ratos, apresentam um grande vínculo com a progenitora no início de suas vidas. A relação mãe-bebê no ser humano é muito intensa nesse período e é considerada por autores, como Winnicot, um dos fatores determinantes do desenvolvimento psíquico. De acordo com Winnicot, a maneira como a mãe se comporta e se sente em relação ao seu filho exercerá uma grande influência sobre a saúde do bebê, particularmente sobre a gravidez, logo após o nascimento e também pelo resto de sua vida.

Vários estudos em animais de experimentação mostram que intervenções na

relação mãe-filhote, como, por exemplo a manipulação neonatal, afetam comportamentos emocionais e respostas a estímulos estressantes na vida adulta. ([Denenberg, 1964](#); [Meaney et al, 1996](#); [Padoin et al, 2001](#)). Assim, a estimulação tátil experimental dos filhotes pelo pesquisador, ou por outro lado, a privação materna logo após o nascimento são procedimentos utilizados como modelos experimentais para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal podem afetar o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis ([Levine, 1962](#); [Denenberg, 1964](#); [Meerlo et al, 1999](#)). Acredita-se que a interferência na relação mãe-filhote seja responsável por aquelas alterações observadas na vida adulta de ratos manipulados no período neonatal.

Sabe-se que os animais adultos que foram manipulados no período neonatal apresentam uma diminuição do medo e da ansiedade em resposta a novos estímulos estressores, comparados a ratos controle que não foram manipulados ([Denenberg, 1964](#); [Meaney et al, 1996](#); [Padoin et al, 2001](#)). Em contraposição a este aparente desfecho benéfico da manipulação, há estudos recentes mostrando que a manipulação neonatal diminui o comportamento sexual, tanto de ratos machos, como o de fêmeas ([Padoin et al, 2001](#); [Gomes et al, 1999](#)). Além disso, as fêmeas que sofreram aquela intervenção apresentam uma significativa diminuição da ovulação, sendo que a maioria delas apresenta ciclos anovulatórios ([Gomes et al, 1999](#)).

O comportamento sexual feminino e a ovulação envolvem mecanismos neuroendócrinos complexos e ainda não bem conhecidos. Grande parte do que se sabe hoje foi descoberto através de experimentos relacionados ao ciclo estral das ratas, que, assim como as mulheres, apresentam um mecanismo endógeno para a ovulação. A ovulação depende de uma flutuação hormonal bastante precisa que ocorre nas quatro fases que compõem o ciclo estral na rata: proestro, estro, metaestro e diestro ([figura1](#)).

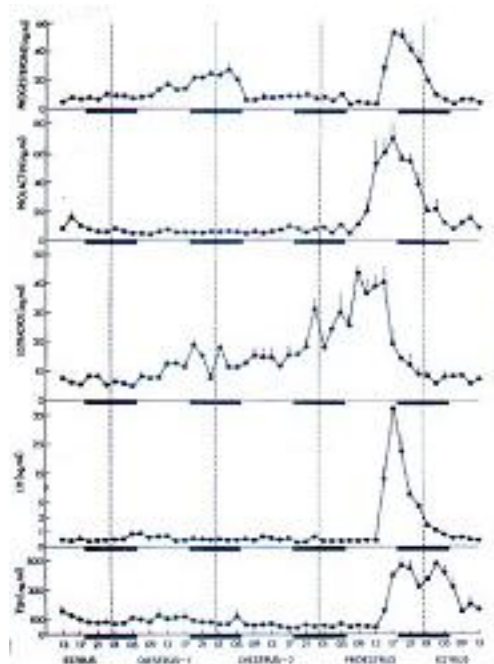


Figura 1: Concentrações plasmáticas de progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) obtidas em intervalo de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rata. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (SMITH et al., 1975).

O proestro dura de 12 a 14 horas e é a fase de grandes alterações hormonais, ocorrendo picos de hormônio luteinizante (LH), prolactina (PRL) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Nessa fase o estradiol, que começa a aumentar no diestro, chega na sua concentração máxima, desencadeando um feedback positivo que promoverá a liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), indispensável para a ovulação (Freeman, 1994).

O estro é o período de 25 a 27 horas em que a rata está receptiva para a cópula, sendo na manhã deste que ocorre a ovulação. Se não houver a concepção, o ciclo continua com o metaestro, cerca de seis a oito horas e diestro que dura de 55 a 57 horas.

Em nosso laboratório, Raineiki (2002) mostrou que ratas manipuladas no período neonatal apresentam uma menor concentração plasmática de estradiol no proestro, o que provavelmente estaria interferindo no mecanismo de retroalimentação positivo do estradiol sobre os neurônios GnRH. Esses resultados estão de acordo com dados ainda não publicados (Gomes, De Paula, Lucion, Franci, Anselmo-Franci e Sanvitto) que mostraram uma redução das concentrações plasmáticas de LH e FSH nas ratas manipuladas na tarde do proestro, em relação às não manipuladas.

O mecanismo pelo qual o estradiol estimula a secreção de GnRH ainda não está claro. No entanto, sabe-se que sinais centrais e periféricos modulam a atividade dos neurônios GnRH. Alguns dos sinais estimuladores para a sua liberação são o óxido nítrico (NO) e a noradrenalina (NA). Esses dois sistemas desempenham um papel importante na sinalização hormonal e neural que

modula a função reprodutiva ([Herbison, 1998](#); [Kalra, 1993](#); [McCann, 1999](#)); assim, eles podem ser os mediadores do mecanismo de retroalimentação positiva dos esteróides gonadais, não tendo, o estradiol, ação direta sobre os neurônios secretores de GnRH ([Jennes et al., 1992](#); [McCann, 1999](#)).

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso produzido através da oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO, em quantidades iguais. A vasta distribuição da óxido nítrico sintetase (NOS) no eixo hipotálamo-hipófise indica que o NO tem funções neuroendócrinas, podendo estar envolvido na modulação da secreção de GnRH ([Grossman et al., 1994](#); [Moretto et al., 1993](#)). Segundo [Knauf et al. \(2001\)](#), a secreção pulsátil de NO e sua amplitude de secreção variam de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que no proestro a amplitude de secreção de NO é maior do que no estro e diestro, e está sincronizado com a secreção de GnRH, indicando sua participação no pico de GnRH. A administração intracerebroventricular de L-NMMA (N-mono-methyl-L-arginine), um inibidor da atividade da NOS, bloqueia a secreção pulsátil de LH dentro de 20 minutos, e a concentração de LH diminui dentro de 60 minutos ([Rettori et al., 1993](#)). Já a administração intracerebroventricular de L-arginina, o substrato para a produção de NO, amplifica o pico de LH induzido por estradiol em ratas OVX ([BONAVERA et al., 1996](#)). Por outro lado, o L-NMMA não altera a secreção pulsátil de FSH, sugerindo que sua secreção não é dependente do NO ([Rettori et al., 1993](#)).

O modelo neural proposto por alguns autores para explicar o pico de LH e conseqüentemente a ovulação, envolveria três neurônios (figura2) ([McCann, 1999](#); [Rettori et al., 1993](#)): o neurônio NA, proveniente do Locus Coeruleus (LC), o interneurônio NOérgico e o neurônio GnRH. O terminal sináptico do neurônio NA faz sinapse com o interneurônio NOérgico e com o neurônio GnRH adjacente, via receptor adrenérgico- α_1 . A ativação deste receptor tem como ação final a liberação de Ca^{++} ([Mani et al., 1994](#)). No neurônio NOérgico, este Ca^{++} interage com a calmodulina e ativa a NOS, promovendo a oxidação da L-arginina em NO e L-citrulina. O NO se difunde através do neurônio GnRH e ativa a ciclooxygenase ([McCann, 1999](#); [Rettori et al., 1993](#)). Já no neurônio GnRH, o aumento do Ca^{++} gerado pela ligação da NA com seu receptor ativa a fosforilase A2 que produz ácido aracdônico pela hidrólise de fosfolipídio de membrana. O ácido aracdônico é convertido em prostaglandina E2 em decorrência da ativação da ciclooxygenase pelo NO. A prostaglandina E2 ativa adenil ciclase, causando um aumento na liberação de AMPc pela atividade da proteinaquinase A, levando à exocitose dos grânulos secretores de GnRH no sistema porta-hipofisal ([McCann, 1999](#); [Rettori et al., 1993](#)), resultando em um aumento da secreção de GnRH pelo terminal sináptico e, conseqüentemente, a liberação de LH pela hipófise.

Estimulação Neonatal

Não manipuladas (controle): animais que não sofreram qualquer tipo de manipulação até o dia 10 após o nascimento. Depois disso, as caixas eram limpas conforme a rotina do biotério.

Manipuladas: os animais foram retirados da caixa por três minutos e gentilmente manipulados pelo experimentador por um minuto, durante os 10 primeiros dias de vida. A manipulação consistia em levar a ninhada para uma sala anexa ao biotério, com mesmo fotoperíodo e temperatura, separar os filhotes da mãe, que era mantida em uma caixa ao lado, e manipulá-los utilizando-se luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho, gentilmente. Após essa manipulação todos os filhotes eram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe. O procedimento de manipulação iniciava no dia seguinte ao nascimento dos filhotes (Dia 1).



Figura 3: Manipulação neonatal: filhotes na mão do pesquisador, sendo manipulados e mãe em caixa ao lado.

Ciclo Estral

A partir de 70 dias de idade, o ciclo estral foi verificado através de esfregaço vaginal, que era colhido diariamente ao redor das nove horas da manhã e analisado a fresco em microscópio. Utilizaram-se no experimento somente ratas com três a quatro ciclos estrais regulares seguidos.

Retirada da Região Hipotalâmica

Ratas com três a quatro ciclos estrais regulares foram decapitadas no diestro ou proestro às 16 horas, horário que de acordo com a literatura ocorre o

maior pico de NO. Logo a seguir, o cérebro era retirado e congelado em isopentano e gelo seco. Após, os cérebros foram estocados em freezer a -80°C .

No dia da medida do óxido nítrico os cérebros eram retirados do freezer e, ainda congelados, eram cortados com a finalidade de remover a região hipotalâmica. Esta, por sua vez, era homogeneizada em PBS (pH 7,4). O homogeneizado foi utilizado para quantificar a produção de NO através da técnica de nitritos e nitratos.

Determinação de nitritos e nitratos

As concentrações de nitritos e nitratos no homogeneizado foram medidas pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger e colaboradores. Alíquotas de $50\mu\text{L}$ foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por 30 minutos, em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi analisado pela reação deste com o reagente de Griess, que forma um composto corado que foi medido em ELISA no comprimento de onda de 540 nm . A quantificação dos níveis de nitritos e nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes:

- Reativo de Griess (1g de sulfanilamina + 0,1g de naftiletilendiamina + 2,3mL de ácido ortofosforico 85% + 97,7mL de água)
- Tris 1 M, pH 7,5
- NADPH 0,02 mM
- Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mM
- Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL
- Nitrato redutase (NR) 1,0 U/mL

No meio de reação, foram adicionados $50\mu\text{L}$ de amostra, $10\mu\text{L}$ de NADPH, $7\mu\text{L}$ de Tris, $23\mu\text{L}$ de uma mistura de G6P/G6PDH e $10\mu\text{L}$ de NR. Isto foi incubado à temperatura ambiente sob agitação por 30 minutos. Após, foram adicionados $100\mu\text{L}$ do reagente de Griess e a mistura foi incubada à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida a 540 nm . A medida dos níveis de nitrito foi feita incubando-se por 10 minutos $100\mu\text{L}$ do homogeneizado com $100\mu\text{L}$ de reativo de Griess e lido a 540 nm . Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita, utilizando-se nitrato de sódio 1 mM para o resultado de nitratos, e uma curva utilizando-se nitrito de sódio 1 mM para o resultado de nitritos (Granger, 1999).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média ($\pm\text{EPM}$) da concentração (mM) de nitritos e nitratos no hipotálamo das ratas dos dois grupos (não manipuladas e manipuladas) e nas duas fases do ciclo estral (diestro e proestro). Os dados foram analisados através de uma ANOVA de 2

vias (entre os grupos e entre as fases do ciclo estral), seguida do teste de Newman-Keuls para as comparações múltiplas. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de P menor que 0,05.

Resultados

No proestro a concentração (mM) de nitratos e nitritos na região hipotalâmica de ratas manipuladas ($4.3 \pm 0,9$ n=8) é significativamente menor ($F(1,8)=7,34$, $p=0,01$) do que em ratas não manipuladas (6.1 ± 0.5 n=9). No diestro não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as ratas não manipuladas (5.3 ± 0.5 n=8) e as manipuladas ($5.7 \pm 0,2$ n=7).

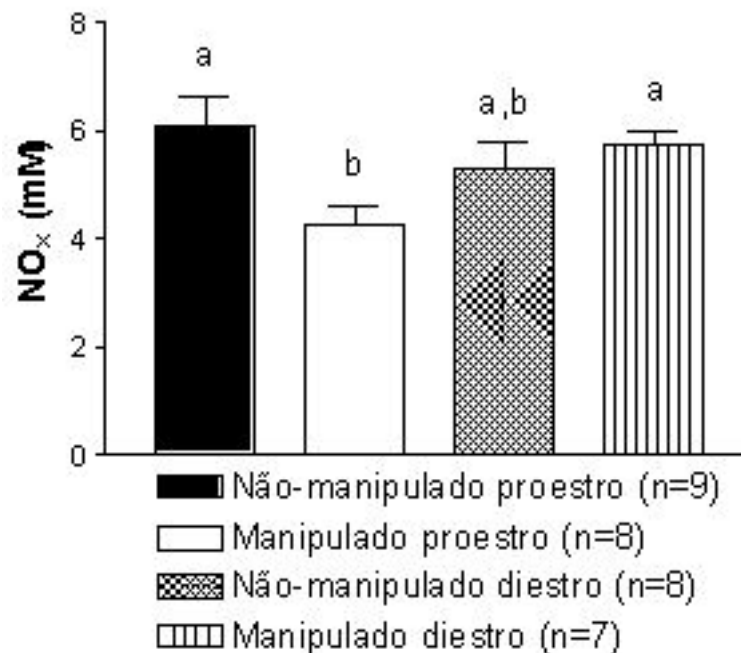


Figura 4: Concentração (mM) de nitritos e nitratos na região hipotalâmica de ratas não manipuladas e manipuladas no período neonatal no diestro e no proestro.

Discussão

Os resultados evidenciam que as ratas manipuladas apresentam uma menor concentração hipotalâmica de óxido nítrico na tarde do proestro. Considerando que o NO está envolvido no mecanismo de ovulação através da indução do pico de GnRH ([Grossman et al, 1994](#), [McCann et al, 2003](#)), o presente trabalho pode explicar a redução da ovulação em ratas manipuladas no período neonatal.

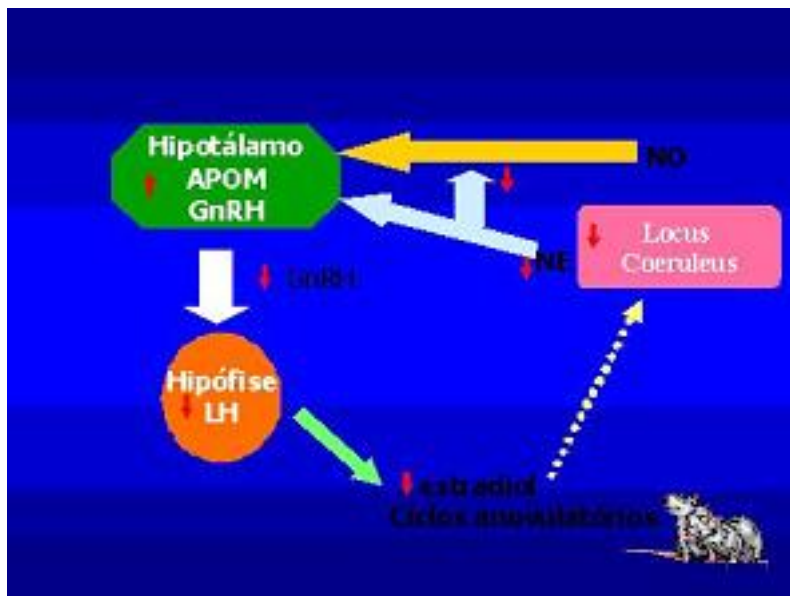


Figura 5: Esquema das possíveis alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, envolvendo os neurônios óxido nítrérgicos e noradrenérgicos do Locus Coeruleus. NO - óxido nítrico; LH - hormônio luteinizante; NE - noradrenalina; APOM - área pré óptica medial; GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas.

 Possíveis interações do estradiol no LC

A redução do conteúdo de NO no hipotálamo na tarde do proestro pode ter sido causada por uma menor estimulação noradrenérgica sobre os neurônios óxido nítrérgicos. De fato, resultados obtidos por [Lucion et al. \(2003\)](#) mostram que a manipulação diária por um minuto nos 10 primeiros dias de idade em ratos machos e fêmeas promove uma diminuição significativa do número de neurônios do Locus Coeruleus (LC) aos 11, 26, 35 e 90 dias de idade. Esse importante núcleo noradrenérgico apresenta também uma redução de atividade sobre o hipotálamo em ratos manipulados no período neonatal, em decorrência do aumento do número de autoreceptores inibitórios ([Liu et al. 2000](#)).

Durante o ciclo estral, o aumento do estradiol plasmático no proestro estimula a secreção de NO na eminência mediana e assim facilita a rápida e sincronizada liberação de GnRH dos terminais nervosos, levando ao pico pré ovulatório de LH. Esse mecanismo é mediado pela atividade de neurônios noradrenérgicos. O LC pode ser o sítio de ação do estradiol durante o feedback positivo, já que neurônios do LC concentram receptores de estradiol ([Shughrue, 1997](#)). Ratas manipuladas no período neonatal apresentam diminuição do estradiol plasmático no proestro, quando comparadas a ratas não manipuladas ([Raineki et al, 2004](#)). A redução da estimulação do estradiol nos neurônios do LC no proestro somada ao número reduzido de células no LC em ratas manipuladas no período neonatal pode gerar uma diminuição da atividade do LC sobre os neurônios óxido nítrérgicos na APOM e hipotálamo, com conseqüente queda da concentração hipotalâmica de óxido nítrico no proestro, como foi evidenciado no presente estudo. A redução da ação

estimulatória do LC sobre os neurônios GnRH e NOérgicos da área pré-óptica medial nas ratas manipuladas pode explicar o acúmulo de GnRH na área pré-óptica medial, diminuindo assim a ação do GnRH sobre a liberação de LH e FSH pela hipófise, afetando finalmente a ovulação.

Além de estar envolvido no processo de ovulação, o NO e o GnRH induzem o comportamento sexual ([Mani et al, 1994](#)). Assim, a redução da produção de NO hipotalâmico na tarde do proestro, como evidenciada no presente estudo, pode explicar também a redução do comportamento sexual nas fêmeas que foram manipuladas no período neonatal.

Por outro lado, nosso estudo demonstrou que não há diferença na concentração hipotalâmica de NO na tarde do diestro entre ratas manipuladas ou não no período neonatal. Estudos preliminares do nosso laboratório ([Raineki et al, 2004](#)) mostram que a manipulação neonatal não afeta o estradiol plasmático no diestro. Assim, o feedback negativo do estradiol para o LC não estaria alterado, não influenciando a concentração de NO.

Considerando que a manipulação neonatal provoca alterações comportamentais e neuroendócrinas constatadas na vida adulta, é plausível supor que essa estimulação durante o período neonatal provoque alterações estáveis no sistema nervoso central, "marcas" provavelmente estruturais, que seriam causa das modificações comportamentais e neuroendócrinas observadas ao longo da vida do indivíduo. A redução da produção de óxido nítrico no hipotálamo é mais uma evidência de um efeito de longa duração, decorrente da intervenção externa na relação mãe-filhote. Os resultados demonstram ainda que a estimulação neonatal altera a circuitaria neuroendócrina dos mecanismos da reprodução em fêmeas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Prof. Aldo Bolten Lucion e ao doutorando Charlis Raineki por todo apoio prestado durante este projeto e a minha família por sempre estar presente.

Referências

BONAVERA, J. J.; KALRA, P. S. [L-arginina/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y](#). *Endocrinology*, v.137,

p.1956-1961, 1996.

DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation. *Psychological Review*, v.71(5), p.335-351, 1964.

FREEMAN, ME. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E; NEIL, J. (Editors), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994.

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.

GROSSMAN, A. B. et al. [The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotrophin-releasing hormone neurons](#). *Journal of Endocrinology*, v.140, p.R5-R8, 1994.

HERBISON, A. E. [Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons](#). *Endocrine Reviews*, v.19, p.302-330, 1998.

JENNES, L. et al. [C-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments](#). *Brain Research*, v.586, p.171-175, 1992.

KALRA, S. P. [Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge](#). *Endocrine Reviews*, v. 14, p.507-538, 1993.

KNAUF, C. et al. [Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotrophin-releasing hormone release](#). *Endocrinology, USA*, v. 142, n.6, p.2343-2350, 2001.

LEVINE, S. et al. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and Behavior*, v. 2, p. 55-59, 1967.

LIU, D. et al. [Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine](#)

[response release in the hypothalamic paraventricular nucleus.](#)

Journal of Neuroendocrinology, v.12, p.5-12, jan., 2000.

LUCION, A.B. et al. [Neonatal handling reduces the number of cells in the Locus Coeruleus of rats.](#) Behavioral Neuroscience, v. 117 (5), p. 894-903, 2003.

MANI, S.K. et al. [Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats.](#) Proceedings of the National Academy of Science, USA, v. 91, p. 6468-6472, 1994.

McCANN, S. M. et al. [The role of nitric oxide in reproduction.](#) Brazilian journal of Medical and Biological Research, v.32, p.1367-1379, 1999.

McCANN, S. M. et al. [The role of nitric oxide \(NO\) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior.](#) Current pharmaceutical design, v.9, p.381-390, 2003.

MEANEY M. J. et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. Dev. Neuroscience. v.18, n. 1-2, p. 49-72. 1996

MEERLO, P. et al. [The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity.](#) Journal of Neuroendocrinology, v. 11 p. 925-933, 1999.

MORETTO, M.; LÓPEZ, F.J.; NEGRO-VILAR, A. [Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion.](#) Endocrinology, v.133. n.5, p. 2399-2402, 1993.

PADOIN, MJ. et al. [Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats.](#) Behavioral Neuroscience, v. 115 p. 1332-1340, 2001.

SHUGHRUE, P.J; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. [Comparative distribution of estrogen receptor- \$\alpha\$ and \$\beta\$ mRNA in the rat central nervous system.](#) The Journal of Comparative Neurology, v.388, p.507-525, 1997.

RAINEKI, C. et al. Estradiol and progesterone plasma levels

throughout the estrous cycle in neonatal handled rats. 2004.
Artigo submetido ao Journal of Endocrinology, 2004.

RETTORI, V. et al. [Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro.](#)

Proceedings of the National Academy of Science USA, v.90,
p.10130-10134, 1993.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle end early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels association with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology, v.96, p.219-226, 1975.

WINNICOT, D. W. O ambiente e os processos de maturação: estudos sobre a teoria do desenvolvimento emocional. Trad. Irineo Constantino Schuch Ortiz. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1990.

AUTORES

[MARTA KNIJNIK LUCION¹](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[CHARLIS RAINEKI²](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[JAQUELINE BARP³](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[ADRIANE BELLÓ-KLEIN⁴](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[JANETE ANSELMO-FRANCI⁵](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[CELSO RODRIGUES FRANCI⁶](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

[ALDO BOLTEN LUCION \(orientador\)⁷](#)

[CURRÍCULO LATTES](#)

- 1 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS
- 2 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS
- 3 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS
- 4 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS
- 5 - Departamento de Fisiologia, faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto USP
- 6 - Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP
- 7 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS