

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Ana Carolina de Moura

**Análise da estabilidade de genes
endógenos de referência para
estudos de expressão gênica no
sistema nervoso central de ratas por
PCR em tempo real**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2012**

M929a Moura, Ana Carolina de

Análise da estabilidade de genes endógenos de referência para estudos de expressão gênica no sistema nervoso central de ratas por PCR em Tempo Real / Ana Carolina de Moura. – 2012.

v, 54 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.

Orientadora: Dra. Ana B. Gorini da Veiga

Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi

1. Sistema nervoso central. 2. Ratos Wistar. 3. Comportamento.
4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 5. Expressão gênica.
I. Título.

CDD 612.8

CDU 612.82

Ana Carolina de Moura

**Análise da estabilidade de genes
endógenos de referência para
estudos de expressão gênica no
sistema nervoso central de ratas por
PCR em tempo real**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau
de Mestre

Orientadora: Dra. Ana B. Gorini da Veiga
Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi

Porto Alegre
2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho a toda minha família, principalmente aos meus pais, Lourival e Therezinha, que sempre me incentivaram e oportunizaram meus estudos, e por todos seus ensinamentos em relação à vida, moral, respeito e amor. Também ao Rodrigo, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Veiga, por ter oportunizado minha iniciação no meio da pesquisa, pela paciência e ensinamentos; assim como à minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Márcia Giovenardi e à Prof^a Dr^a Silvana de Almeida; todas as três tiveram fundamental contribuição por essa realização em minha vida acadêmica.

À técnica de laboratório Grasiela Agnes, por toda a ajuda e orientação.

À Prof^a Dr^a Ângela Dutra, minha orientadora REUNI, por todas as oportunidades de iniciação à docência, por sua dedicação e pela paciência.

Às colegas de grupo que me auxiliaram ou estavam no início do projeto: Gabriela Albiero, Carina Ruthschilling, Virgínia Lazzari, Roberta Becker e Mirela Gil.

À secretaria de Pós-Graduação, em especial à Maristela, pela atenção e disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e à UFCSPA, pela oportunidade e acessibilidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO DA DISSERTAÇÃO.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. COMPORTAMENTO SOCIAL.....	6
1.2. GENES E COMPORTAMENTO SOCIAL.....	9
1.3. GENES, HORMÔNIOS E COMPORTAMENTO.....	13
1.4. COMPORTAMENTO MATERNAL.....	17
1.5. RATAS HL E LL.....	19
1.6. ÁREAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO COMPORTAMENTO MATERNAL.....	20
1.7. PCR EM TEMPO REAL E SELEÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO.....	23
Referências da Revisão de Literatura.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
5. ANEXOS.....	54
Anexo 1: Análise do receptor de estrógeno.....	55
Anexo 2: Análise do receptor de dopamina.....	57
Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ActB	β -actina
BNST	Parte ventral do núcleo do leito da estria terminal
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CPF	Córtex pré-frontal
Ct	Ciclo limiar
CypA	Ciclofilina A
E2	Receptores de estradiol
ER	Receptores de estrogênio
Er α	Receptores de estrogênio alfa
Erko	Camundongos nocaute para o receptor de estrogênio
HKG	Gene <i>housekeeping</i> (gene constitutivo ou normalizador)
HL	<i>High licking</i>
HP	Hipocampo
LL	<i>Low licking</i>
MeA	Amígdala medial
MePD	Amígdala medial pósterio dorsal
MPOA	Área pré-óptica medial
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OB	Bulbo olfatório
OT	Ocitocina
OXTR	Receptores de ocitocina
PR	Receptor de progesterona
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase
SNC	Sistema nervoso central
ST	Estriado
UBC	Ubiquitina C
VMPC	Córtex pré-frontal ventro-medial

RESUMO DA DISSERTAÇÃO

Introdução: Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de vias de sinalização no sistema nervoso central (SNC) tem sido a base de muitos estudos comportamentais em neurociências. Tais estudos visam abordar como um padrão de comportamento é controlado através da expressão de genes candidatos. A quantificação de mRNA nesses estudos é realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), necessitando ser normalizada por um controle interno, ou seja, um gene endógeno de referência (normalizador) – geralmente um gene constitutivo (*housekeeping gene*; HKG). A expressão gênica dos HKGs também pode ser variável, de modo que a escolha do controle interno mais estável em cada tecido analisado é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis. Neste trabalho foi avaliado o HKG mais estável em áreas do SNC relacionadas com o comportamento maternal em modelo animal.

Objetivos: Avaliar, por meio da expressão em nível transcricional, qual o gene constitutivo mais estável em regiões encefálicas relacionadas ao comportamento maternal de ratas.

Material e Métodos: Foram utilizadas ratas *Wistar* virgens (n=6), no período de diestro, das quais foram coletadas as seguintes regiões encefálicas: bulbo olfatório (OB), hipocampo (HP), estriado (ST) e córtex pré-frontal (CPF). O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado por RT-PCR. A amplificação foi realizada por PCR em tempo real (método *SYBR Green*), com *primers* para os genes constitutivos mais utilizados segundo a literatura: β -actina (ActB), ciclofilina A (CypA) e ubiquitina C (UbC); suas estabilidades foram determinadas pelo programa *NormFinder*.

Resultados: Os resultados mostram que, no HP e ST, o gene mais estável foi ActB, enquanto no CPF e no OB os genes mais estáveis foram CypA e UbC, respectivamente.

Conclusões: Os níveis de expressão gênica de HKGs são variáveis no SNC, principalmente quando diferentes estruturas cerebrais são analisadas. Os resultados do presente trabalho poderão servir como base na escolha do HKG mais adequado para ser utilizado como controle interno em análises dos níveis de expressão gênica no SNC, como por exemplo em estudos de genes associados ao comportamento maternal de ratas.

1. INTRODUÇÃO

Muitas estruturas do sistema nervoso central (SNC), tais como bulbo olfativo (OB), hipocampo (HP), estriado (ST), córtex pré-frontal (CPF), amígdala medial pósterior (MePD) e área pré-óptica medial (MPOA), são responsáveis pelo surgimento e manutenção de comportamentos sociais. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de vias de sinalização no SNC tem sido a base de muitos estudos comportamentais em neurociências. Tais estudos visam abordar como um padrão de comportamento é controlado através da expressão de um gene candidato ou grupo de genes (Castilhos *et al.*, 2006; Röskam *et al.*, 2009; Djordjevic *et al.*, 2012; Rasia-Filho *et al.*, 2012; Ruthschilling *et al.*, 2012).

1.1. COMPORTAMENTO SOCIAL

A evolução tem fundamentalmente moldado a arquitetura da mente, produzindo mecanismos cognitivos e neurais que são projetados para resolver problemas adaptativos encontrados pelos nossos ancestrais humanos. Ao longo da história evolutiva do homem, um dos maiores desafios adaptativos para nossa espécie foi a convivência e interação social: aprender a selecionar companheiros, a formar alianças e a competir por recursos limitados (Barbey *et al.*, 2009).

O comportamento social claramente evoluiu várias vezes, mas provavelmente dentro de um quadro de conservados mecanismos neurais. Todos os sistemas neurais de comportamentos sociais compartilham as seguintes características: eles são muito sensíveis

e receptivos à informação social e ambiental; esta informação se propaga dentro de organismos individuais por uma ou mais principais vias sensoriais; a transdução de sinais neurais é processada e integrada nos circuitos específicos do cérebro por meio de transdução de sinal conservada e sistemas neuromoduladores; e o estado interno resultante do animal finalmente controla a atividade comportamental (Robinson *et al.*, 2008).

Os animais realizam muitas atividades ao longo de suas vidas para sobreviver e se reproduzir: eles encontram comida, encontram companheiros, defendem-se e/ou defendem seu território; em muitos casos, cuidam de seus filhotes ou outros parentes. Essas atividades tornam-se "sociais" quando envolvem interações entre os membros da mesma espécie, de uma forma que influencia o comportamento imediato ou futuro. Um dos fundamentos do comportamento social é a comunicação. Um denominador comum entre diferentes comportamentos sociais é a produção, a recepção e a interpretação de sinais que influenciam o comportamento do indivíduo, dependendo do contexto social (Floreano *et al.*, 2007). Os vertebrados apresentam uma diversidade espetacular de comportamentos sociais, incluindo: a memória social; a interação social (discriminação de indivíduos da mesma espécie e parceiros sexuais); e os comportamentos maternal, agressivo e sexual. Todos esses comportamentos são de fundamental importância e são regulados por uma rede, evolutivamente conservada, da parte frontal do cérebro límbico e mesencéfalo (Bale e Dorsa, 1995; Goodson *et al.*, 2009).

Brothers (1990) escreveu uma das primeiras revisões que apontam quais são os componentes de um cérebro social e propôs um conjunto inicial de estruturas que estivessem envolvidas no comportamento social, sendo elas: a amígdala, o córtex órbito-frontal e os lobos temporais. Estudos mais recentes (Adolphs, 2003; Cacioppo *et al.*, 2007; Frith, 2007; Frith e Frith, 2007; Lieberman, 2007; Fiske e Taylor, 2008) incluem estruturas

adicionais e acrescentam papéis prováveis a estas. Esquemáticamente os córtices sensoriais, bem como estruturas subcorticais, como a amígdala, alimentam a informação sensorial (em rotas paralelas) para um mosaico de regiões corticais que analisam aspectos particulares de um estímulo ou categorias particulares de estímulos.

Adolphs e cols. (2009) observaram que, em humanos, os estímulos que não podem ser percebidos conscientemente ainda resultam na ativação da amígdala, levando à ideia de que ela pode proporcionar processamento rápido e automático, podendo influenciar na cognição social. O papel da amígdala na cognição social tem sido estudado mais extensivamente em relação a julgamentos que fazemos das pessoas com base nas expressões faciais. Estudos de lesões revelaram que o dano à amígdala resulta em uma diminuição da capacidade de reconhecer expressões faciais de emoção, um achado inicial que foi seguido por uma vasta literatura documentando o envolvimento da amígdala no processamento emocional tanto apetitivo como aversivo (Aggleton, 2000).

As regiões ventral e medial do córtex pré-frontal que, em humanos, englobam uma série de regiões interconectadas que processam a recompensa e a punição, regulam a emoção e mantêm a homeostase, têm sido associadas ao comportamento social. A associação de deficiências no comportamento social com o dano no córtex pré-frontal ventro-medial (VMPC) já foi investigada com muito mais detalhes. Testes experimentais que avaliam diretamente o conhecimento social fornecem um apoio adicional para o papel do VMPC na cognição social. Pacientes com danos no VMPC têm déficits na interpretação de informações sociais não-verbais, como expressões faciais, gestos e postura corporal; mesmo assim, eles normalmente têm preservado o conhecimento declarativo de normas básicas sociais e morais. O comportamento social depende criticamente do contexto e da intenção, uma sensibilidade que surge a partir da interação entre ricos processamentos

controlados e automáticos da informação social, e a modulação muito enfatizada dentro da psicologia social (Adolphs *et al.*, 2009).

Evidências indicam que as representações dentro do CPF lateral permitem às pessoas orquestrar seus pensamentos e ações em conjunto com as suas intenções de apoiar o comportamento social. Apesar do papel fundamental da região em orientar interações sociais, questões sobre como ocorre o processamento da organização funcional e social pelo CPF lateral permanecem sem respostas claras. Evidências emergentes sugerem que esta capacidade depende centralmente do CPF, o que é particularmente importante para agrupar experiências específicas de nossas interações com o ambiente ao longo de temas comuns, isto é, princípios orientadores do comportamento. Para este fim, nossos cérebros evoluíram mecanismos para detectar e armazenar as complexas relações entre situações, ações e consequências. Reunindo esse conhecimento a partir de experiências anteriores, podemos desenvolver princípios orientadores de comportamentos que nos permitem inferir quais objetivos estão disponíveis em situações similares no futuro e quais ações podem nos aproximar deles (Barbey *et al.*, 2009).

1.2. GENES E COMPORTAMENTO SOCIAL

Muitos estudos sobre comportamento social têm buscado entender os mecanismos moleculares que regulam processos comportamentais básicos. A genética e a biologia molecular têm contribuído sobremaneira na identificação de genes associados a determinados comportamentos e como alterações genéticas ou fatores ambientais podem interferir na expressão desses genes. Entretanto, genes não são expressos isoladamente e

comportamento social não tem sentido fora da sociedade. Ambos estão em fluxo dinâmico com o ambiente imediato que o gene/indivíduo se encontra, que por sua vez estabelece a temporização, o padrão e as condições de expressão. Isto significa que os comportamentos complexos e suas bases genéticas devem ser vistos como um processo cumulativo, ou como o resultado das experiências até aquele ponto no tempo, configurando, ao mesmo tempo, um estado para o que poderá ocorrer no futuro. Evidências indicam que como as experiências se acumulam ao longo da vida, experiências iniciais dão a forma como os genes/indivíduos vão responder a experiências posteriores, enquanto experiências posteriores modificam os efeitos dessas experiências anteriores (Crews *et al.*, 2006).

As relações entre genes, cérebro e comportamento social têm enredos complexos em diferentes contextos, que vão desde o desenvolvimento dos organismos e mecanismos fisiológicos, até a evolução. Genes não especificam o comportamento diretamente, mas sim codificam produtos moleculares que constroem e governam o funcionamento do cérebro por meio do qual o comportamento se expressa. O desenvolvimento do cérebro, a atividade do cérebro e o comportamento dependem de influências herdadas e fatores ambientais. Há crescente valorização que a informação social pode impactar a expressão gênica no cérebro e o comportamento. Além disso, a variação no comportamento molda a evolução de elementos genômicos que influenciam o comportamento social através do *feedback* da seleção natural (Robinson *et al.*, 2008).

Até pouco tempo, o genoma humano era considerado relativamente estável no que diz respeito às características de um indivíduo, as quais, acreditava-se, eram determinadas principalmente pelas sequências de bases nucleotídicas dos genes expressos, com alguma influência do meio principalmente nos primeiros anos de vida do indivíduo. No entanto, resultados recentes mostram que, na verdade, os genomas permanecem altamente

responsivos ao longo da vida a vários estímulos, inclusive aqueles associados com o comportamento social. A informação social pode levar a mudanças no cérebro e no comportamento através de efeitos sobre o genoma. Sinais sociais, além de iniciar alterações no perfil de expressão de determinados genes, podem também provocar modificações epigenéticas duradouras do genoma, que são definidas como alterações hereditárias na expressão de genes específicos que não são devidas a alterações na sequência de DNA, mas sim a alterações na estrutura da molécula, como por exemplo o estado de acetilação das histonas e de metilação do DNA (Robinson *et al.*, 2008).

O primeiro elo entre a regulação epigenética e o comportamento social foi descoberto na transmissão transgeracional do estilo maternal em ratos. Ratas que lambem, cuidam, limpam e amamentam seus filhotes extensivamente têm descendentes que são menos sensíveis ao estresse e mais responsivos aos seus próprios filhotes. Por outro lado, os filhotes que receberam menos atenção da mãe são mais facilmente estressados e mostram reduzida capacidade de resposta a seus descendentes. Essas diferenças na resposta ao estresse podem ser passadas de geração a geração, de modo que inicialmente se assumiu que a mesma seria herdada por mecanismos clássicos de herança genética. Entretanto, foi descoberto que elas decorrem do fato de que o contato frequente mãe-filhote provoca pelo menos duas conhecidas mudanças epigenéticas na metilação do DNA e muito provavelmente muitos mais eventos desse tipo. A metilação da região promotora do gene do receptor de glicocorticoide (hormônio do estresse) permite ao NGFI-A, o produto proteico do gene *Egr1*, regular a expressão destes receptores, especialmente no hipocampo. Além disso, a metilação da região promotora *α1b* do receptor de estrogênio resulta na regulação positiva da expressão de genes dos receptores de estrogênio no hipotálamo. Estes resultados indicam que os múltiplos genes são diferencialmente metilados em

resposta aos diferentes padrões de comportamento maternal. Os resultados demonstram que a experiência social, agindo através de fatores de transcrição tais como NGFI-A, pode induzir ambas as alterações, transitórias e duradouras, na expressão de genes no cérebro (Champagne *et al.*, 2003; Weaver *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2008).

A compreensão da base molecular do comportamento social apresenta um desafio intelectual formidável por várias razões. Primeiro, porque o comportamento é diverso e várias espécies devem ser usadas para extrair os princípios gerais que regem as bases moleculares do comportamento social. Dissecando um comportamento complexo em seus componentes moleculares, é possível estudar os padrões encontrados em diferentes espécies e identificar semelhanças mesmo entre espécies distantemente relacionadas filogeneticamente (Robinson *et al.*, 2005).

Mas mesmo se a profunda conservação molecular é encontrada entre diversas espécies, uma importante questão permanece: como podem vias moleculares envolvidas no comportamento serem conservadas mesmo quando as espécies mostram grandes diferenças na estrutura do cérebro e na organização geral do sistema nervoso? O segundo desafio é que o caminho molecular que liga genes e comportamento é sempre complicado: existem muitos níveis de regulação neural e neuroendócrino que ficam entre o genoma e um comportamento social, incluindo processos como transcrição, tradução, síntese de RNAs não-codificadores, modificações pós-traducionais, mudanças epigenéticas, metabolismo cerebral, atividade neural (eletroquímica) e neuromodulação. Além disso, essa regulação ocorre nos complexos e dispersos padrões temporais e espaciais dentro do cérebro, ao longo do tempo real, tempo de desenvolvimento e tempo de vida útil. O estudo do comportamento social acrescenta uma camada de complexidade, pois depende de interações e de comunicação entre os indivíduos. Na maioria dos casos, o comportamento

social deve ser estudado em um contexto natural, no qual o repertório completo de influências ambientais e os comportamentos são expressos (Hall, 2003).

Apesar dos desafios, as abordagens genéticas e genômicas são uma grande promessa para a elucidação da base molecular do comportamento social. Tem-se razoavelmente o conhecimento dos dois substratos físicos responsáveis pelo comportamento: o cérebro e o genoma. Há um forte e crescente arsenal de tecnologias e métodos cada vez mais sofisticados de biologia dos sistemas para mudanças de perfil no cérebro durante os comportamentos sociais. O momento é propício para combinar esse conhecimento e essas ferramentas para apontar uma compreensão abrangente do comportamento social em termos moleculares (Robinson *et al.*, 2008).

1.3. GENES, HORMÔNIOS E COMPORTAMENTO

Genes específicos claramente contribuem para a ocorrência de determinados comportamentos sociais de mamíferos. No caso de certos comportamentos dependentes de hormônios, mecanismos neuroquímicos conhecidos que operam em circuitos neurais podem ser especificados. No entanto, os múltiplos determinantes dos tamanhos e direções destes efeitos genéticos e as muitas rotas indiretas de causalidade fazem parecer virtualmente impossível que gráficos simples de relações genéticas e comportamentais possam ser desenhados (Faff *et al.*, 1997).

Nos vertebrados, um certo número de genes é conhecido por estar centralmente envolvido nos processos de determinação do sexo e da diferenciação gonadal. Também um número de áreas cerebrais constituem a rede neural que coordena comportamentos sociais.

Todos estes genes e regiões estabelecem interações. Isso torna possível descrever a interação dinâmica entre os componentes de cada sistema, bem como a forma como esse sistema pode mudar ao longo do tempo ou pela manipulação hormonal (Crews *et al.*, 2006).

O que inicialmente dominou o campo de neurociência comportamental foi como os hormônios organizam o processo de diferenciação sexual dos substratos neuroendócrinos de comportamentos reprodutivos. Muitos estudos com mamíferos têm documentado a importância dos cuidados maternos, influenciando o comportamento de adultos e como esses efeitos podem se estender por gerações. Mas os estudos não consideraram como o cuidado materno pode ser influenciado pela razão sexual da ninhada e como isso afeta o modo como os filhotes são tratados (Crews *et al.*, 2006).

Os exemplos mais estudados dos mecanismos de comportamentos nos mamíferos mostram que os genes, de fato, influenciam o comportamento através de rotas diretas e indiretas, em animais superiores e seres humanos. Apesar de uma longa história de trabalhos sobre organismos, como a drosófila (*Drosophila* spp.), ainda não se pode facilmente traçar as rotas causais e mecanismos pelos quais os genes poderiam influenciar o comportamento. Efeitos diretos dos genes no comportamento durante a vida adulta são claramente ilustrados pela interação do estrogênio e da progesterona com seus respectivos receptores para controlar comportamentos reprodutivos femininos. Os trabalhos iniciais indicaram que os receptores de estrogênio (ER), impulsionam o comportamento da lordose – um componente do comportamento reprodutor feminino – em muitos organismos superiores, e isto foi confirmado com antagonistas do ER. Recentemente, em camundongos nocaute para o ER (Erko), foi demonstrado que a expressão gênica clássica do ER é realmente necessária para os efeitos estrogênicos na lordose. Na verdade, a fêmea Erko é

mais masculinizada, comportando-se menos como uma fêmea genética e sendo tratada como um macho por outros camundongos (Faff *et al.*, 1997).

Da mesma forma, o gene do receptor de progesterona (PR) é necessário para efeitos de progesterona sobre o comportamento reprodutor feminino. Flutuações do mRNA do PR e seus níveis de ligação no hipotálamo correlacionam-se com o comportamento de lordose; além disso, quando DNA-antisense do PR é administrado no hipotálamo de camundongos nocaute para PR, observa-se uma redução no comportamento reprodutivo feminino. O quadro comportamental é mais complexo em machos nocautes para ER. Surpreendentemente, os machos Erko mostram praticamente nenhuma penetração ou ejaculação, mesmo que vários índices de motivação sexual pareçam normais. Em geral, tais machos deficientes em estrogênio apresentam reduções acentuadas em um subconjunto de seus comportamentos típicos masculinos e uma tendência em direção a um perfil comportamental do tipo mais feminino. Seus comportamentos agressivos são dramaticamente reduzidos e, em particular, eles mostram absolutamente nenhum ataque ofensivo típico dos machos. Suas respostas emocionais ao teste de campo aberto são desmasculinizadas. Assim, a alteração do gene Erko torna camundongos fêmeas mais masculinas, e torna camundongos machos mais femininos. O produto gênico, para o receptor nuclear de estradiol, tem efeitos diretos e indiretos sobre os comportamentos reprodutivos. Além disso, apesar de masculinização e feminização serem tipicamente vistos como “extremos opostos” de um contínuo de biologia reprodutiva, a expressão normal do gene para o ER é necessária tanto para um padrão completo de comportamento masculino como para um padrão completo de comportamento feminino (Faff *et al.*, 1997).

Mesmo ligeiros aumentos da complexidade do comportamento analisado podem levar a uma complexidade correspondente da interpretação, tal como ilustrado por

comportamentos maternos, cuja susceptibilidade à ocitocina (OT) depende das condições precisas do ensaio. Ratas severamente estressadas não foram sensíveis à OT, mas em níveis intermediários de estresse a OT facilitou seu comportamento materno. De modo mais geral, não seria de se esperar que alguns comportamentos de mamíferos dependessem apenas de um pequeno número de genes; na verdade eles são os exemplos perfeitos de traços multigênicos (Faff *et al.*, 1997).

Em roedores, a OT está altamente envolvida na interação social, no reconhecimento social e na ligação paterna e materna. Além disso, alguns estudos têm mostrado que níveis elevados de OT, no início do período pós-natal, podem afetar o comportamento na vida adulta, e a administração subcutânea de doses baixas de OT facilita o reconhecimento social (Higashida *et al.*, 2011). Os comportamentos sociais são considerados positivos, onde ocorrem benefícios mútuos, ou negativos, onde um membro pode ser excluído ou lesado. As ligações sociais se formam entre pais e filhotes, entre dois adultos ou entre outros membros do grupo e possuem várias vantagens, entre elas a de garantir a sobrevivência da espécie e a de defesa contra a predação (Uvnas-Moberg, 1998). Durante as interações sociais classificadas como positivas, a OT pode estar envolvida (Uvnas-Moberg, 1998; Lee *et al.*, 2009). Sabe-se que diferentes vias de transdução de sinais regulam a expressão dos receptores de OT e da ligação em cada região cerebral e podem, em parte, mediar a habilidade da OT de modular comportamentos sociais (Bale e Dorsa, 1995).

Em ratas, foi demonstrado que durante a gravidez, no parto e no período pós-parto ocorrem alterações nos receptores centrais de ocitocina (OXTR), especialmente no septo ventral (Landgraf *et al.*, 1991), no núcleo supraóptico do hipotálamo (Caldwell *et al.*, 1987; Mezey e Kiss, 1991; Landgraf *et al.*, 1992) e na área pré-óptica medial do

hipotálamo (Caldwell *et al.*, 1987), bem como no núcleo rubro da estria terminal, no bulbo olfatório e na amígdala. A razão provável para a expressão aumentada do OXTR é facilitar o aparecimento e manutenção do comportamento maternal (Leng *et al.*, 2008). Ruthschilling *et al.* (2012) demonstraram que os elevados níveis do OXTR no bulbo olfatório e hipocampo de mães com cuidado maternal mais acentuado, podem explicar as diferenças no comportamento maternal destas fêmeas. Outros fatores, como o estrogênio, também influenciam o aumento dos níveis de OXTR (Dekloet, 1986; Young, 1997) que, paralelamente, irá alterar o mRNA desses receptores e poderá mediar o surgimento e/ou manutenção do comportamento maternal (Bale e Dorsa, 1995; Young, 1997).

1.4. COMPORTAMENTO MATERNAL

Em mamíferos, o repertório comportamental durante a maternidade difere daquele exibido por fêmeas em outros períodos de seus ciclos reprodutivos (Ferreira *et al.*, 2002). No final da gravidez e durante os primeiros dias da lactação, as fêmeas passam por importantes mudanças hormonais e comportamentais, induzindo e permitindo a nutrição e o cuidado da prole (Numan e Insel, 2003; Giovenardi *et al.*, 2005). Para o surgimento deste comportamento a presença dos filhotes também é fundamental (Giovenardi *et al.*, 2000; Numan e Insel, 2003; Lonstein e Morrell, 2006).

Em ratos, o comportamento maternal é caracterizado por ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso no desenvolvimento dos filhotes (Mann, 2006). Um ponto de interesse que reúne aspectos evolutivos e o desenvolvimento do tamanho do cérebro humano é que os seres humanos são altamente altriciais: os cérebros dos recém-

nascidos são muito imaturos, e nosso desenvolvimento, notavelmente incluindo o desenvolvimento social, ocorre ao longo de um período prolongado de muitos anos (Adolphs *et al.*, 2009). Os filhotes de roedores também nascem altriciais, ou seja, são desprovidos de pelos, cegos, surdos, incapazes de se locomoverem, de excretarem e de manterem sua temperatura. Sendo assim, o comportamento maternal é fundamental para o sucesso no desenvolvimento da prole (Mann, 2006). Neste comportamento as mães praticam ações como a construção do ninho, o recolhimento dos filhotes quando se afastam daquele, a estimulação à micção e defecção por meio da lambida anogenital, o agrupamento dos filhotes no ninho e o posicionamento sobre eles para prover nutrição e calor (Stern e Johnson, 1990; Albert e Walsh, 1995; Mann, 2006)

No início da vida dos filhotes de ratos de laboratório, as mães ficam em torno de 85% do tempo junto deles (Grota e Ader, 1969). Nas duas primeiras semanas após o parto o comportamento maternal pode ser observado com alta frequência, posteriormente declinando e desaparecendo em torno da terceira à quarta semana após o parto. Existem variações naturais no grau de cuidado materno, especialmente na amamentação e na lambida dos filhotes (Champagne *et al.*, 2007).

O ato de lambar a prole parece expressar a motivação materna em relação à ninhada (Stern, 1997), desta forma a frequência de lambida é um comportamento nato da mãe e independe da ação do filhote. Sendo considerada uma forma rudimentar de “criação”, a lambida serve para melhorar o crescimento somático e o desenvolvimento do cérebro por meio de efeitos imediatos no sistema endócrino do filhote (Schanberg, 1984; Levine, 1994). Além do mais, em ratos de laboratório, a ingestão de urina dos filhotes por meio da lambida anogenital atenua significativamente as perdas maternas de água e eletrólito (Gubernick e Alberts, 1983).

A frequência do comportamento de lambar os filhotes tem sido utilizada como parâmetro para mensurar o cuidado maternal, apresentando um padrão de distribuição normal quando verificada em uma grande população. Assim, mães que apresentam elevada frequência (HL - *high licking*) e as que apresentam frequência reduzida (LL - *low licking*) deste comportamento, representam dois extremos de uma mesma população (Champagne *et al.*, 2003).

1.5. RATAS HL E LL

As fêmeas HL e LL apresentam duas formas distintas de manutenção da espécie: enquanto as HL buscam estratégias para obter mais qualidade (mais tempo gasto no cuidado com os filhotes, filhotes mais espertos e tranquilos), as LL buscam estratégias que maximizem a quantidade (são mais receptivas sexualmente, filhotes mais aptos a responderem em situações estressantes). As duas estratégias podem ser válidas, dependendo das necessidades exigidas em cada ambiente (Cameron *et al.*, 2008).

O padrão comportamental de cuidado maternal é estável ao longo da vida da fêmea, independente do número de ninhadas que ela terá. Além disso, diversos trabalhos demonstram que o comportamento da lambida é mantido pelas fêmeas da prole num mecanismo de transmissão intergerações não genômico. Francis *et al.* (1999) demonstrou que as filhas de mães LL, quando criadas por mães HL, adotam o comportamento da mãe que as criaram, e vice-versa. Acredita-se que este fato esteja associado a mudanças, em longo prazo, na expressão de alguns genes e como consequência, no comportamento da prole (Liu *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 1999; Champagne *et al.*, 2007).

Mães HL possuem elevados níveis de receptores de dopamina (D1 e D3) no

núcleo accumbens (Champagne *et al.*, 2006); de receptores de estrogênio α (ER α) na MPOA (Champagne *et al.*, 2003); e do receptor de ocitocina no núcleo central da amígdala, na parte ventral do núcleo do leito da estria terminal (BNST), na MPOA e na região ventral do septum (Francis *et al.*, 2000); quando comparadas com mães LL.

Sugere-se que esta diferença na expressão do ER α e na atividade dos receptores de OT, pode ser estimulada por um mecanismo ligante-independente com a ativação do sistema neurotransmissor, durante a interação com os filhotes. Isto é, ER α pode ser estimulado pelos neurotransmissores ou neuromoduladores, mesmo na ausência de estradiol circulante, quando a mãe interage com sua prole, recebendo estímulo sensorial desta. Esta indução hipotética dos neurotransmissores à atividade do ER α , pode ser capaz de aumentar a expressão neuronal dos receptores de ocitocina nas mães HL, mantendo altos os níveis de cuidados maternos (Champagne *et al.*, 2003).

1.6. ÁREAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO COMPORTAMENTO MATERNAL

Diversas áreas do SNC estão envolvidas diretamente com o processamento das emoções e exteriorização dos comportamentos (Antônio *et al.*, 2008), sendo que duas regiões são essenciais para a regulação do comportamento maternal em ratas: a área pré-óptica medial do hipotálamo (MPOA) e a parte ventral do núcleo do leito da estria terminal (BNST) (Stack *et al.*, 2002).

A MPOA contém alta concentração de receptores de estradiol (E2) e de progesterona, e seria o sítio central onde estes esteroides gonadais influenciariam o

comportamento em adultos e onde a OT atua, estimulando o comportamento maternal (Numan e Insel, 2003). Lesões nessa região bloqueiam vários comportamentos maternos, como o recolhimento dos filhotes, a construção de ninho, a amamentação e outras atividades direcionadas aos filhotes (Wellman *et al.*, 1997), sem a modificação de outros comportamentos, como atividade sexual, locomotora e regulação do peso corporal (Numan, 2006).

Neurônios da MPOA e do BNST se projetam direta ou indiretamente para muitas regiões do encéfalo que estão envolvidas na regulação do comportamento maternal, como o septo lateral, a habênula lateral, o núcleo accumbens, a área tegmental ventral e a substância cinzenta periaquedutal (Stack *et al.*, 2002).

Outra área importante na regulação do comportamento maternal é a amígdala medial (MeA), que recebe aferências do sistema olfatório principal e acessório (Numan e Insel, 2003). Ela está associada com os circuitos neurais que regulam o medo, a reação defensiva e o comportamento de fuga (LeDoux, 1996). Quando um novo estímulo olfatório é percebido, o comportamento de medo é ativado, mediado pela MeA. Nas fêmeas lactantes, este estímulo é deprimido para que o comportamento maternal possa ocorrer (Numan, 2006). Acredita-se que as projeções da MeA para a MPOA devem estimular o comportamento maternal, enquanto suas projeções para área hipotalâmica anterior e núcleo ventromedial do hipotálamo devem ser inibitórias (Numan e Insel, 2003).

O córtex cerebral é outra área relacionada com o comportamento afetivo, onde estão localizadas as funções cognitivas. O córtex de cada um dos dois hemisférios é dividido em quatro lobos anatomicamente distintos: o frontal, o parietal, o occipital e o temporal. Estes lobos são especializados em sua função (Kandel *et al.*, 1985). O córtex pré-frontal, por exemplo, compreende toda a região anterior não motora do lobo frontal. Ela se

desenvolveu muito durante a evolução dos mamíferos, sendo particularmente extensa no homem e em algumas espécies de golfinhos; apesar de não fazer parte do circuito límbico tradicional, suas intensas conexões bidirecionais com o tálamo, a amígdala e outras estruturas subcorticais explicam o importante papel que desempenha na gênese dos estados afetivos (Amaral e Oliveira, 2010). O córtex pré-frontal ventromedial e o estriado codificam o valor subjetivo de diferentes produtos ou ações durante a tomada de decisões, de uma forma que poderia guiar a escolha. Evidências sólidas indicam que os neurônios dopaminérgicos, no mesencéfalo, codificam um sinal de ensinamento que pode ser utilizado para aprender o valor subjetivo de ações. Na verdade, esses tipos de sinais podem ser suficientes para aprender os valores de diferentes experiências. Uma vez que esses mesmos neurônios dopaminérgicos projetam principalmente para regiões pré-frontais e estriatal, parece provável que eles desempenham um papel fundamental na aprendizagem do valor subjetivo (Kable *et al.*, 2009).

O hipocampo exerce importante função relacionada ao comportamento e à memória espacial e de reconhecimento, na conversão da memória de curto prazo em memória a longo prazo e na regulação da resposta ao estresse (Machado, 2006), sendo uma área integrada à tomada de decisões e, atualmente, considerada parte crucial dos sistemas neurobiológicos das emoções (Antônio *et al.*, 2008).

Também participa da circuitaria do comportamento maternal o corpo do estriado. Este consiste de três importantes subdivisões: o núcleo caudado, o putâmen e o estriado ventral, o qual inclui o núcleo accumbens – uma região envolvida com a emoção e a memória (DeLong, 2000).

O bulbo olfatório desempenha um papel essencial nas interações maternal-filiais (Gonzalez e Poidron, 2002; Lévy *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2006). O sistema olfatório,

acessório e principal, atua como mediador destas interações comportamentais. Lévy *et al.* (2004) sugerem que uma mudança profunda na regulação do olfato, modulada por modificações fisiológicas que ocorrem ao final da gestação e no parto, permitem que a fêmea responda de modo positivo ao estímulo oriundo do recém-nascido. Durante o parto, o estiramento da cervice e a dilatação da vagina estimulam a liberação de ocitocina no bulbo olfatório (Kendrick *et al.*, 1987).

1.7. PCR EM TEMPO REAL E SELEÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO

Os níveis de genes expressos dentro de uma célula podem ser alterados por uma variedade de condições, tais como a fase do ciclo celular ou após exposição da célula a fármacos, hormônios, citocinas ou outros estímulos. Portanto, a análise da expressão de genes requer a medição sensível, precisa e reprodutível de sequências de mRNA específicos. O método mais comum usado para quantificar mRNA é a amplificação de moléculas de RNA individuais através da combinação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Schmittgen *et al.* 2000), o que permite uma quantificação sensível e precisa dos níveis de expressão de mRNA. No entanto, a seleção de uma estratégia de normalização apropriada é necessária, de modo a excluir possíveis erros experimentais, fornecendo assim os dados mais confiáveis. A maioria dos experimentos de expressão gênica requerem isolamento e processamento de RNA, e a quantidade final de RNA pode variar entre amostras. Deste modo, a realização de análise de RT-PCR requer parâmetros controlados para se obter medidas quantitativas de expressão confiáveis. Estes incluem variações na quantidade inicial da amostra, recuperação e integridade do RNA, a

eficiência da síntese de cDNA e as diferenças na atividade global da transcrição dos tecidos ou células analisadas (Andersen *et al.*, 2004; Langnaese *et al.*, 2008).

A abordagem mais frequentemente aplicada para normalização em estudos de expressão de genes é a utilização de um controle interno ou de um gene de referência endógeno, muitas vezes referido como um gene *housekeeping* (HKG) ou normalizador. HKGs codificam proteínas que fornecem funções básicas e essenciais que todas as células necessitam para sobreviver. Eles devem ter os níveis de expressão estável em diferentes tipos de células e tecidos, através de fases de desenvolvimento e mesmo sob várias condições. No entanto, vários estudos têm demonstrado que os níveis de transcrição de HKGs tradicionais utilizados podem variar consideravelmente em células específicas em diferentes condições experimentais (Deind *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004; Radonic *et al.*, 2004; Dheda *et al.*, 2005; Benn *et al.*, 2008; Langnaese *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, tornou-se claro que nenhum gene é expresso constitutivamente em todos os tipos de células e sob todas as condições experimentais, o que implica que a estabilidade de expressão do gene controle escolhido tem de ser verificada antes de cada modelo experimental (Andersen *et al.*, 2004). Para ser utilizado como um gene de referência adequado, vários critérios devem ser cumpridos: o mRNA deve ser expresso de forma consistente ao mesmo nível em todas as amostras em estudo, independentemente do tipo de tecido, estado da doença, medicação ou condições experimentais; os níveis de expressão devem ser comparáveis ao do gene alvo, e a amplificação do gene de referência deve ser RNA-específica. A importância de escolher um controle interno confiável é sustentada pelo fato de que a utilização de um gene de referência instável para normalização irá obscurecer mudanças reais ou produzir alterações artificiais na expressão gênica. Portanto, a validação de um HKG para cada situação experimental é um requisito

fundamental para a aquisição de dados biológicos significativos (Langnaese *et al.*, 2008; Gubern *et al.*, 2009). Para estudos mais generalizados, a utilização da média geométrica do nível de expressão de vários genes de normalização, bem como a utilização de três a cinco genes controle diferentes, dependendo do tecido a ser estudado, é recomendada (Barber *et al.*, 2005).

O advento de técnicas de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para a medição da expressão gênica tem permitido a determinação exata dos níveis de expressão de genes alvo em células e tecidos. Vários HKGs têm sido utilizados para a normalização dos dados de expressão de genes alvo, incluindo β -actina (ActB), ciclofilina A (CypA) e ubiquitina C (UBC) (Barber *et al.*, 2005). Ensaios de qPCR utilizam corantes fluorescentes para combinar os passos de amplificação e detecção da reação de PCR. O PCR em tempo real baseia-se na medição do aumento do sinal de fluorescência, que é proporcional à quantidade de DNA produzido durante a fase logarítmica do ciclo de PCR. As reações individuais são caracterizados pelo ciclo de PCR em que a fluorescência aumenta acima de um limiar definido, um parâmetro conhecido como o ciclo limiar (Ct). Quanto mais cDNA existir no material de partida, mais baixo o valor do Ct. Esta correlação entre a fluorescência e a quantidade de produto amplificado (amplicon) permite a quantificação precisa, possuindo a sensibilidade e a especificidade inerente a um PCR convencional.

Existem dois métodos para a detecção quantitativa do amplicon: sondas *Taqman*, que são fluorescentes e gene-específicas; e *SYBR Green*, um corante fluorescente não-específico que se intercala a sequências de dupla fita de DNA. Ambos os tipos de reação funcionam muito bem, com sensibilidades comparáveis (Benn *et al.*, 2008). A qPCR permite a detecção sensível dos produtos de DNA, assegura a detecção durante o intervalo linear da amplificação, elimina a necessidade de análises pós-PCR e incorpora software

especializado para simplificar a análise dos dados (Schmittgen *et al.*, 2000).

Alguns métodos matemáticos, como *NormFinder* e *geNorm*, têm sido desenvolvidos para analisar a variabilidade de expressão de HKGs candidatos. Portanto, a avaliação cuidadosa e a validação de genes controle para cada caso é necessária antes de utilizá-los, a fim de evitar imprecisões possíveis resultantes da utilização de um gene de referência não estável. Estes algoritmos são amplamente utilizados para determinar os genes de referência mais estáveis a partir de um conjunto de genes candidatos com expressão invariável (Gubern *et al.*, 2009).

Até então, um estudo sistemático comparando a adequação dos genes referência candidatos no cérebro de ratos, para uso em diferentes modelos de comportamento, não foi realizado. Por isso, selecionamos um conjunto de amostras para analisar regiões distintas do cérebro e avaliar o HKG mais estável em áreas do SNC relacionadas com vários comportamentos sociais. Os resultados apresentados neste estudo podem ser úteis na realização de outras análises de expressão gênica no cérebro. Trabalhos anteriores, do nosso grupo de pesquisa, foram realizados com PCR convencional e com apenas um HKG (o gene da β -actina que, segundo revisão de literatura, é um dos genes constitutivos mais utilizados em estudos de expressão gênica). Para aprimorar e tornar mais confiáveis nossos futuros resultados, trocou-se a metodologia para PCR em tempo real.

Além disso, muitos estudos moleculares sobre o SNC mostram que pode haver variação na expressão gênica inclusive de genes constitutivos (Andersen *et al.*, 2004). Desta forma, neste trabalho analisou-se qual HKG é mais estável em cada uma das regiões envolvidas com o comportamento maternal.

Referências da Revisão de Literatura:

- Adolphs R. Cognitive neuroscience of human social behavior. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:165-78.
- Adolphs R. The Social Brain: Neural Basis of Social Knowledge. *Annu Rev Psychol* 2009;60:693-716.
- Aggleton J. The Amygdala. A Functional Analysis. New York: Oxford Univ. Press; 2000.
- Albert DL, Walsh ML. Aggression in the lactating female rat: the decline is not dependent on the physical development of the pups. *Physiology and behavior* 1995;58:477-81.
- Amaral JR, Oliveira JM. Sistema Límbico: O centro das emoções – Estruturas Cerebrais na formação das emoções. Disponível em: www.cerebromente.org.br/n05/mente/struct.htm Acesso em: 15/12/2012.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.
- Antônio VE, Colombo MM, Monteverde DT, Martins GM, Fernandes JJ, Assis MB, et al. Neurobiology of the emotions. *Rev de Psiquiatria Clínica* 2008;35(2).
- Bale TL, Dorsa DM. Regulation of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the ventromedial hypothalamus by testosterone and its metabolites. *Endocrinology*, 1995; 136:5135-8.
- Barber RD, Harmer D, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005;21:389-95.
- Barbey AK, Krueger F, Grafman J. Adaptive Neural Architecture for Social Reasoning. *Trends Neurosci* 2009;32(12):603-10.
- Benn CL, Fox H, Bates GP. Optimisation of region-specific reference gene selection and relative gene expression analysis methods for pre-clinical trials of Huntington's disease. *Molecular Neurodegeneration* 2008;3(17):1-17.
- Brothers L. The social brain: a project for integrating primate behavior and neurophysiology in a new domain. *Concepts Neurosci* 1990;1:27-51.
- Cacioppo JT, Amaral DG, Blanchard JJ, Cameron JL, Carter CS, et al. Social neuroscience: progress and implications for mental health. *Perspect Psychol Sci* 2007;2:99-123.
- Caldwell JD, Greer ER, Johnson MF, Prange JR, Pedersen CA. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnant and postpartum rats. *J Neuroendocrinol* 1987;46:39-47.
- Cameron NM, Shahrok A, Del C, Dhir SK, Champagne FA, Meaney MJ. Epigenetic Programming of Phenotypic Variations in Reproductive Strategies in the Rat Through Maternal Care. *J Neuroendocrinol* 2008;20:795-801.
- Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey RM, Stein D, Rasia-Filho AA, et al. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* 2006;69(2):131-9.
- Champagne DL, Bagot RC, van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, de Kloet ER, et al. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 2008;28:6037-45.
- Champagne FA, Curley JP, Keverne EB, Bateson PPG. Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiol & Behav*, 2007;91:325-34.

- Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as mediating influence of the effects of environment on development. *Phys Behav* 2003;79:359-71.
- Champagne FA, Weaver ICG, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Maternal Care Associated with Methylation of the Estrogen Receptor- α 1b Promoter and Estrogen Receptor- α Expression in the Medial Preoptic Area of Female Offspring. *Endocrinol*, 2006;147:2909-15.
- Cook NL, Kleinig TJ, van-den-Heuvel C, Vink R. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. *BMC Molecular Biology* 2010;11(7):1-11.
- Crews D, Lou W, Fleming A, Ogawa S. From gene networks underlying sex determination and gonadal differentiation to the development of neural networks regulating sociosexual behavior. *Brain Res* 2006;1126(1):109-21.
- Deind E, Boengler K, van Royen N, Schaper W. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem* 2002;236:139-46.
- Dekloet ER, Voorhuis TAM, Elands J. Estradiol induces oxytocin binding sites in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Eur J Pharmacol* 1986;118:185-6.
- Delong MR. The basal ganglia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Eds). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill 2000;43:853-67.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005;344:141-3.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojcic MB. Effects of chronic social isolation on wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology* 2012;66(2):112-9.
- Faff DWP. Hormones, genes, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA - Perspective*, 1997;94:14213-6.
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, Fernández-Guasti A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav* 2002;77:197-204.
- Fiske ST; Taylor SE. *Social Cognition: From Brains to Culture*. 3rd. New York: McGraw-Hill; 2008.
- Floreano D, Mitri S, Magnenat S, Keller L. Evolutionary conditions for the emergence of communication in robots. *Curr Biol* 2007;17:514-91.
- Fonseca ET, Diell DG, Souza SF, Mazzanti A, Weiblen R, Flores EF. Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. *Ciência Rural* 2006;36:544-9.
- Francis DD, Champagne FC, Meaney MJ. Variations in Maternal Behaviour are Associated with Differences in Oxytocin Receptor Levels in the Rat. *J Neuroendocrinol* 2000;12:1145-8.
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999;286:1155-8.
- Frith CD. The social brain? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362:671-78.
- Frith CD, Frith U. Social cognition in humans. *Curr Biol* 2007;17:724-32.
- Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HTM, Lucion AB. Pup age and Aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Medical and Biological Res* 2000;33:1-6.
- Giovenardi M, Azevedo MS, Silva SP, Hermel EES, Gomes CM, Lucion AB. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. *Physiol Behav* 2005;86:209-17.
- Gonzalez MG, Poindron P. Parental care in mammals: Immediate internal and sensory factors of control. *Horm, Brain and Behav* 2002;1:215-98.

- Goodson JL, Kabelik D. Dynamic Limbic Networks and Social Diversity in Vertebrates: From Neural Context to Neuromodulatory Patterning. *Front Neuroendocrinol* 2009;30(4):429-41.
- Grota LJ, Aser R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. *Animal Behav* 1969;17:722-9.
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Mallolas J, et al. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Molecular Biology* 2009;10(57):1-10.
- Gubernick GJ, Alberts JR. Maternal licking of young: resource exchange and proximate controls. *Physiol Behav* 1983;31:593-601.
- Hall JC. A neurogeneticist's manifesto. *J Neurogenet* 2003;17:1-90.
- Higashida H, Yokoyama S, Munesue T, Kikuchi M, Minabe Y, Lopatina O. Cd38 Gene Knockout Juvenile Mice: A Model of Oxytocin Signal Defects in Autism. *Biol Pharm Bull* 2011;34(9):1369-72.
- Kable JW, Glimcher P. The Neurobiology of Decision: Consensus and Controversy. *Neuron* 2009;63(6):733-45.
- Kandel ER, Schwartz JH. *Principles of Neural Sciences*. NY, Second Edition, Elsevier, 1985.
- Kendrick KM, Keverne EB, Baldwin BA. Intracerebroventricular oxytocin stimulates maternal behavior in the sheep. *Neuroendocrinol* 1987;4:56-61.
- Landgraf R, Neumann I, Russell JA, Pittman QJ. Push-pull perfusion and microdialysis studies of central oxytocin and vasopressin release in freely moving rats during pregnancy, parturition, and lactation. *Ann of the NY Acad of Sci* 1992;652:326-339.
- Landgraf R, Neumann I, Pittman QJ. Septal and hippocampal release of vasopressin and oxytocin during late pregnancy and parturition in the rat. *Neuroendocrinol* 1991;54:378-83.
- Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology* 2008;9(53):1-15.
- Ledoux J. *The emotional brain*. New York: Simon e Schuster 1996.
- Lee, HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS. Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog Neurobiol*, 2009; 88:127-51.
- Leng G, Meddle SL, Douglas AJ. Oxytocin and the maternal brain. *Cur Op Pharmacol* 2008;8:731-4.
- Levine S. Maternal behavior as a mediator of pup adrenocortical function. *Ann NY Acad Sci* 1994;746:260-75.
- Lieberman D, Tooby J, Cosmides L. The architecture of human kin detection. *Nature* 2007;445:727-31.
- Liu D, Tannenbaum B, Caldji C, Francis DD, Freedman A, Sharma S, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997, 277:1659-62.
- Lonstein JS, Morrel JJ. Neuropharmacology and neuroendocrinology of maternal behavior and motivation. In: Blaustein JD, editor. *Handbook of neurochemistry and molecular biology*, New York: Kluwer Press 2006;18:195-245.
- Lévy F, Keller M, Poindron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm e Behav* 2004;46:284-302.
- Machado ABM. *Neuroanatomia funcional*. São Paulo: Atheneu, 2006.
- Mann PE. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. *Physiol Behav* 2006;88:333-8.

- Mezey E, Kiss JZ. Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinol* 1991;129:1814-20.
- Numan M. Motivacional Systems and the Neural Circuitry of Maternal Behavior in the Rat. *Develop Psychobiol* 2006;12-21.
- Numan M, Insel TR. The neurobiology of parental behavior. Springer-Verlag, New York, 2003.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:856-62.
- Rasia-Filho AA, Haas D, de Oliveira AP, de Castilhos J, Frey R, Giovenardi M, et al. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev Med Chem* 2012;[Epub ahead of print]
- Robinson GE, Fernald RD, Clayton F. Genes and Social Behavior. *Science*, 2008;322(5903):896-900.
- Robinson GE, Grozinger CM, Whitfield CW. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Rev Gen* 2005;6:1-15.
- Röskam S, Koch M. Effects of neonatal and peripubertal ethanol treatment on various aspects of adult rat behavior and brain anatomy. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(3):249-56.
- Ruthschilling CA, Albiero G, Lazzari VM, Becker RO, Moura AC, Giovenardi M, et al. Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. *Behavioural Brain Research* 2012;228:176-84.
- Schanberg SM, Evoniuk G, Kuhn CM. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984;175(2):135-46.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* 2000;285:194-204.
- Stack EC, Balakrishnan R, Numan MJ, Numan M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behav Brain Res* 2002;131:17-36.
- Stern JM. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. *Dev Psychobiol* 1997;31:19-37.
- Stern JM, Johnson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in norway rats in effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol & Behav* 1990;47:993-1011.
- Uvnas-Moberg K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinol* 1998;23:819-35.
- Weaver IC, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;7:847-54.
- Wellman J, Carr D, Graham A, Jones H, Humm JL, Ruscio M, et al. Preoptic area infusions of morphine disrupt and naloxone restores parenteral like behaviour in juvenile rats. *Brain Res Bulletin* 1997;44:183-97.
- Young LJ, Muns S, Wang Z, Insel TR. Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and interleukin-6. *J Neuroendocrinol* 1997;9:859-65.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar, por meio da expressão em nível transcricional, qual o gene constitutivo mais estável em regiões encefálicas relacionadas ao comportamento maternal de ratas.

2.2. Objetivos Específicos

-Padronizar, por meio de PCR em tempo real, as reações de normalização dos genes constitutivos (β -actina, Ubiquitina-C e Ciclofilina-A).

-Verificar qual gene é mais estável nas seguintes regiões do encéfalo de ratas: bulbo olfatório (OB), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (ST); as quais relacionam-se com diferentes padrões de comportamento maternal de roedores.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico redigido segundo normas de submissão do periódico “*Journal of Molecular Neuroscience*”.

**Selecting stable housekeeping genes for evaluation of transcriptional expression levels
in behavioral models of rats**

Ana Carolina de Moura ^{a,c}, Virgínia Meneghini Lazzari ^b, Grasiela Agnes ^c, Silvana Almeida ^{b,c}, Márcia Giovenardi ^b, Ana Beatriz Gorini da Veiga ^{a,c,*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

*Corresponding author: Ana Beatriz Gorini da Veiga, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: anabgv@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

A growing number of recently published articles relate the expression of specific genes with the different patterns of behavior in rats. The quantification of mRNA in these studies is made by RT-PCR, normalized by an internal control or reference gene (housekeeping gene). In the present study we used Wistar rats (virgin females; n = 6) in the diestrus period. They were decapitated, the brains were quickly removed and the following regions

were collected: olfactory bulb (OB), hippocampus (HP), striatum (ST) and prefrontal cortex (PFC). Total RNA was extracted and cDNA was produced by semi-quantitative RT-PCR. Amplification was performed by real-time qPCR (SYBR Green) using primers for the reference genes most commonly used in the literature: β -actin (ActB), cyclophilin A (CypA) and ubiquitin C (UbC); their stability was determined using NormFinder. Results show that in the HP and ST the most stable housekeeping gene was ActB. Yet, in the PFC it was CypA, and UbC in the OB. Using our pattern of samples and having the gene selected for each brain region, further studies relating the expression of target genes with the animal behavior can be accomplished with the security of using a stable control gene.

Keywords: Wistar rat; Behavior; Brain; Housekeeping gene; Gene expression; qPCR.

Introduction

Many structures in the central nervous system (CNS), such as olfactory bulb (OB), hippocampus (HP), striatum (ST), prefrontal cortex (PFC), posterodorsal medial amygdala (MePD), and medial preoptic area (MPOA) are responsible for the appearance and maintenance of social behaviors. Understanding the molecular mechanisms involved in the regulation of signaling pathways in the CNS has been the basis of many behavioral studies in neuroscience. Such studies aim to address how a pattern of behavior is controlled by the expression of a candidate gene or group of genes (Castilhos et al. 2006; Röskam et al. 2009; Djordjevic et al. 2012; Rasia-Filho et al. 2012; Ruthschilling et al. 2012).

The levels of expressed genes within a cell can be altered by a variety of conditions, such as the cell cycle phase or upon exposure to drugs, hormones, cytokines or

other stimuli. Therefore, the analysis of gene expression requires sensitive, precise and reproducible measurement of specific mRNA sequences. The most common method used to quantify mRNA is the amplification of individual RNA molecules by combining Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (Schmittgen et al. 2000), which enables a sensitive and accurate quantification of mRNA expression levels. Nevertheless, the selection of an appropriate normalization strategy is necessary in order to exclude possible experimental errors, thus providing more reliable data. Most gene expression experiments require RNA isolation and processing, and the final amount of RNA may vary between samples. Therefore, performing RT-PCR analysis requires controlled parameters to obtain reliable quantitative expression measures. These include variations in initial sample amount, RNA recovery, RNA integrity, efficiency of cDNA synthesis, and differences in the overall transcriptional activity of the tissues or cells analyzed (Andersen et al. 2004; Langnaese et al. 2008).

The most frequently applied approach for normalization is the use of an internal control or an endogenous reference gene in studies of gene expression, often referred to as a housekeeping gene (HKG). HKGs encode proteins that provide basic, essential functions that all cells need to survive. They are supposed to have stable expression levels in different cell types and tissues, across developmental stages and even under various conditions. However, several studies have demonstrated that transcript levels of traditional used HKGs may vary considerably in specific cells under different experimental conditions (Deind et al. 2002; Andersen et al. 2004; Radonic et al. 2004; Dheda et al. 2005; Benn et al. 2008; Langnaese et al. 2008; Cook et al. 2010).

In recent years, it has become clear that no single gene is constitutively expressed in all cell types and under all experimental conditions, implying that the expression

stability of the intended control gene has to be verified before each particular experimental model (Andersen et al. 2004). To be used as a suitable reference gene, several criteria should be fulfilled: mRNA must be consistently expressed at the same level in all samples under investigation, regardless of tissue type, disease state, medication or experimental conditions; expression levels must be comparable to that of the target; and the amplification of the reference gene should be RNA-specific. The importance of choosing a reliable internal control is underlined by the fact that the use of an unstable reference gene for normalization will obscure real changes or produce artificial modifications in gene expression. Therefore, the validation of a HKG for each experimental situation is a crucial requirement for the acquisition of biological meaningful data (Langnaese et al. 2008; Gubern et al. 2009). For more generalized studies, the use of the geometric mean level of expression from several genes for normalization as well as the use of three to five different control genes, depending on the tissue being studied, are recommended (Barber et al. 2005).

The advent of quantitative real-time PCR (qPCR) techniques for the measurement of gene expression has allowed the accurate determination of the expression levels of target genes in cells and tissues. Several HKGs have been used for the normalization of target gene expression data, including β -actin (ActB), cyclophilin A (CypA) and ubiquitin C (UbC) (Barber et al. 2005).

The qPCR assay uses fluorescent reporter dyes to combine the amplification and detection steps of the PCR reaction. Real-time PCR relies on measuring the increase in fluorescent signal, which is proportional to the amount of DNA produced during the logarithmic phase of the PCR cycle. Individual reactions are characterized by the PCR cycle at which fluorescence first rises above a defined or threshold background

fluorescence, a parameter known as the threshold cycle (Ct). The more target there is in the starting material, the lower the Ct value. This correlation between fluorescence and amount of amplified product (amplicon) permits accurate quantification over a wide dynamic range, while retaining the sensitivity and specificity inherent in a conventional PCR. There are two methods for the quantitative detection of the amplicon: gene-specific fluorescent Taqman probes and SYBR green, a non-sequence specific fluorescent intercalating double-stranded DNA binding dye. Both types of reaction can work extremely well, with comparable dynamic range and sensitivity (Benn et al. 2008). qPCR allows sensitive detection of the DNA product, ensures detection during the linear range of amplification, eliminates the need for post-PCR analysis, and incorporates specialized software to simplify data analysis (Schmittgen et al. 2000).

Some mathematical methods, such as NormFinder and geNorm, have been developed to analyze the variability of the expression of candidate HKGs. Therefore, careful evaluation and validation of control genes is required prior to using them in each individual case to avoid possible inaccuracies stemming from the use of an unsuitable reference gene. These algorithms are now widely used to determine the most stable reference genes from a set of candidate genes with invariable expression (Gubern et al. 2009).

Up to now, a systematic study comparing the suitability of candidate reference genes in the rats' brain, for use in different models of behaviors, has not been performed. Therefore, we selected a sample set to analyze distinct brain regions and evaluate the most stable HKG in areas of the CNS related with various social behaviors. The results presented in this study can be helpful in further analyses of gene expression in the brain and other tissues.

Materials and Methods

Animals

Virgin female rats (Wistar; $n = 6$) with at least three consecutive regular cycles, in the diestrus period, approximately 90 days old, from the animal house of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, were used. They were housed in groups of three in Plexiglas cages (46 cm $\times$ 17 cm $\times$ 31 cm). Food and water were provided *ad libitum*. The animals were housed under controlled temperature (21 ± 1 ° C) and light (12 : 12 light–dark cycle with lights off at 5 pm) conditions.

All procedures were performed in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior Guidelines for the care and use of laboratory animals, and the protocols were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (Ruthschilling et al. 2012).

Reference gene selection and primer design

Candidate reference genes were selected from those most commonly used in the literature. Primers for CypA were as published by Peinnequin et al. (Peinnequin et al. 2004; Langnaese et al. 2008). The ActB and UbC primers were designed using the software Primer 3 (Rozen et al. 2000), based on rat sequences in the GenBank database (GenBank 2012). The specificity of the primers was checked using BLAST search against nucleotide

collection (nr) of the NCBI database. All primers were synthesized by Invitrogen (São Paulo, Brazil). The sequences of primers used are listed in Table 1.

General procedures

Brain tissue samples

Rats were decapitated and their brains were quickly removed (in less than 1 min). The following regions: OB, HP, ST, and PFC, were dissected from the left hemisphere. Soon after the samples were dissected, they were placed in tubes containing *RNA later* (Life Technologies, São Paulo, Brazil) and stored at -80 ° C (Ruthschilling et al. 2012).

Molecular analyses

RNA extraction

Total RNA was extracted from samples using Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Briefly, each brain structure was homogenized in the presence of Trizol, chloroform was added (1 : 5, v / v), and the aqueous phase was obtained after centrifugation (12,000 × g, 15 min). RNA was precipitated with isopropanol for 15 min at room temperature, followed by centrifugation at 12,000 × g for 10 min. Pellets were resuspended in 0.1 % DEPC-treated water, and RNA was quantified by spectrophotometry (Ruthschilling et al. 2012). The concentration of total RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm and the purity was checked by the 260 nm / 280 nm ratio (Langnaese et al. 2008).

RNA isolation and reverse transcription

Semi-quantitative RT-PCR has been well accepted and widely used as a valid method for analysis of gene expression in brain areas, as described elsewhere (Soria-Fregozo et al. 2008; Hatami et al. 2010; Blanco et al. 2012). For reverse transcription, 1 µg of total RNA was used as template to synthesize cDNA. RNA was first incubated with 1 µL of oligo(dT) (0.5 µg/µL, Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1 µL of dNTPs (10 mM) and DEPC-water to a final volume of 12 µL, for 5 min at 65 ° C and then for 1 min in ice. The following reagents were then added to reach a final volume of 19 µL: 4 µL of RT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) and 2 µL of DTT (0.1 M). After 2 min incubation at 37 ° C, 1 µL of the enzyme M-MLV-RT (200 U/µL, Invitrogen, São Paulo, Brazil) was added and cDNA synthesis was performed at 50 ° C for 1 h; the reaction was inactivated by incubation at 70 ° C for 15 min (Ruthschilling et al. 2012).

Real-time PCR

Amplification of reference genes was carried out using 7.5 µL of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil), 0.5 µL of forward and reverse primers (0.33 µM each), 100 ng of cDNA and nuclease-free water in a total volume of 15 µL. Reactions were performed in an optical 96-well plate, using a StepOnePlus™ thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After an initial denaturation step at 95 ° C for 10 min, amplification was performed in 50 cycles of denaturation at 95 ° C for 30 s, annealing at 60 ° C for 40 s and extension at 72 ° C for 40 s. Amplification was

followed by a melting curve analysis to confirm PCR product specificity. No signals were detected in no-template controls. The experimental Ct was calculated using the algorithm enhancements provided by the equipment. All samples were run in duplicate and the mean value of each duplicate was used for all further calculations (Langnaese et al. 2008; Cook et al. 2010; Nelissen et al. 2010).

Determination of reference gene expression stability

Reporting the data obtained from the raw Ct values falsely represents the variation and error, so it should be avoided. In this way, the expression of each HKG was calculated from the formula 2^{-Ct} . This calculation transforms the logarithmic Ct data to a linear value. The form 2^{-Ct} more accurately depicts the individual variation among replicate reactions (Schmittgen et al. 2000; Livak et al. 2001).

A publicly available software tool, NormFinder (a Visual Basic application for Microsoft Excel), was used to analyze gene expression stability. It ranks HKGs according to their expression stability using a model-based approach. The program estimates both, the intra- and the inter-group expression variation and calculates candidate gene stability values (Andersen et al. 2004; Langnaese et al. 2008). This tool requires the transformation of Ct values to linear scale expression quantities, so the average Ct values of the duplicates were therefore exported into Microsoft Excel, and changed to the 2^{-Ct} form, then the calculated quantities were entered into NormFinder (NormFinder 2012).

Results

When ranking candidate normalization genes with NormFinder, stability values were obtained as shown in Figure 1. The top ranked gene (which has the smallest stability value) is the candidate most stably expressed in the sample set investigated (Andersen et al. 2010).

In the HP and ST the most stable HKG was ActB. On the other hand, in the PFC it was CypA, and UbC in the OB.

Discussion

Many structures in the CNS are responsible for the modulation of social behaviors. The constitutive gene ActB has been used as an internal control in several studies on gene expression in the CNS, especially when semi-quantitative RT-PCR is performed (Ruthschilling et al. 2012). While some studies show that other constitutive genes, such as eukaryotic translation elongation factor (EF) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), are more stable than ActB, and thus should be used as reference genes in quantitative expression analyses in auditory cortex and cochlea of rats (Chen et al. 2009), others describe ActB as being as stable as GAPDH and that its stability depends on the tissue and conditions used in the analyses (Tanic et al. 2007; Bonefeld et al. 2008). Furthermore, many studies based on RT-PCR to evaluate gene expression in different brain regions – such as PFC, ST, HP, and cerebellum – use ActB as reference gene (Vandesompele et al. 2002; Maayana et al. 2004; Vikman et al. 2006; Soria-

Fregozo et al. 2008; Hatami et al. 2010; Blanco et al. 2012).

Our results show that ActB is the most stable HKG in the HP of our sample set. In a study by Langnaese et al. (2008), ActB and CypA were shown to be the most stable genes in the HP of their analysis. These two HKGs were also used as control genes by Nishida et al. (2006), because their expression levels are considered stable in this brain area. On the other hand, Honkaniemi et al. (1997), used only CypA in an ischemia model when studying the HP.

In ST we also found ActB as being the most stably expressed gene. However, Benn et al. (2008) identified that UbC is more stable than ActB in this area. Honkaniemi et al. (1997) examined the expression of CypA to compare the ischemic changes with general transcriptional levels in the ST.

CypA displayed the most stable expression in the PFC according to our analysis. Previous studies on gene expression levels made use mainly of one of the traditional HKGs as GAPDH, 18S or CypA in the whole brain of adult Wistar rats (Nelissen et al. 2010). Honkaniemi et al. (1997) also examined the expression of CypA in the cortex of rats in an ischemic model. Furthermore, Benn et al. (2008) identified UbC as being stably expressed in cortex, better than ActB. On the other hand, Yamada et al. (2005) used ActB as a reference for gene amplification, as well as Soria-Fregozo et al. (2008), that chose ActB as an internal control for quantifying mRNA in the PFC.

We found that UbC is the most stable HKG in the OB. UbC has been used in several studies of gene expression, such as in human brain (Vandesompele et al. 2002; Coulson et al. 2008) and rat liver (Xing et al. 2009), even though Wong et al. (2000) have analyzed the expression of ActB and CypA in the OB of rats. This area has been known to play crucial roles in induction of maternal behavior (Kendrick et al. 1997), olfactory

recognition of the offspring (Lévy et al. 1995) and preservation of social recognition (Dluzen et al. 2000). In analysis of this kind of behavior, ActB has been used as reference gene based on several studies about gene expression in the CNS (Ruthschilling et al. 2012).

It has been broadly shown that RNAs play an important role in controlling gene expression in the CNS in mammals. Noncoding RNA molecules, such as miRNA, snoRNAs, snRNAs and other unknown RNA molecules have been shown to be involved in post-transcriptional gene expression regulation in different brain areas, thus mRNA levels not always correlate with protein levels in mammals. Also, molecular mechanisms such as alternative splicing and RNA editing might also modulate gene expression and be associated with brain diseases. Therefore, when studying the expression of specific genes, especially in the CNS, it is important to take into account protein production levels besides mRNA transcriptional levels (Nelson et al. 2007).

The variations on the stability of HKGs in the different CNS areas probably occur due to the variability in the samples used in each study. Therefore, the validation of reference genes for each experimental situation is a crucial requirement for the acquisition of meaningful and reliable data for any sort of social behavior analysis. Once the HKG has been selected for each CNS area, further analysis relating the expression of target genes with rat behavior can be accomplished with the security of using a stable control gene for the regions related with animal behavior.

References

- Andersen CL, Gundersen C, Adolf K, Jensen JL. Documentation for NormFinder version 20, 2010. [www.mdl.dk]
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse

transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.

Barber RD, Harmer D, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005;21:389-95.

Benn CL, Fox H, Bates GP. Optimisation of region-specific reference gene selection and relative gene expression analysis methods for pre-clinical trials of Huntington's disease. *Molecular Neurodegeneration* 2008;3(17):1-17.

Blanco E, Campos-Sandoval JA, Palomino A, Luque-Rojas MJ, Bilbao A, Suárez J, et al. Cocaine modulates both glutaminase gene expression and glutaminase activity in the brain of cocaine-sensitized mice. *Psychopharmacology* 2012;219(4):933-44.

Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* 2008;62:302-9.

Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey RM, Stein D, Rasia-Filho AA, et al. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* 2006;69(2):131-9.

Chen J, Ruan R. Identifying stable reference genes for evaluation of antioxidative enzyme gene expression in auditory cortex and cochlea of young and old Fischer 344 rats. *Acta Otolaryngol* 2009;129:644-50.

Cook NL, Kleinig TJ, van-den-Heuvel C, Vink R. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. *BMC Molecular Biology* 2010;11(7):1-11.

- Coulson DTR, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Johnston JA, et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Molecular Biology* 2008;9(46):1-11.
- Deind E, Boengler K, van Royen N, Schaper W. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem* 2002;236:139-46.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005;344:141-3.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojcic MB. Effects of chronic social isolation on wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology* 2012;66(2):112-9.
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R. Oxytocin induces preservation of social recognition in male rats by activating alpha-adrenoceptors of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2000;12(2):760-6.
- GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>]
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Mallolas J, et al. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Molecular Biology* 2009;10(57):1-10.
- Hatami H, Hossainpour-Faizi MA, Azarfarin M, Azarfam P. Chronic ecstasy use increases neurotrophin-4 gene expression and protein levels in the rat brain. *Pharmacol Rep* 2010;62:998-1004.
- Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR. Expression of Zinc Finger Immediate Early Genes in Rat Brain After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1997;17:636-46.

- Kendrick KM, Da Costa AP, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Lévy F, et al. Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Res Bull* 1997;44(4):383-95.
- Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology* 2008;9(53):1-15.
- Lévy F, Kendrick KM, Goode JA, Guevara-Guzman R, Keverne EB. Oxytocin and vasopressin release in the olfactory bulb of parturient ewes: changes with maternal experience and effects on acetylcholine, gamma-aminobutyric acid, glutamate and noradrenaline release. *Brain Res* 1995;669(2):197-206.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- Maayana R, Fischb B, Galdora M, Kaplanb B, Shinnarc N, Kinord N, et al. Influence of 17h-estradiol on the synthesis of reduced neurosteroids in the brain (in vivo) and in glioma cells (in vitro): possible relevance to mental disorders in women. *Brain Res* 2004;1020:167-72.
- Nelissen K, Smeets K, Mulder M, Hendriks JJA, Ameloot M. Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. *Journal of Neuroscience Methods* 2010;187:78-83.
- Nelson PT, Keller JN. RNA in Brain Disease: No Longer Just “The Messenger in the Middle”. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66(6):461-8.
- Nishida Y, Sugahara-Kobayashi M, Takahashi Y, Nagata T, Ishikawa K, Asai S. Screening for Control Genes in Mouse Hippocampus After Transient Forebrain Ischemia Using High-Density Oligonucleotide Array. *J Pharmacol Sci* 2006;101:52-7.

NormFinder [<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>]

Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Multon E, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 2004;5(3):1-10.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:856-62.

Rasia-Filho AA, Haas D, de Oliveira AP, de Castilhos J, Frey R, Giovenardi M, et al. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev Med Chem* 2012;[Epub ahead of print]

Röskam S, Koch M. Effects of neonatal and peripubertal ethanol treatment on various aspects of adult rat behavior and brain anatomy. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(3):249-56.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86.

Ruthschilling CA, Albiero G, Lazzari VM, Becker RO, Moura AC, Giovenardi M, et al. Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. *Behavioural Brain Research* 2012;228:176-84.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* 2000;285:194-204.

Soria-Fregozo C, Pérez-Vega MI, González-Burgos I, Feria-Velasco A, Beas-Zárate C.

- Prefrontal serotonergic denervation induces increase in the density of 5-HT_{2A} receptors in adult rat prefrontal cortex. *Neurochem Res* 2008;33:2350-7.
- Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S. Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci* 2007;32:38-46.
- Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van-Roy N, Speleman F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3(7):1-12.
- Vikman P, Edvinsson L. Gene expression profiling in the human middle cerebral artery after cerebral ischemia. *Eur J Neurol* 2006;13:1324-32.
- Wong CC, Poon WH, Tsim TY, Wong EY, Leung MS. Gene expressions during the development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;119(2):187-94.
- Xing W, Deng M, Zhang J, Huang H, Dirsch O, Dahmen U. Quantitative Evaluation and Selection of Reference Genes in a Rat Model of Extended Liver Resection. *Journal of Biomolecular Techniques* 2009;20:109-15.
- Yamada M, Iwabuchi T, Takahashi K, Kurahashi C, Ohata H, et al. Identification and Expression of Frizzled-3 Protein in Rat Frontal Cortex After Antidepressant and Electroconvulsive Treatment. *J Pharmacol Sci* 2005;99:239-46.

Fig. 1 Stability values of the candidate housekeeping genes (HKGs) in different areas of the central nervous system. ActB: β -actin; CypA: cyclophilin A; UbC: ubiquitin C.

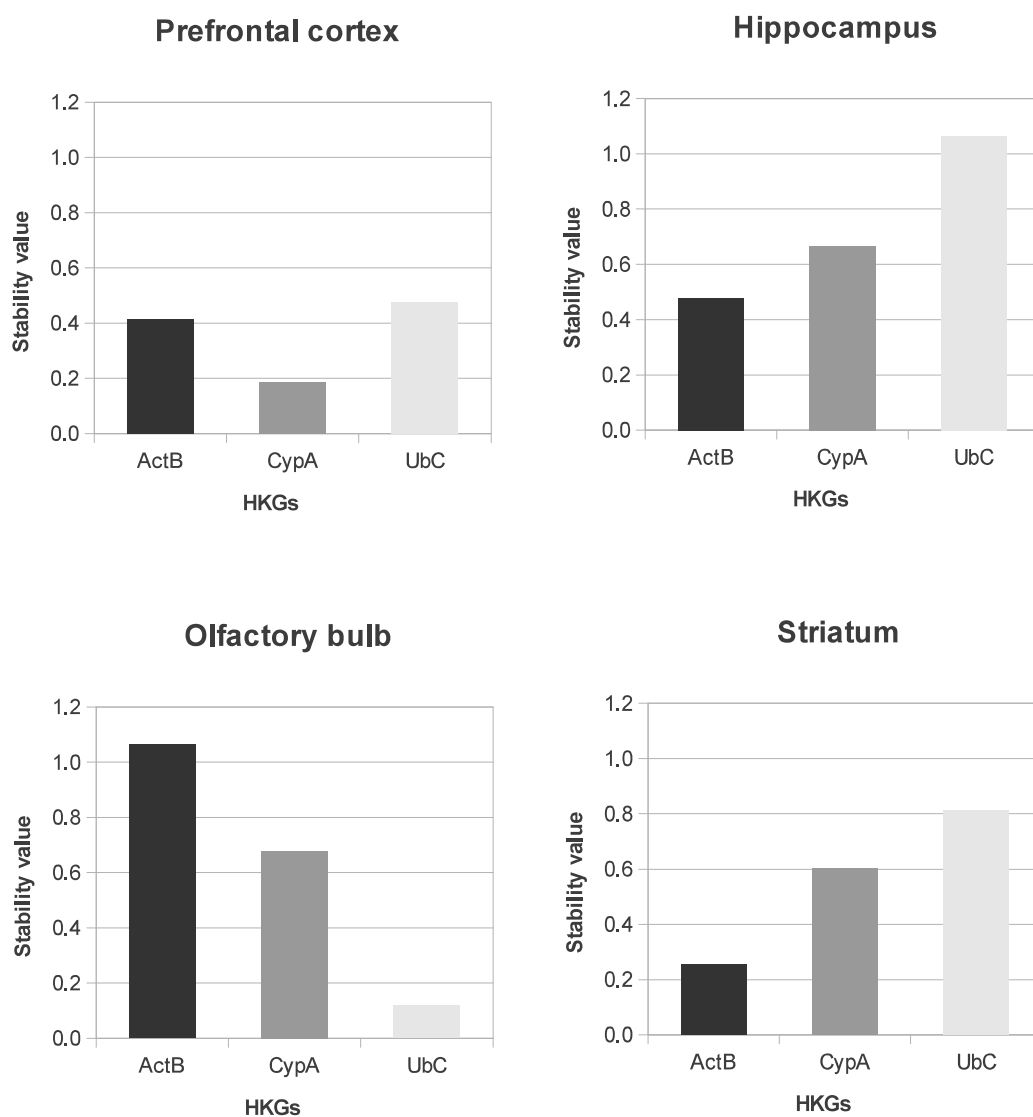


Table 1 Housekeeping genes selected for this study, sequences of primers and gene function.

HKG	Primer F	Primer R	Function (<i>Langnaese et al.</i> 2008)
ActB	5'TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG3'	5'TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT'3	Cytoskeletal structural protein
CypA	5'TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG3'	5'CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC3'	Accelerate folding in oligopeptides
UbC	5'TTTCCATAGACAATGCAGATCTTT3'	5'AGGGTGGACTCCTTCTGGAT3'	Protein degradation

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, Ruthschilling e cols. (2012) analisaram a expressão, em nível transcricional, do receptor de ocitocina (OXTR) em diferentes áreas do encéfalo de ratas lactantes, que apresentam diferentes padrões de comportamento maternal (*high* e *low licking* – HL e LL, respectivamente). Os resultados foram publicados no periódico *Behavioural Brain Research* (Ruthschilling *et al.* 2012). Também foram analisados os níveis de expressão do receptor alfa de estrogênio (Esr1) nessas ratas (dados não publicados, anexo 1). Ambas as análises foram realizadas por PCR convencional semi-quantitativo, e os níveis de expressão do OXTR e do Esr1 foram comparados com os níveis de expressão do gene constitutivo da β -actina.

Após a submissão do artigo sobre o OXTR para o periódico *Behavioural Brain Research*, os revisores sugeriram a utilização da PCR em tempo real (qPCR), por proporcionar resultados mais confiáveis do que a PCR convencional, bem como a padronização de mais de um HKG. Quando da submissão desse primeiro artigo, não dispúnhamos de termociclador em tempo real, portanto as análises do OXTR e do Esr1 foram realizadas por PCR semi-quantitativo. Por outro lado, para aprimorar e tornar mais confiáveis os resultados do estudo, a metodologia está sendo padronizada com base em qPCR. Além disso, considerando que variações nos níveis de expressão gênica são observadas no SNC, inclusive para HKGs, é fundamental o conhecimento sobre qual HKG é mais estável em cada uma das regiões envolvidas com o comportamento maternal, o que nos levou a desenvolver as análises que deram origem aos resultados aqui apresentados.

Com a comprovação da grande importância de verificar a estabilidade de

expressão de diferentes HKG, nas diversas regiões do encéfalo de ratas, é de grande relevância analisar a estabilidade destes, para se obter um resultado mais fidedigno ao compará-los aos níveis de expressão dos genes alvo que serão analisados no estudo dos diferentes padrões de comportamento maternal das ratas lactantes.

Após a verificação, aqui apresentada, de qual HKG é mais estável em cada região encefálica, realizou-se a análise do receptor de dopamina (*Drd1a*) (dados ainda não publicados, anexo 2). Também serão repetidas as análises de expressão do *Esr1*, desta vez por qPCR, esperando-se encontrar resultados semelhantes ao da PCR semi-quantitativa.

5. ANEXOS

Anexo 1: Análise do receptor de estrógeno

Introdução:

O estrógeno, importante esteroide gonadal, apresenta flutuações na sua concentração plasmática e na expressão de seus receptores em várias regiões do cérebro durante o período gestacional e pós-parto. Provavelmente, o aumento de estrógeno circulante e do receptor estrogênico Esr1 (rER α =receptor alfa) é um dos fatores que contribui para o desencadeamento do comportamento maternal.

Objetivo:

Analisar a expressão do receptor Esr1 no bulbo olfatório (OB), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (ST) de ratas lactantes classificadas como HL e LL.

Metodologia:

-**Animais:** ratas lactantes *Wistar*, do biotério da UFCSPA, pesando aproximadamente 230g, mantidas em sala com ciclo claro/escuro (12h/12h), temperatura de aproximadamente 22°C, com livre acesso à água e comida.

-**Comportamento maternal:** estudado do 1º ao 7º dia pós-parto. Após análise, foi feita a divisão em 2 grupos conforme o comportamento de lambar os filhotes: HL (frequência do comportamento de lambar acima do quartil superior; n=8) e LL (frequência do comportamento de lambar abaixo do quartil inferior, n=8). No 8º dia, as ratas foram sacrificadas por decapitação e as estruturas encefálicas foram retiradas e congeladas em RNA *later* a -80°C.

-**Análise molecular:** extração de RNA, síntese de cDNA por transcrição reversa e avaliação dos receptores por PCR (semi-quantitativo) com *primers* específicos.

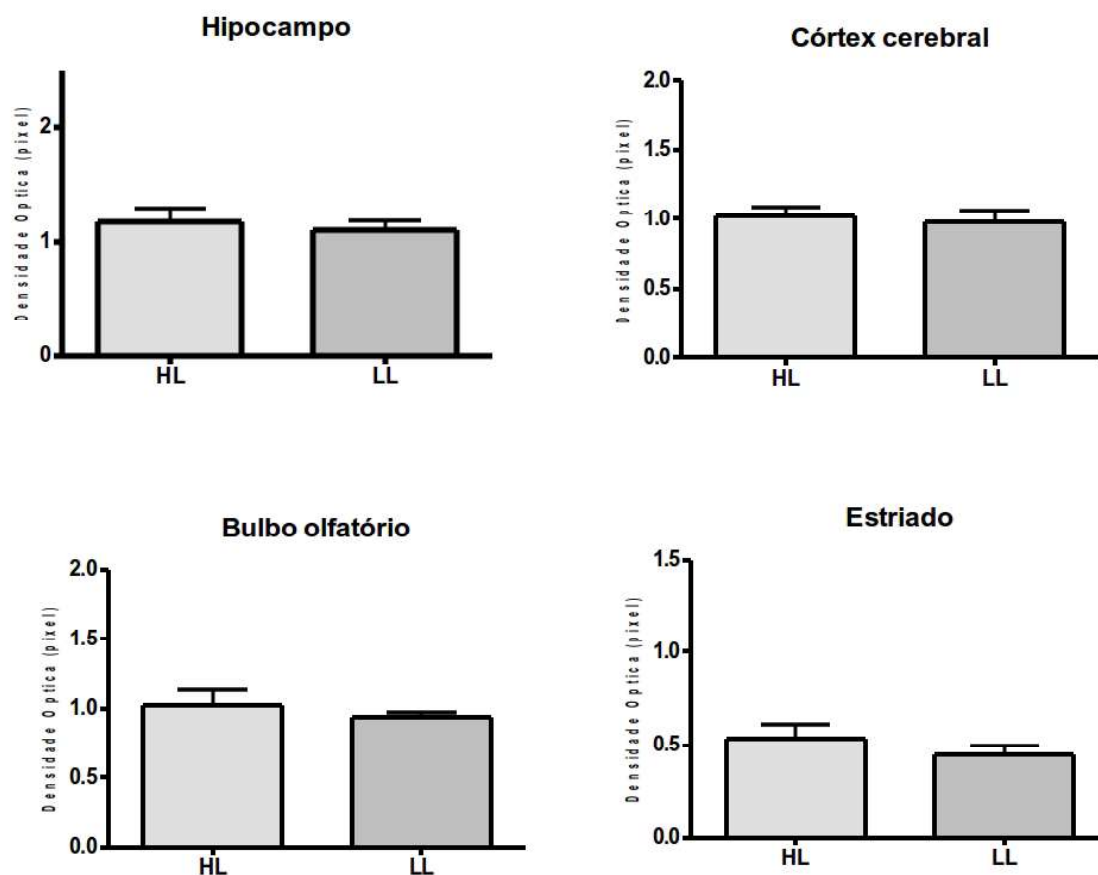
-**Esr1:** análise por PCR convencional, com eletroforese em gel de agarose e avaliação da densidade óptica pelo programa *Gel pro-analyser*. Os níveis de expressão do gene constitutivo β -actina foram também avaliados. Os dados foram expressos por médias e comparados pelo teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

Resultados:

Conforme pode ser observado nos gráficos a seguir, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na expressão do receptor alfa de estrógeno entre o grupo HL, quando comparado ao LL, nas estruturas estudadas [HP ($p=0,61$); CPF ($p=0,54$); OB ($p=0,45$); ST ($p=0,39$)].

Conclusões:

De acordo com os resultados pode-se concluir que não há relação entre a expressão dos receptores Esr1, nas áreas estudadas, com as diferenças no comportamento maternal (medida pelo comportamento de lambar os filhotes) de ratas HL e LL.



Gráficos representando as análises de densidade óptica (DO) das bandas obtidas na eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR para o *Esr1*. A DO da banda correspondente ao cDNA de *Esr1*, de cada amostra, foi normalizada com a DO da respectiva banda correspondente ao cDNA de β -actina (gene constitutivo). Os valores foram expressos por médias ($\pm$ E.P.M.) e comparados pelo teste de Mann-Whitney U ($p < 0,05$).

Anexo 2: Análise do receptor de dopamina

Introdução:

A dopamina é um neuromodulador importante que exerce ações generalizadas sobre o sistema nervoso central, podendo ter profundos efeitos sobre motivação, prazer e recompensa, influenciando, desta forma, comportamentos sociais, como o comportamento maternal de roedores.

O cuidado materno pode ser avaliado pela frequência com que a mãe lambe seus filhotes. Tal comportamento apresenta um padrão de distribuição normal com dois extremos, havendo mães com elevada frequência de lambe (HL) e mães com reduzida frequência (LL).

Objetivo:

Analisar a expressão do receptor de dopamina (Drd1a) no bulbo olfatório (OB), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (ST) de ratas lactantes classificadas como HL e LL.

Metodologia:

-Animais: ratas lactantes *Wistar*, do biotério da UFCSPA, pesando aproximadamente 230g, mantidas em sala com ciclo claro/escuro (12h/12h), temperatura de aproximadamente 22°C, com livre acesso à água e comida.

-Comportamento maternal: estudado do 1º ao 7º dia pós-parto. Após análise, foi feita a divisão em 2 grupos conforme o comportamento de lambe os filhotes: HL (frequência do comportamento de lambe acima do quartil superior; n=8) e LL (frequência do comportamento de lambe abaixo do quartil inferior, n=8). No 8º dia, as ratas foram sacrificadas por decapitação e as estruturas encefálicas foram retiradas e congeladas em RNA later a -80°C.

-Análise molecular: extração de RNA, síntese de cDNA por transcrição reversa e avaliação dos receptores por qPCR com *primers* específicos.

-Drd1a: análise por PCR em tempo real com SYBR Green®, usando como controle interno os genes constitutivos de β -actina no HP e ST, Ubiquitina-C no OB e Ciclofilina-A no CPF, os quais se mostraram mais estáveis em cada estrutura em experimentos preliminares, analisados pelo programa *NormFinder*. Também analisou-se um grupo (n=6) composto por ratas virgens no período de diestro. Após a análise de eficiência de expressão entre os genes constitutivos e o Drd1a, os dados foram avaliados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, obtendo-se a quantificação relativa dos receptores.

Resultados:

Conforme apresentado no gráfico a seguir, no bulbo olfatório as ratas HL expressaram 5 vezes mais Drd1a do que as ratas LL; e as ratas LL expressaram o receptor 2,78 vezes menos que fêmeas em diestro. No hipocampo, os grupos HL e LL expressaram cerca de 3 vezes mais Drd1a que as ratas em diestro e, no corpo estriado, as fêmeas HL e LL expressaram cerca de 3 vezes menos Drd1a que fêmeas em diestro. No córtex pré-frontal não houve diferença na expressão de Drd1a nos grupos.

Conclusões:

O estado reprodutivo da fêmea altera a expressão gênica do Drd1a no SNC. No bulbo olfatório e no hipocampo, fêmeas lactantes apresentaram aumento na expressão quando

comparadas a virgens e diminuição na expressão no corpo estriado. Apenas no bulbo olfatório ratas HL (que possuem cuidado maternal aumentado) expressaram mais Drd1a do que LL. Este resultado, juntamente com outros da literatura, explicaria a diferença no padrão comportamental entre HL e LL.

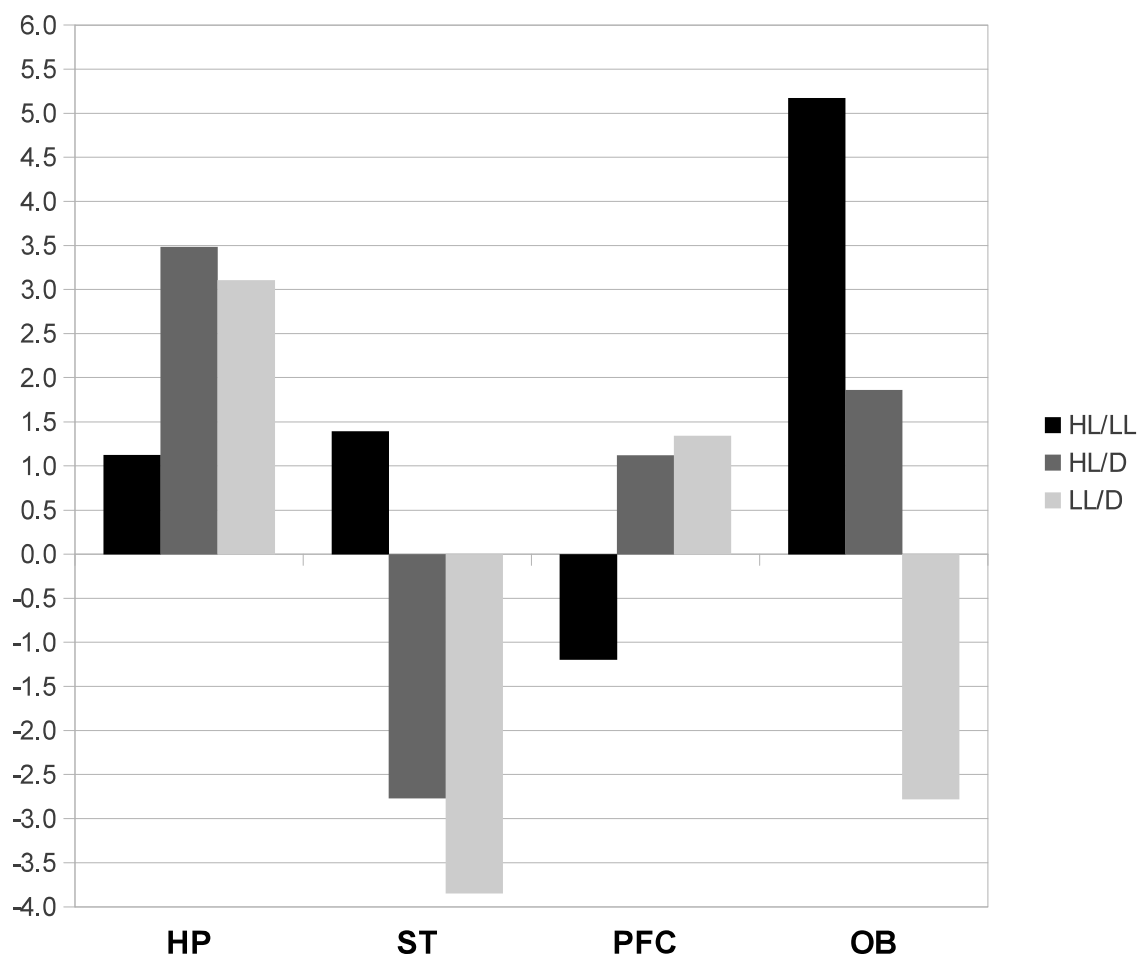


Gráfico demonstrando a relação da quantidade de expressão do receptor de dopamina entre os grupos high licking, low licking e diestro, nas diferentes áreas do SNC analisadas.

Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
RUA SARMENTO LITE, 245 - FONE: (51) 3303.8804
CEP 90050-170 - PORTO ALEGRE - RS - cep@ffcmmpa.edu.br

Of. 581/08-CEP

Porto Alegre, 10 de abril de 2008

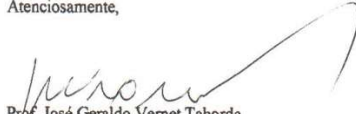
Ilma. Sra.
Profª Márcia Giovannardi
Nesta Universidade

Prezada Pesquisadora

Informamos que seu projeto "Avaliação de comportamento de ratas lactantes: Investigação de depressão pós-parto, efeito do estresse pós-parto gestacional e análise da concentração de hormônios relacionados ao estresse", Processo nº 355/08, foi avaliado pelo Comitê de Ética e Pesquisa, na reunião do dia 10 de abril de 2008, sendo o projeto considerado aprovado, conforme parecer consubstanciado nº 590/08, anexo.

Outrossim, informamos que de acordo com o art. 4º, letra c do Regulamento do CEP, V.Sa. deverá nos encaminhar relatórios semestrais do desenvolvimento do projeto.

Atenciosamente,


Prof. José Geraldo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/UFCSA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação de comportamentos de ratas lactantes: investigação de depressão pós-parto, efeito do estresse gestacional e análise da concentração de hormônios relacionados ao estresse.

Pesquisador Responsável: Márcia Giovannardi

Data da Versão 03/06/2008 Cadastro 355/08 Data do Parecer 25/01/2008

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Estudar o comportamento materno e emocional de ratas lactantes bem como as concentrações plasmáticas dos hormônios prolactina e ocitocina, e a produção de leite de ratas que sofrem de estresse gestacional e estresse no período pós parto. Os resultados obtidos no presente estudo serão comparados com os resultados já descritos na literatura de mulheres com o quadro de DPP e desta forma pretende-se verificar se existem semelhanças nas respostas comportamentais e endócrinas entre o modelo animal e os seres humanos. Identificar numa amostra de ratas e fêmeas, os comportamentos extremos de cuidado com a prole. Desta forma, serão classificados como mães high licking (HL) aquelas que apresentarem frequência no comportamento de lambar acima do quartil superior e como mães low licking (LL) aquelas que apresentarem frequência do comportamento de lambar abaixo do quartil inferior. Verificar se diferentes privações ao longo da gestação promovem níveis de estresse que possam alterar o comportamento materno e emocional das fêmeas ao longo do período de lactação. Verificar se o estresse agudo diário altera a produção de leite na fêmea lactante.

Sumário do Projeto

Em humanos a gestação, o parto e a lactação caracterizam-se por intensas alterações hormonais e comportamentais que são as fisiológicas e metabólicas que podem promover maior vulnerabilidade no desencadeamento de transtornos de humor. Em animais como roedores as alterações comportamentais observadas no período pós-parto parecem depender de mudanças hormonais que ocorrem no final da gestação, parto, início da lactação bem como, da presença de filhotes. Os resultados do presente estudo poderão auxiliar na padronização de um modelo animal de DPP, que pode ser útil no conhecimento de fatores ambientais, durante o período de gestação e lactação.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria Instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os Itens de Identificação

Laboratório de Fisiologia da FFCMPA	Adequada
Introdução	Adequada

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
Comentários sobre os Objetivos	

Pacientes e Métodos	
---------------------	--

Desenho	Ausente
Tamanho de amostra	Total 70 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - qualitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	31/01/2008
Data de término prevista	30/03/2010
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Serão utilizados materiais de consumo do laboratório de Fisiologia, e será submetido a FAPERGS e CNPq na tentativa de obter recursos também.

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Fica aprovado o adendo quanto a:
- Troca de autores. Inclusão dos autores: Profa. Ana Beatriz Gorini e alunas Mariana Azevedo e Carina Ruthschilling. Exclusão da autora Tatian Mattos.
- Alteração do título para: Análise comportamental, hormonal e molecular de ratas lactantes e sua relação com o comportamento materno.
- Inclusão de um novo item em Material e Métodos no experimento 1.

Parecer número: 788/09