

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

**Efeito da gonadectomia pós-parto sobre os comportamentos maternal,
agressivo maternal e de ansiedade/medo e sobre a prolactina de ratas
lactantes**

FABIANA LEOPOLDO DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-orientador: Profa. Dra. Márcia Giovenardi

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

Porto Alegre, junho de 2007

Aos meus pais pela conscientização da importância da formação acadêmica como o melhor meio de inserção social e por terem despertado em mim o prazer pelo estudo.

Ao meu marido e melhor amigo Márcio Martins de Sousa pelo amor demonstrado através de todo incentivo e ajuda que possibilitaram esta conquista. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e por todos os valiosíssimos ensinamentos durante a realização deste trabalho, inclusive àqueles abordados nas reuniões das sextas-feiras.

À minha Co-Orientadora Prof. Dra. Márcia Giovenardi pela oportunidade de inserção no meio científico; por ser um exemplo de profissionalismo, dedicação, seriedade e por todo o apoio, incentivo, paciência e ajuda principalmente nas horas mais difíceis. Não encontro palavras para agradecer.

À minha mãe Jussara Inácia Leopoldo, pelo amor, apoio e compreensão de minha ausência em todos estes anos de dedicação à vida acadêmica.

Ao meu marido Márcio Martins de Sousa, pela preocupação, incentivo e paciência que teve comigo desde o final da minha graduação.

Aos meus filhos pela espera para serem concebidos.

Aos meus irmãos e cunhadas pela torcida e apoio ao longo da minha formação.

À Natália Uriarte pelos ensinamentos sobre o protocolo do comportamento maternal e pelas importantes discussões que tivemos a respeito dos resultados.

Aos alunos de iniciação científica João e Dariane pelo auxílio nos experimentos.

Ao bioterista Dirson Stein pelo respeito e impecável cuidado com os ratos e por toda ajuda ao longo deste trabalho.

A todos os parentes e amigos que torceram por mim e entenderam minha ausência durante esses anos.

Aos amigos que fiz desde 2004, no nosso querido laboratório 11, pela convivência muito agradável e pelo apoio nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci pelas dosagens hormonais feitas em seu laboratório na USP de Ribeirão Preto.

À Alice, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela paciência e dedicação empregadas todas as vezes que a procurei.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por ter me aceitado como aluna de mestrado e possibilitado a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pelos ensinamentos e preocupação com a formação de seus alunos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	6
Resumo.....	7
1. Introdução.....	8
1.1 Comportamentos de ratas lactantes.....	8
1.2 Hormônios gonadais e prolactina	12
1.3 Hormônios gonadais e comportamento.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1 Animais	18
3.2 Grupos experimentais	18
3.3 Cirurgia de ovariectomia	19
3.4 Testes comportamentais	19
3.5 Medidas hormonais	22
3.6 Análise estatística	22
4. Resultados	28
5. Discussão	36
6. Conclusões.....	41
7. Perspectivas.....	42
8. Referências Bibliográficas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

3 α -5 α -THP	3 α -hydroxi-5 α -pregnan-20-one, Allopregnanolona
E2	Estrógeno, estradiol
DA	Dopamina
DPP	Dia pós-parto
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor ionotrópico tipo "A", do ácido γ -aminobutírico
LH	Hormônio Luteinizante
OVX	Ovariectomizadas
P4	Progesterona
PRL	Prolactina
TIDA	Neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos

RESUMO

No final da gestação e nos primeiros dias da lactação, as fêmeas passam por importantes mudanças hormonais e comportamentais que induzem e permitem a nutrição e cuidado da prole. O início da responsividade maternal aos filhotes depende da elevação das concentrações de progesterona (P4), estradiol (E2), e prolactina (PRL) durante a gestação, seguida pela queda da P4 no parto. Em ratos, o comportamento maternal pode ser observado com alta frequência durante as duas primeiras semanas após o parto. Além de apresentarem comportamento maternal, ratas lactantes são altamente agressivas neste mesmo período e apresentam uma significativa redução da ansiedade. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel dos hormônios gonadais na modulação dos comportamentos maternal, agressivo maternal e de ansiedade/medo de ratas lactantes. Para isso, as mesmas foram ovariectomizadas (OVX) ou sham OVX (SHAM) no 1º dia pós-parto e foram realizados registros do comportamento maternal, agressivo maternal além dos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Além disso, foram verificadas as concentrações plasmáticas de P4 e PRL das ratas lactantes e o peso das ninhadas visando o controle nutricional dos filhotes. A gonadectomia reduziu a frequência dos comportamentos maternal e agressivo maternal, mas eles continuaram presentes e os filhotes ganharam peso normalmente. A redução significativa dos hormônios gonadais provocou um moderado aumento da ansiedade de fêmeas lactantes, e aumentou a secreção de PRL. Estes resultados indicam que os hormônios gonadais não são essenciais para o aumento de atividades maternais dirigidas aos filhotes, aumento da agressividade materna contra intrusos que se aproximam da área do ninho e redução da ansiedade observados em fêmeas lactantes, ou que estes hormônios atuam antes do parto. A primeira hipótese é improvável, considerando os estudos bem documentados que mostram que os hormônios gonadais exercem um importante efeito sobre estes comportamentos. Assim, nós podemos concluir que os hormônios das gônadas provocam alterações sobre os comportamentos de ratas lactantes atuando durante a gestação e o no parto. Além disso, durante a lactação, os hormônios gonadais parecem exercer um efeito inibitório sobre a secreção de PRL.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamentos de ratas lactantes

O repertório comportamental dos mamíferos 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 que induzem e permitem a nutrição e cuidado da prole (Russel et al. 2001; Numan e Insel 2003; Giovenardi et al. 2005).

O comportamento maternal inclui ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso no desenvolvimento de seus filhotes (Mann 2006). Os filhotes de ratos nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (Grotta e Ader 1969; Grotta e Ader 1975). Em ratos de laboratório, o comportamento maternal pode ser observado com alta frequência durante as duas primeiras semanas após o parto, declinando posteriormente, até desaparecerem em torno da terceira a quarta semana após o parto. Associado a isso é possível notar o comportamento de rejeição da mãe em relação à sua prole (para uma revisão ver Numan 1994). O comportamento maternal inclui construção do ninho, recolhimento dos filhotes quando estes se afastam do ninho, estimulação à micção através da lambida anogenital, agrupamento dos filhotes no ninho e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição e calor (Mann 2006; Stern e Johnson 1990; Albert e Walsh 1995) (figura 1). Nos primeiros dias de vida dos filhotes, as lactantes passam até 85% do tempo total junto deles (Grotta e Ader 1969). Elas podem se manter por cima da ninhada com uma postura arqueada que deixa as mamas mais expostas e facilita a ejeção do leite pelo estímulo de sucção dos filhotes. Para essa postura, é necessário que os mesmos estejam vivos, quentes e presos aos mamilos (Stern e Johnson 1990).

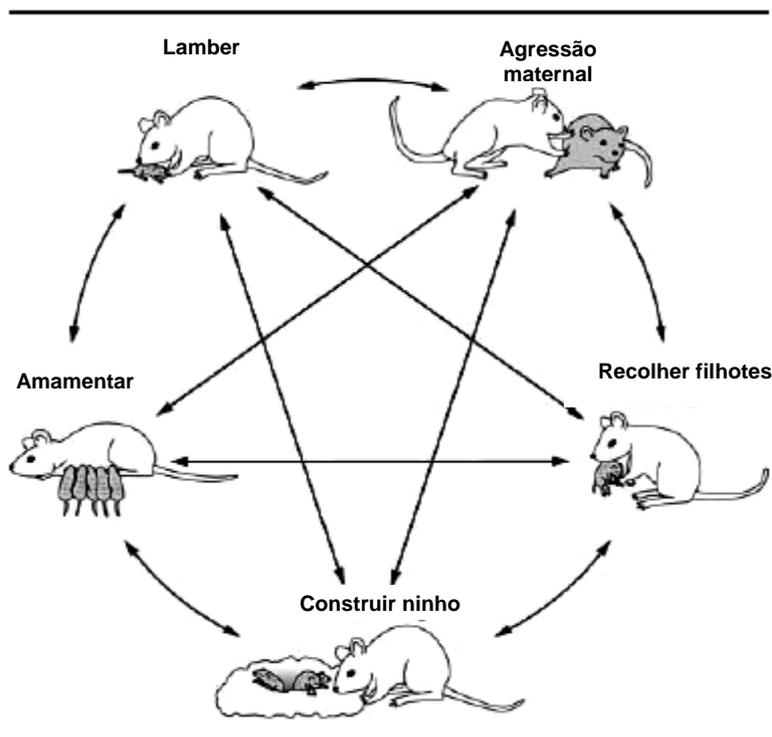


Figura 1: Desenho de um subconjunto de comportamentos maternos incluindo recolher filhotes, construir ninho, amamentar, lambar e agressão maternal (contra um intruso) adaptado de Gammie 2005.

Além do comportamento maternal, ratas lactantes apresentam comportamento agressivo. A agressão maternal consiste em comportamentos específicos executados pela mãe em relação a um intruso, com ou sem a intenção de lesá-lo (Huntingford 1989). Ratas lactantes demonstram altos níveis de agressividade durante as duas primeiras semanas após o parto e, após este período, há um declínio na agressividade embora a lactação continue (Flannelly e Flannelly 1987; Mayer et al. 1987; Mayer e Rosenblatt 1987; Giovenardi et al. 1998; Giovenardi et al. 2005) e o comportamento maternal também (Svare e Gandelman 1976a; Consiglio et al. 2005).

A agressão maternal é um comportamento que ocorre num período específico da vida da rata, ao contrário dos machos que podem manifestar comportamentos agressivos de maneira contínua durante a vida. A agressão maternal de roedores é um comportamento espécie-específico que pode ser estudado em laboratório (para uma revisão ver Numan 1994).

Diferentemente dos machos, o comportamento agressivo de ratas fêmeas lactantes compreende um padrão de componentes defensivos além do padrão ofensivo (De Almeida et al. 2006). A agressividade exibida pelas fêmeas tem como propósito principal a defesa da ninhada (Hurst 1987). Nessa situação, além dos parâmetros normalmente observados em machos (investigação social, avançar, dominar, rodear, postura agressiva, ataque lateral, morder), as fêmeas também apresentam o comportamento de ataque frontal (Lucion e De Almeida 1996). Segundo Blanchard e Blanchard (1991) o comportamento agressivo de ratas com filhotes contra um intruso é diferente do comportamento de machos dominantes em colônias. A maioria das mordidas de machos dominantes em intrusos resulta numa lesão sendo que as fêmeas dificilmente produzem um dano físico. Outra diferença importante é o alvo destas mordidas. Ao contrário dos machos, uma considerável frequência de mordidas das fêmeas é dirigida à cabeça e à região do focinho do intruso. As fêmeas apresentam o padrão de ataque frontal, o qual não é observado em machos dominante. O ataque frontal é um comportamento súbito, muito rápido, pois não apresenta comportamentos associados como piloereção e/ou dorso arqueado. Esta forma de agressão que ocorre em resposta a uma ameaça ou medo é motivada e, geralmente, é precedida por fugas (Brain 1981). Os alvos das mordidas das fêmeas e a ocorrência de ataque frontal sugerem que existe um elemento de defesa ou medo na reação de uma fêmea em direção a um intruso. Assim, o ataque frontal pode ser considerado um comportamento defensivo (Blanchard e Blanchard 1981).

Alguns trabalhos correlacionam o aumento do comportamento agressivo maternal com a diminuição do medo (Lonstein e Gammie 2002, Erskine et al. 1978; Erskine et al. 1980; Ostermeyer 1983; Hansen e Ferreira 1986; Ferreira, 2002). Ratas lactantes demonstram ansiedade diminuída nos testes de campo aberto (Fleming e Luebke 1981; Ferreira et al. 2002) e labirinto em cruz elevado (Bitran et al. 1991; Kellogg e Barrett 1999; Ferreira et al. 2002). O labirinto em cruz elevado é um modelo que explora a tendência natural de roedores de acessar e investigar novos lugares, um comportamento impedido por medo ou ansiedade a ambientes aversivos (Pellow et al. 1985; Pereira et al. 2005). Ratas com filhotes tanto lactantes quanto as que passam pelo processo de sensibilização exibem respostas do tipo ansiolítica no labirinto em cruz elevado

quando comparadas com ratas não lactantes. Além disso, a maior ansiólise ocorre nas lactantes. A redução da ansiedade pode ser considerada parte de um repertório comportamental maternal e poderia ser melhor denominada como “ansiólise materna” (Pereira et al. 2005).

Em roedores, estas alterações comportamentais observadas após o parto parecem depender de mudanças hormonais que ocorrem no final da gestação, parto e início da lactação bem como, da presença dos filhotes (Mayer e Roseblatt 1987; Svare 1976a; Gandelmam e Simon 1980; Giovenardi et al. 2000; Roseblatt et al. 1996; Roseblatt 1967; para uma revisão ver Numan, 1994). Os filhotes fornecem à mãe uma variedade de sinais táteis e olfatórios que são importantes para a manutenção da agressão maternal em ratas lactantes (Lonstein e Gammie 2002). O recebimento de sinais apenas visuais e auditivos são incapazes de manter a agressão maternal (Ferreira e Hansen 1986; Lonstein e Gammie 2002), e a remoção cirúrgica destes sentidos não afetam o comportamento agressivo das mães (Kolunie et al. 1994; Lonstein e Gammie 2002). A agressão maternal emerge durante a gravidez, quando os filhotes não estão fisicamente presentes para prover estímulos sensoriais (Albert et al. 1988; Albert et al. 1992a; Albert et al. 1992b; Flannelly e Flannelly 1987; Mayer et al. 1987). Nesse período, a influência ativa parece ser provida por hormônios (Mayer e Rosenblatt 1987). Entretanto, fêmeas sensibilizadas, sem a influência dos hormônios gonadais apresentam ataques contra intrusos embora os níveis de agressão sejam significativamente mais baixos do que os de fêmeas lactantes (Ferreira et al. 2002). Albert et al. (1988) mostra que a agressão maternal em ratas fêmeas é promovida por pseudoprenhez, um estado reprodutivo no qual os filhotes não estão presentes.

Em ratas lactantes o comportamento de ansiedade é modulado pela presença dos filhotes, que pode induzir ou potencializar a ansiólise no campo aberto (Fleming e Luebke 1981). A maneira pela qual os filhotes reduzem as respostas de ansiedade neste modelo é desconhecida, mas eles provavelmente aumentam a motivação das mães para gastar energia e superar adversidades para garantir sua própria sobrevivência (Bitran et al. 1991; Ferreira et al. 2002; Pereira et al. 2005).

Mesmo sem a influência dos hormônios gonadais, fêmeas não lactantes ovariectomizadas (OVX) que passam pelo processo de sensibilização exibem comportamento tipo ansiolítico quando comparadas com fêmeas não lactantes OVX e não sensibilizadas. Além disso, fêmeas sensibilizadas também exibem agressão contra intrusos (Ferreira et al. 2002), o que sugere que o comportamento maternal por si só é essencial para a expressão dos comportamentos afetivos característicos de ratas lactantes, independentemente do perfil endócrino da gestação, parto e lactação. No entanto, as ratas lactantes exibem atividade significativamente maior no braço aberto do labirinto em cruz elevado, do que as ratas sensibilizadas (Pereira et al. 2005).

Os hormônios do parto podem aumentar significativamente ou reforçar o valor dos estímulos sensoriais produzidos pelos filhotes (Fleming et al. 1979, 1980, 1989) por atuar em áreas do cérebro que controlam a expressão desses comportamentos (Matthews-Felton et al. 1995; Numan 1994; Numan et al. 1977; Pfaff e Keiner 1973; Rainbow et al. 1982) ou por mudar a percepção da fêmea aos sinais somatosensórios recebidos dos filhotes (Morgan et al. 1992; Stern 1990; 1996; Stern e Johnson 1990).

1.2 Hormônios gonadais e prolactina

A lactação exerce um efeito inibitório sobre a secreção hipofisiária das gonadotrofinas provocando uma diminuição na secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (Ford e Melampy 1973). Entretanto, no final da segunda semana após o parto, as concentrações de LH tanto no plasma quanto na hipófise são maiores do que na primeira semana (Smith 1978; Sodersten e Eneroth 1984). Durante a gestação, há um aumento da concentração plasmática de estradiol (E2) em ratas Wistar alcançando um valor máximo no dia 20. Após o parto, a concentração de E2 diminui e permanece baixa durante todo período de lactação (Escalada et al., 1996; Escalada et al., 1997).

Já a concentração plasmática de progesterona (P4) eleva-se progressivamente até o 15º dia de gestação, diminui rapidamente no 20º dia e após o parto, sua concentração eleva-se progressivamente nos primeiros dias de lactação e fica constante (Giovenardi et al. 2000; Escalada et al. 1997, Giovenardi

et al. 2002). As concentrações de E2 durante a lactação permanecem baixas, semelhante às concentrações encontradas em fêmeas em diestro (Smithand e Neill 1977; Taya e Sesamoto 1981; Taya e Greenwald 1982).

A P4 é responsável pela estimulação da liberação de secreções celulares que são muito importantes para a nutrição do embrião. Além disso, auxilia no desenvolvimento das glândulas mamárias e inibe as contrações do miométrio uterino. A diminuição da concentração plasmática deste hormônio, 48 horas antes do parto, induz a lactogênese nos tecidos mamários e favorece as contrações uterinas (Tucker 1991). Este hormônio é inibitório da lactogênese e a redução de sua concentração plasmática em ratas prenhas induz o processo de lactação (Graham e Clark 1997).

A P4 pode também ser sintetizada no encéfalo a partir do colesterol, um processo que acontece em células gliais e neurônios no adulto (Garcia-Segura et al. 1996). Um dos mecanismos de ação da P4 parece ser através de receptores intracelulares que funcionam como fatores nucleares de transcrição dependente de ligantes (Mani et al. 1997). Alternativamente, ações da P4 no cérebro podem ser não genômicas e mediadas por seus metabólitos, como o allopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-one, 3 α -5 α -THP) (Akwa et al. 1999; Concas et al. 1998; Frye 2001b; Rupprecht et al. 2001) neuroesteróide que age como um modulador alostérico positivo dos receptores tipo "A" do ácido γ -aminobutírico (GABA_A) (Lambert et al. 2003; Rupprechet 2003). Além disso, é um potente neuroesteróide endógeno que pode alterar rapidamente a excitabilidade da membrana (Paul e Purdy 1992). O 3 α -5 α -THP é produzido no cérebro, glândulas adrenais e gônadas pela conversão da P4 por uma enzima intracelular, 5 α -redutase (Zwain e Yen 1999). Embora o cérebro tenha capacidade para sintetizar 3 α -5 α -THP a partir de novas moléculas de colesterol, a maior quantidade desse metabólito presente no cérebro é derivada da P4 circulante (Corpechot et al. 1993; Cheney et al. 1995; Genazzani et al. 1998).

Dentre os hormônios que participam da lactação podemos citar a prolactina (PRL). A PRL é um hormônio protéico adenohipofisário produzido por células especializadas, os lactotrofos, que correspondem a 20-35% da população de

células hipofisárias. Além dos lactotrofos, existem outros sítios de síntese de PRL como o sistema nervoso central, a glândula mamária, a placenta, o âmnio, o útero e algumas células do sistema imunológico (para revisão ver Freeman et al. 2000).

Em mamíferos, a PRL é responsável pelo desenvolvimento da glândula mamária e pela produção de leite sendo que suas concentrações plasmáticas aumentam durante a gravidez e lactação (Ben-Jonathan 1985; para revisão ver Freeman et al. 2000).

Em ratas, a PRL parece ter uma ação tanto luteotrófica quanto luteolítica, caso não ocorra concepção. Existem evidências de que a PRL sozinha ou na presença de E2 aumenta o número de receptores do LH nas células luteais e a produção de P4 (Holt et al. 1976; para revisão ver Freeman et al. 2000). Em roedores, a PRL também está relacionada com o comportamento maternal em ratas lactantes (para revisão ver Freeman et al. 2000).

De todos os hormônios adenohipofisários, a regulação da secreção da PRL é única e complexa. O hipotálamo exerce uma ação inibitória tônica sobre a secreção deste hormônio pela adenohipófise, através da liberação de dopamina (DA), o mais potente inibidor de PRL fisiológico tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A DA é liberada por neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) nos vasos portais hipofisários e age de forma direta sobre os lactotrofos da adenohipófise inibindo a síntese e a secreção de PRL (Shaar e Clemens 1974; Macleod e Lehmayr 1974; Gibbs e Neill 1978; Ben-Jonathan 1985; para revisão ver Freeman et al. 2000).

Receptores dopaminérgicos estão presentes na hipófise, sendo os da subclasse D₂ encontrados no lactotrofo (Meador-Woodruff et al. 1989). O tratamento com antagonistas dos receptores D₂, como o haloperidol e pimozida, bloqueia a atividade dos TIDA com conseqüente aumento da síntese e liberação de PRL (Oliveira et al. 1996; Mohankumar et al. 1997; Mohankumar et al. 1998; Hentschel et al. 2000). Além da DA, o ácido γ -aminobutírico (GABA) (Moguilevsky et al. 1992), a angiotensina II (Franci et al. 1997) e o peptídeo natriurético atrial (Franci et al. 1992) são capazes de inibir a síntese e liberação de PRL.

Os hormônios esteróides gonadais, principalmente o E2, possuem um papel modulatório sobre a secreção de PRL (Gudelsky et al. 1981; Caligaris e Talesnik 1983; para revisão ver Freeman et al. 2000). A conhecida ação estimulatória dos estrógenos sobre a liberação de PRL pode ocorrer no lactotrofo e no núcleo arqueado do hipotálamo (para revisão ver Freeman et al. 2000). No lactotrofo, a estimulação da transcrição gênica da PRL é observada 24 horas após a administração de estradiol (Shull e Gorski 1989). O E2 também pode diminuir a sensibilidade do lactotrofo a DA através da redução do número de receptores dopaminérgicos (Raymound et al. 1978).

1.3 Hormônios gonadais e comportamento

Em ratos, os hormônios gonadais influenciam o desencadeamento do comportamento agressivo maternal. De fato, ratas não grávidas OVX tratadas com E2 e P4 na presença de filhotes podem desenvolver comportamento agressivo (Mayer et al. 1990; Mayer e Rosenblatt 1993). O início da responsividade maternal aos filhotes depende da elevação das concentrações de P4, E2, e PRL durante a gestação, seguida pela queda da P4 no parto (para uma revisão ver Numan 1994, Bridges et al. 1996 e Stern 1989).

Diversos trabalhos sugerem que a P4 exerce um efeito inibitório sobre o comportamento maternal tanto em ratos como em hamster (Numan et al. 1999; Sheehan e Numan 2002; Fraile et al. 1987). Numan et al. (1999) observou a neutralização do efeito inibitório deste hormônio no cuidado maternal com a administração sistêmica de um antagonista da P4 que aumentou significativamente a latência do desencadeamento de tal comportamento. Sheehan e Numan (2002) sugerem que a P4 possui um papel facilitatório no final da gravidez e inibitório no período pós-parto, no que se refere ao comportamento maternal. Além disso, Mann (2006) sugere que a ação da P4 no desencadeamento do comportamento maternal parece não ser mediada pelo 3α - 5α -THP, ao contrário do que ocorre no comportamento sexual em camundongos, ratos e hamsters (Frye et al. 1998; Frye et al. 1992; Frye e Vongher 1999; Frye e Vongher 2001; McCarthy et al. 1995; Petralia et al. 2005).

O início da agressão maternal tem determinantes hormonais um tanto diferentes (Lonstein e Gammie 2002). Mayer e Rosenblatt (1987) demonstraram que ratas histerectomizadas e OVX no 16º dia de gestação, tratadas com E2 tornam-se altamente agressivas contra machos intrusos mesmo antes do contato com os filhotes. Segundo Lonstein e Gammie 2002, o E2 pode ser mais crítico do que a P4 para o início da agressão maternal, pois o tratamento de fêmeas virgens com E2, apenas, pode estimular a agressão (Mayer et al. 1990), embora não em todos os casos (van de Poll et al. 1986).

Albert et. al (1988) mostram que fêmeas com pseudoprenhez, estado reprodutivo no qual os filhotes não estão presentes, podem apresentar agressão maternal. Estudos subseqüentes fornecem evidências de que a P4, E2 e testosterona são hormônios que juntos influenciam a agressão em fêmeas pseudoprenhas (Albert et al. 1993a; Albert et al. 1991; Albert et al. 1992a; Albert et al. 1993b; Albert et al. 1992b; Albert et al. 1989).

Por outro lado, Albert et al. (1992c) e Erskine et al. (1980) sugerem que os hormônios gonadais não estão envolvidos na agressão maternal, pois a OVX após o parto não alterou este comportamento. Entretanto, resultados preliminares do nosso laboratório mostraram que a injeção intraperitoneal do antagonista dos receptores da P4, o RU 486, promove aumento do comportamento agressivo maternal no 7º e 14º dia pós-parto.

Rhodes e Frye (2001) sugerem que o 3α - 5α -THP possa mediar funções ansiolíticas da P4. Bitran et al. (1993) relatam que ratas virgens OVX após receberem P4 por via subcutânea apresentam diminuição da ansiedade no labirinto em cruz elevado e aumento da concentração de 3α - 5α -THP no plasma. Resultados do nosso laboratório mostraram que a injeção intraperitoneal do antagonista dos receptores da P4, o RU 486, promove diminuição nos níveis de ansiedade no 8º dia pós-parto quando testadas no campo aberto. Por outro lado, quando testada no 14º dia pós-parto verifica-se aumento da ansiedade.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da retirada das gônadas, no 1º dia pós-parto, sobre diversos comportamentos de ratas lactantes.

Objetivos específicos

- Avaliar o papel dos hormônios gonadais na modulação dos comportamentos maternal e agressivo de ratas lactantes que foram OVX no 1º dia pós-parto.

- Avaliar o papel dos hormônios gonadais na modulação do comportamento ansiedade/medo no labirinto em cruz elevado e campo aberto de ratas lactantes que foram OVX no 1º dia pós-parto.

- Verificar as concentrações plasmáticas de P4 e PRL de ratas lactantes OVX no 1º dia pós-parto, bem como, o peso das ninhadas visando o controle nutricional dos filhotes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas, primíparas, com aproximadamente 90 dias de idade, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Cada fêmea foi mantida individualmente em uma caixa de acrílico transparente (46x31x17cm), com livre acesso à água, ração, material para a construção do ninho e teve o momento do parto controlado rigorosamente. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero. No primeiro dia pós-parto (DPP) as ninhadas foram padronizadas aleatoriamente em oito filhotes. Os animais permaneceram em uma sala com temperatura controlada (21 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 15:00 horas.

Para testar o comportamento agressivo das fêmeas lactantes foram usados machos intrusos, da variedade Wistar, com cerca de dois meses e meio de idade e aproximadamente o mesmo peso da fêmea residente, sendo cada um utilizado somente uma vez. Os experimentos foram executados de acordo com as normas estabelecidas pelo NIH Guide for Animal Research e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

3.2 Grupos experimentais

Fêmeas lactantes no 1º DPP foram divididas em dois grupos: grupo 1, controle (SHAM), submetido à castração fictícia; grupo 2, submetido à ovariectomia (OVX). Após a cirurgia, mães e filhotes permaneceram intactos na caixa residência até o 8º DPP. O ganho de peso das ninhadas dos dois grupos foi comparado no 8º, 15º e 21º DPP. Os filhotes foram pesados no 1º DPP, quando as mães estavam anestesiadas para a cirurgia de castração; no 8º DPP, quando as mães estavam sendo submetidas aos testes comportamentais; no 15º DPP, durante a limpeza da caixa-residência; e no 21º DPP, no momento do desmame.

3.3 Cirurgia de ovariectomia

Para realização da cirurgia as fêmeas lactantes foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal única contendo uma mistura de 5–10 mg/kg de xilasina (Vetbrands®, Jacareí, SP, Brasil) e 75–95 mg/kg de quetamina (Vetbrands®, Jacareí, SP, Brasil). Depois de anestesiadas as ratas foram posicionadas em decúbito-ventral e foi feita uma incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm no dorso, logo abaixo das costelas, por meio da qual os ovários e as porções superiores uterinas foram expostas. No grupo OVX os ovários foram retirados após a ligadura entre essas duas estruturas. No grupo SHAM o procedimento foi idêntico, porém sem a ligadura e retirada dos ovários. Por fim, o tecido muscular e a pele foram suturados.

3.4 Testes comportamentais

Para que todos os registros comportamentais das fêmeas lactantes fossem realizados até o 8º DPP (período no qual as alterações comportamentais de fêmeas lactantes são mais intensas) foram realizados dois experimentos descritos esquematicamente na figura 2.

EXPERIMENTO 1

3.4.1 Comportamento maternal

Do 2º ao 7º DPP, o comportamento maternal dos grupos SHAM (n=15) e OVX (n=15) foi registrado através de uma versão dos procedimentos descritos por Myers et al. (1989). O comportamento de cada mãe foi registrado em quatro sessões diárias de observações com 72 min de duração, sendo três sessões no ciclo claro (com início as 9:00, 11:00 e 13:45 h) e uma no ciclo escuro (iniciando as 16:30 h). A distribuição das sessões de observações foi feita em função de os cuidados maternos ocorrem mais frequentemente durante o ciclo claro (Champagne et al., 2003). Em cada sessão o comportamento maternal foi registrado através de 25 observações pontuais feitas a cada três minutos (25 observações/sessão x 4 sessões/dia = 100 observações/mãe/dia). Nestas sessões as fêmeas lactantes foram observadas em seqüência e o(s) comportamento(s) desenvolvido(s) no o instante da observação foi registrado em uma planilha. Com base na descrição encontrada em estudos prévios (Caldji et

al., 1998; Champagne et al., 2003; Myers et al. 1989), os comportamentos observados foram: mãe fora do ninho (figura 3a); lambe os filhotes (superfície do corpo ou região anogenital) (figura 3b); construir ninho; filhotes fora do ninho (figura 3c); recolher os filhotes para o ninho; amamentar os filhotes em três posturas diferentes: (1) posicionada sobre eles com o dorso muito arqueado (figura 4a), (2) posicionada sobre eles com o dorso pouco arqueado (figura 4b), ou sem estar com o dorso arqueado, ou (3) apresentando uma postura passiva onde fica deitada (figura 4c) de lado ou de costas (figura 4d) enquanto os filhotes mamam.

Ao final dos registros, foram somadas as frequências das três posturas de amamentação para compor a frequência do comportamento chamado de amamentar.

3.4.2 Labirinto em cruz elevado

Ratas que tiveram o comportamento maternal registrado foram testadas no labirinto em cruz elevado no 8º dia de lactação para avaliar ansiedade/medo (SHAM n=22; OVX n=22). Para isso, o labirinto em cruz elevado foi usado como previamente descrito por Pellow et al. (1985) e Severino et al. (2004). O aparato é constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados do mesmo tamanho, com paredes de 40 cm de altura, descobertos na parte superior (figura 5a). É feito em madeira e possui uma base que o eleva a 50 cm de altura do chão. Este teste foi realizado no ciclo claro entre 11:00 h e 13:00 h, permanecendo as janelas da sala abertas permitindo a entrada de claridade natural. Além disso, o centro do labirinto foi colocado aproximadamente três metros abaixo da lâmpada da sala, acesa (uma lâmpada incandescente de 100w – 158 lux no labirinto), de forma que todos os braços recebam a mesma fraca iluminação. Cada rata foi colocada no centro do labirinto em cruz elevado e teve seu comportamento registrado em vídeo durante cinco minutos. Após cada registro o labirinto foi limpo com álcool. Os comportamentos analisados foram: número de entradas e tempo permanência nos braços abertos e fechados e o número de esquadrihar (profusão da cabeça do animal para fora de uma das bordas do braço aberto) (Pellow et al., 1985; Severino et al., 2004).

EXPERIMENTO 2

3.4.3 Comportamento agressivo maternal

No 6º DPP, o comportamento agressivo maternal das ratas SHAM (n=13) e OVX (n=13) foi realizado seguindo protocolo previamente descrito (Escalada et al., 1996). Primeiro o macho intruso foi colocado na caixa residência onde estavam a mãe e os filhotes. Imediatamente após isso o comportamento foi filmado por 10 min. Este teste foi realizado durante as primeiras duas horas do ciclo escuro.

Os comportamentos avaliados foram: investigação social (onde a fêmea cheira o corpo e os genitais do intruso), locomoção (a fêmea caminha pela caixa enquanto o intruso está presente); ataque frontal (a fêmea ataca o intruso orientada frontalmente à cabeça do mesmo); ataque lateral (a fêmea ataca lateralmente o corpo do intruso) (figura 6); morder (a fêmea morde o corpo do macho intruso) e postura agressiva (onde a fêmea fica arqueada lateralmente).

3.4.4 Campo aberto

As mesmas ratas que foram testadas quanto ao comportamento agressivo maternal no 6º DPP tiveram a ansiedade/medo medida no teste do campo aberto (SHAM=16; OVX=16). Este registro foi feito no 8º DPP, no ciclo claro entre 10:00 e 12:00 h. O campo aberto consiste em uma caixa de madeira de um metro quadrado, cercada por paredes de 30 cm de altura e dividida em 25 quadrados pintados no chão sendo 16 quadrados na zona lateral e nove na zona central (figura 5b). O teste comportamental consiste em colocar a rata em um dos cantos da caixa e registrar seu comportamento em vídeo por 5 minutos. Os comportamentos analisados foram: locomoção total; locomoção lateral; locomoção central; escanear; “grooming” (autolimpeza) e “rearing” (investigação do meio ambiente) (Blanchard et al., 1990; Lucion et al., 1996).

Todos os registros comportamentais do labirinto em cruz elevado, campo aberto e agressivo maternal foram registrados em vídeo e analisados no programa Noldus® (Holanda).

3.5 Medidas hormonais

No 8º DPP, ao final do teste do campo aberto as fêmeas retornavam para caixa residência. Uma hora após este teste comportamental as ratas SHAM (n=13) e OVX (n=13) eram mortas por decapitação tendo o sangue coletado do tronco e acondicionado em tubos de ensaio previamente heparinizados. As amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 3000 rpm a 4°C, sendo o plasma separado e armazenado em um freezer a -20°C.

As concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) foram determinadas por radioimunoensaio usando um conjunto de reagentes MAIA da Adaltis Itáli S.p.A (Italy). A dose mínima de detecção foi 0,3 ng / mL e o erro intra-ensaio foi de 4,0%. As concentrações plasmáticas de PRL (ng/mL) foram determinadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo usando kits específicos do National Pituitary Program, National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (USA). O anticorpo específico para PRL foi o anti-rat PRL-S9 e a preparação padrão a PRL-RP3. O anticorpo para precipitação foi produzido em ovelha pelo laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci. A dose mínima detectável de PRL foi 0,2 ng/mL e o erro intra-ensaio de 3,5%. As medidas hormonais foram realizadas no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

3.6 Análise estatística

A média (\pm E.P.M.) da frequência, latência, duração e percentual de frequência ou de duração dos comportamentos estudados foi comparada entre os dois grupos experimentais utilizando-se um teste *t* de Student. Em todos os casos o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

EXPERIMENTO 1

Comportamento maternal e Labirinto em cruz elevado

n	Grupos	DIAS PÓS-PARTO							
		01º	02º ao 07º	08º		9º ao 14º	15º	16º ao 20º	21º
		Pesagem Ninada	Comportamento Maternal	Pesagem Ninhada	Labirinto		Pesagem Ninada		Pesagem Ninada
15	SHAM	x	x	x	x		x		x
15	OVX	x	x	x	x		x		x

EXPERIMENTO 2

Comportamento agressivo-maternal, Campo aberto e Coleta de sangue

n	Grupos	DIAS PÓS-PARTO						
		1º	2º ao 5º	6º	7º	8º		
		Pesagem Ninada		Comportamento Agressivo		Pesagem Ninada	Campo Aberto	Coleta de Sangue
15	SHAM	x		x		x	x	x
15	OVX	x		x		x	x	x

Figura 2: Resumo esquemático dos experimentos realizados.

a)



b)



c)



Figura 3: Alguns dos parâmetros que compõem o comportamento maternal: a) mãe fora do ninho, b) lambar os filhotes e c) filhotes fora do ninho.



a)



b)



c)



d)

Figura 4: Diferentes posições do comportamento de amamentar: a) Dorso muito arqueado, b) dorso pouco arqueado, c) de costas e d) de lado.

a)



b)



Figura 5: Aparatos usados para testar o comportamento de ansiedade/medo de ratos: a) labirinto em cruz elevado e b) campo aberto.



Figura 6: Comportamental agressivo maternal (ataque lateral).

4. RESULTADOS

4.1 *Comportamento maternal*

A figura 7 mostra uma diminuição significativa na frequência do comportamento maternal de lambe os filhotes do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=2.2$; $p=0.04$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e OVX na frequência dos comportamentos de amamentar ($t=0.4$; $p=0.708$) e da mãe ficar fora do ninho ($t=0.7$; $p=0.510$). Por outro lado, houve um aumento significativo da frequência de filhotes encontrados fora do ninho do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=3.0$; $p=0.006$).

A frequência dos seguintes comportamentos maternos não apresentou diferença significativa entre os grupos SHAM e OVX: construir o ninho (12.0 ± 2.6 e 13.0 ± 3.1 , respectivamente) ($t=0.3$; $p=0.730$), recolhimento filhotes para o ninho (0.5 ± 0.2 e 0.7 ± 0.3 , respectivamente) ($t=0.5$; $p=0.616$), amamentação dos filhotes em três diferentes posturas: (1) posicionada sobre eles com o dorso muito arqueado (140.0 ± 20.0 e 140.0 ± 19.0 , respectivamente) ($t=0.1$; $p=0.942$), (2) posicionada sobre eles com o dorso pouco arqueado ou sem estar com o dorso arqueado (120.0 ± 15.0 e 130.0 ± 17.0 , respectivamente) ($t=0.6$; $p=0.548$), ou (3) apresentando uma postura passiva onde fica deitada de lado ou de costas enquanto os filhotes mamam (36.0 ± 6.9 e 31.0 ± 7.7 , respectivamente) ($t=0.4$; $p=0.663$).

4.2 *Comportamento agressivo maternal*

A figura 8 mostra que no 6º DPP houve uma redução significativa na frequência de ataque frontal do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=2.5$; $p=0.021$) e uma tendência à diminuição no número de mordidas do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=1.7$; $p=0.104$). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais estudados quanto à frequência de ataque lateral ($t=1.5$; $p=0.137$) e postura agressiva ($t=1.0$; $p=0.336$).

Embora não expresso na figura, não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e OVX quanto à frequência dos comportamentos de investigação

social (35.0 ± 2.7 e 36.0 ± 3.6 , respectivamente) ($t=0.1$; $p=0.900$) e locomoção (39.0 ± 3.6 e 42.0 ± 6.2 , respectivamente) ($t=0.5$; $p=0.643$), o que demonstra que a cirurgia de OVX não causou alteração nesses parâmetros comportamentais que avaliam as condições gerais do animal.

4.3 Labirinto em Cruz Elevado

A figura 9 mostra que não houve diferença significativa no percentual de entradas ($t=0.8$; $p=0.424$) e de tempo no braço aberto ($t=0.2$; $p=0.853$), na frequência de colocar a cabeça para fora do braço aberto ($t=0.3$; $p=0.746$) e na frequência total de entradas nos braços abertos e fechados ($t=0.8$; $p=0.413$) quando comparados os grupos SHAM e OVX de fêmeas que foram testadas, no 8º DPP, no labirinto em cruz elevado.

4.4 Campo Aberto

A figura 10 mostra que no 8º DPP, no teste do campo aberto, ocorreu um aumento na latência da locomoção central do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=2.1$; $p=0.046$). Entretanto não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto à latência de locomoção total ($t=1.1$; $p=0.281$), duração de locomoção central ($t=0.4$; $p=0.660$) e duração locomoção total ($t=0.8$; $p=0.400$).

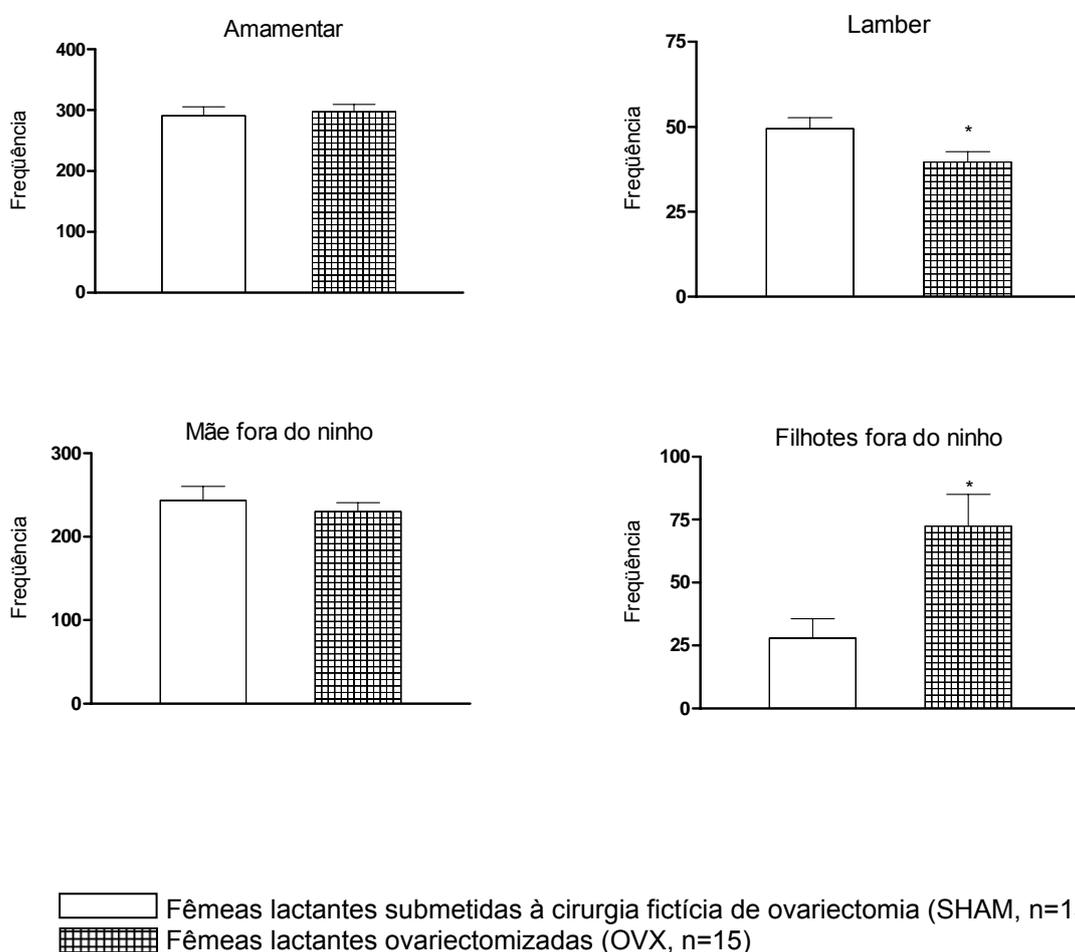
4.5 Secreção de PRL

A figura 11 mostra uma diminuição significativa na concentração plasmática da P4 no 8º DPP do grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM ($t=9.0$; $p=0.0001$). Por outro lado, houve um aumento significativo na concentração plasmática da PRL medida no mesmo dia ($t=2.7$; $p=0.013$).

4.6 Ganho de peso das ninhadas

A tabela 1 mostra que não houve diferença significativa no ganho de peso das ninhadas no 8º DPP ($t=0.6$; $p=0.512$), 15º DPP ($t=0.2$; $p=0.851$) e 21º DPP de idade ($t=1.1$; $p=0.264$) quando comparamos os grupos SHAM e OVX.

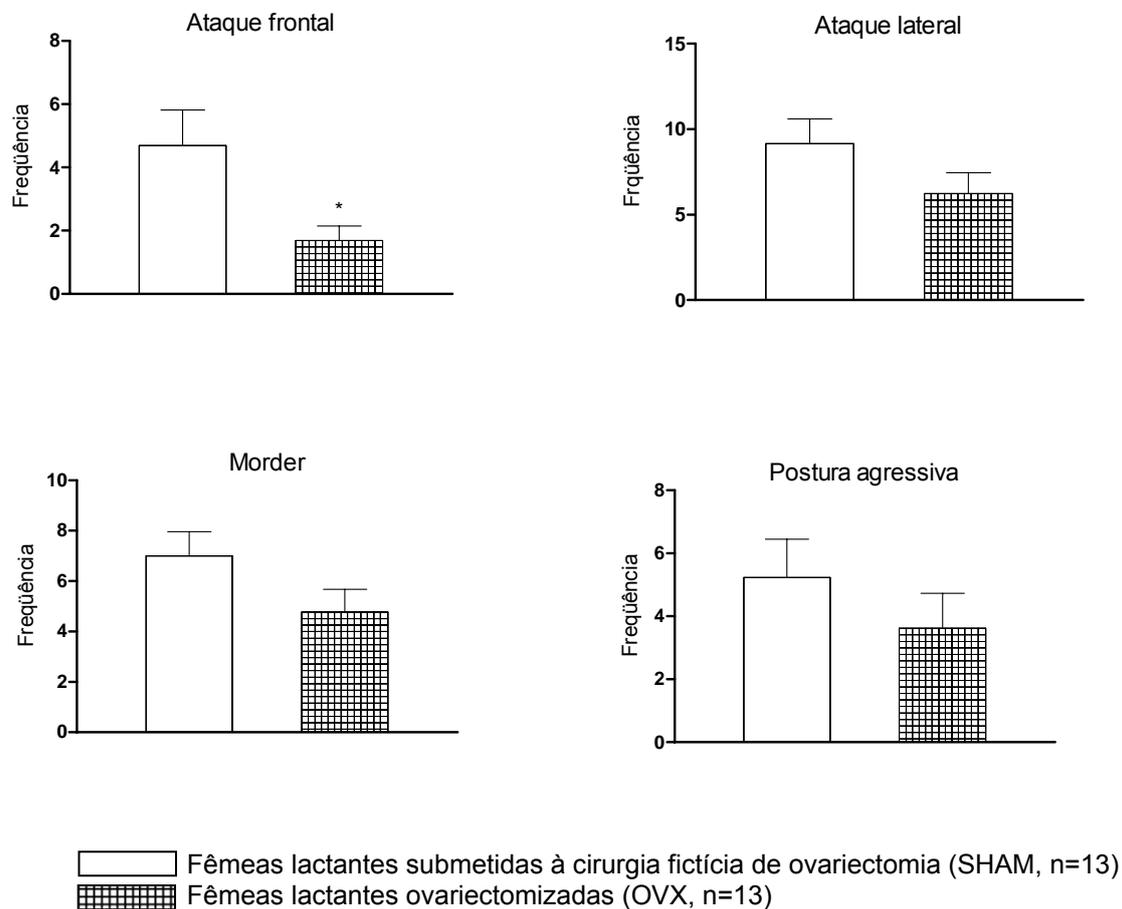
COMPORTAMENTO MATERNA



* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo SHAM

Figura 7: Comportamento materno do 2º ao 7º dia pós-parto de fêmeas lactantes que foram submetidas a cirurgia fictícia ou ovariectomia (no 1º dia pós-parto). Os dados estão expressos por média (\pm EPM) das frequências dos comportamentos estudados. O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os grupos (SHAM e OVX).

AGRESSÃO MATERNAL



* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo SHAM

Figura 8: Comportamento agressivo maternal de fêmeas lactantes (6^o dia pós-parto) que foram submetidas à cirurgia fictícia ou ovariectomia no 1^o dia pós-parto. Os dados estão expressos por média (\pm EPM) das frequências dos comportamentos estudados. O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os grupos (SHAM e OVX).

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

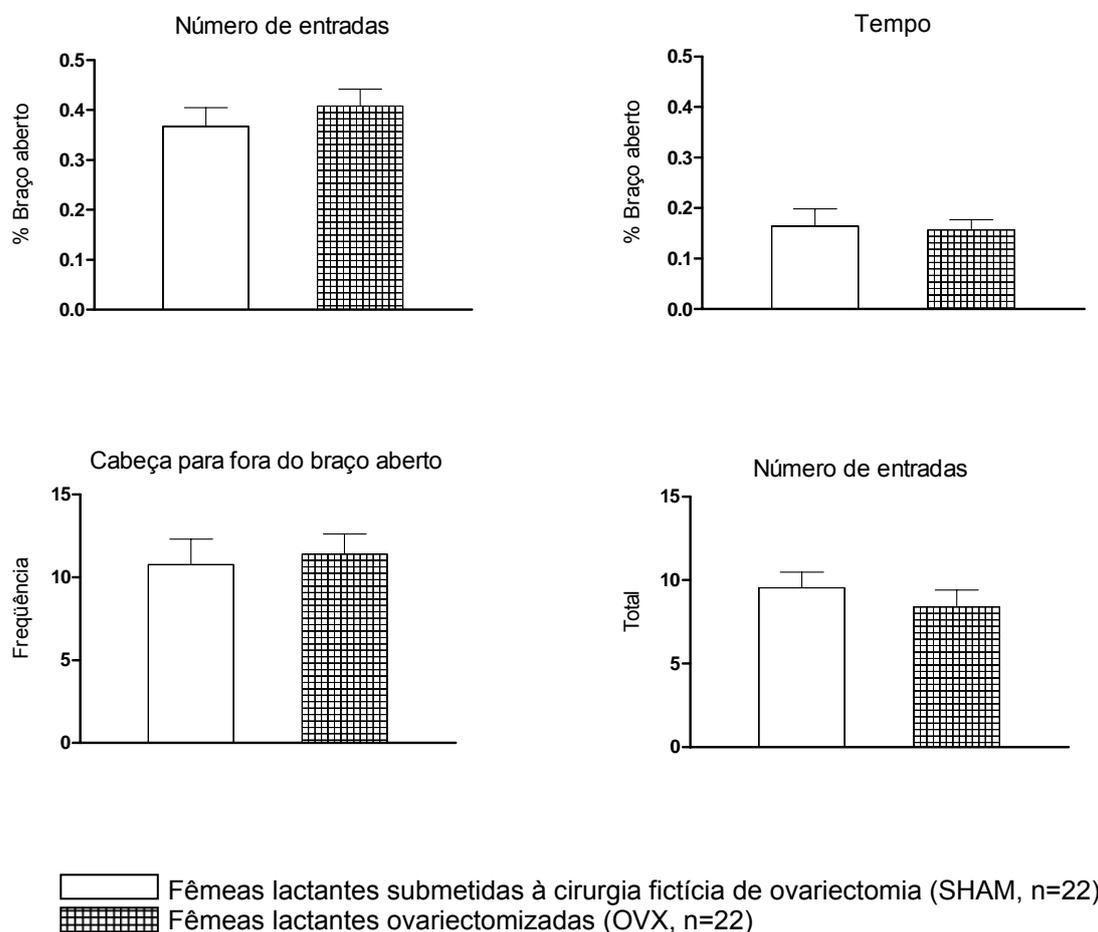
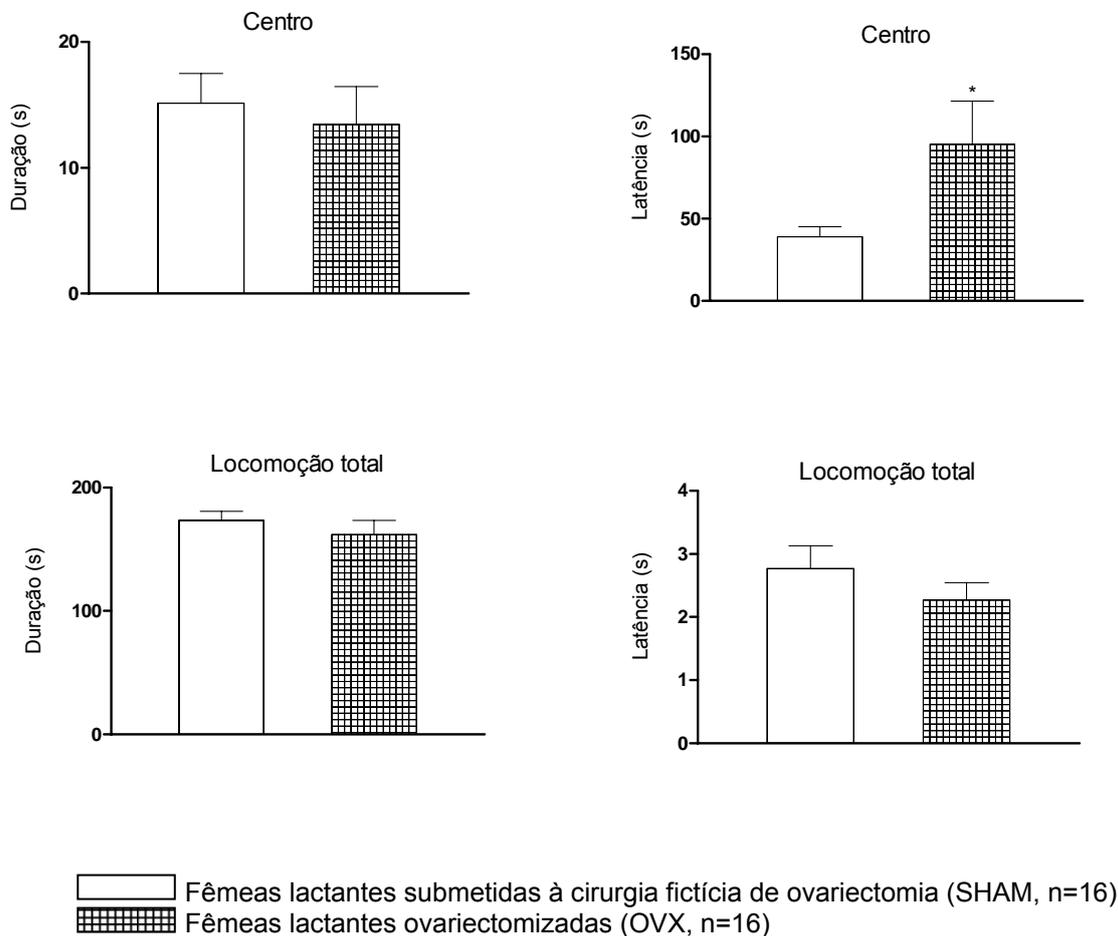


Figura 9: Comportamento no labirinto em cruz elevado (8^o dia pós-parto) de fêmeas lactantes que sofreram cirurgia fictícia ou ovariectomia no 1^o dia pós-parto. Os dados estão expressos por média (\pm EPM) da porcentagem de freqüência e duração dos comportamentos estudados. O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$).

CAMPO ABERTO



* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo SHAM

Figura 10: Comportamento no campo aberto (8º dia pós-parto) de fêmeas lactantes que foram submetidas à cirurgia fictícia ou ovariectomia no 1º dia pós-parto. Os dados estão expressos por média (\pm EPM) de duração e latência dos comportamentos estudados. O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os grupos (SHAM e OVX).

MEDIDAS HORMONAIS

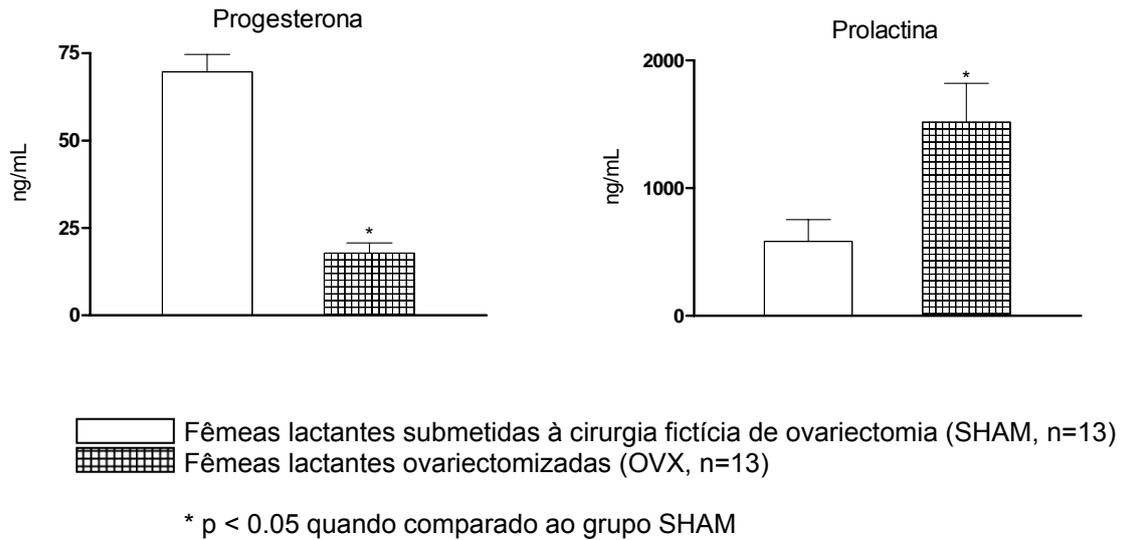


Figura 11: Concentração plasmática de P4 (ng/mL) e PRL (ng/mL) uma hora após o teste do campo aberto de fêmeas lactantes (8º dia pós-parto) que sofreram cirurgia fictícia ou ovariectomia no 1º dia pós-parto. Os dados estão expressos por média (\pm EPM) das concentrações plasmáticas dos hormônios analisados. O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os grupos (SHAM e OVX).

PESOS DAS NINHADAS

Tabela 1. Peso (g) das ninhadas de fêmeas lactantes submetidas à cirurgia fictícia ou ovariectomia (1º dia pós-parto) aos 8, 15 e 21 pós-parto.

Dia pós-parto	Grupos	
	SHAM	OVX
8º	65 ± 2.0 (n=22)	63 ± 1.2 (n=22)
15º	140 ± 5.2 (n=17)	140 ± 3.4 (n=17)
21º	230 ± 6.4 (n=21)	240 ± 5.4 (n=21)

Os dados estão expressos por média (\pm EPM) dos pesos das ninhadas (g). O número de animais (n) é citado entre parênteses. Foi empregado um teste *t* de Student entre os dois grupos experimentais (com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre pesos das ninhadas em nenhum dos dias pós-parto avaliados, comparando-se os dois grupos estudados.

5. DISCUSSÃO

A gonadectomia realizada no 1º DPP diminuiu a frequência do comportamento maternal de lambar os filhotes sem alterar a frequência dos comportamentos de amamentar e construir ninho. Embora a frequência do comportamento de recolher os filhotes não tenha sido diferente entre os grupos OVX e SHAM, houve um aumento significativo no número de vezes que os filhotes de mães OVX foram encontrados fora do ninho, o que pode indicar uma redução do comportamento de recolher, ou uma redução da responsividade aos estímulos provenientes dos filhotes. Nós podemos concluir que a gonadectomia feita no 1º DPP afeta parcialmente o comportamento maternal, reduzindo o comportamento de lambar, mas aparentemente não reduzindo cuidados da mãe em relação à prole.

No presente estudo, a ovariectomia manteve baixas as concentrações plasmáticas de ambos os hormônios gonadais P4 e E2 (que não foi dosado neste estudo) através da lactação, mas não alterou a variação que normalmente ocorre com estes hormônios durante a gestação e o parto. Considerando os resultados de estudos prévios (Numan et al., 1999; Sheehan and Numan, 2002), a redução da concentração plasmática de P4 no período pós-parto imediato deveria aumentar o comportamento maternal. No entanto, nossos resultados mostram que a castração no início do período pós-parto não aumenta o comportamento maternal, ao contrário, houve uma redução em algumas atividades maternas. Possivelmente as discrepâncias entre os resultados ocorreram em função de diferenças nos procedimentos experimentais. De fato, no presente estudo as fêmeas lactantes foram castradas depois do parto, enquanto nos outros estudos, as fêmeas foram injetadas com um antagonista do receptor de P4 durante a gestação. Além disso, a castração reduziu todos os hormônios gonadais, enquanto nos outros estudos, apenas a P4 foi afetada. Em nossas fêmeas OVX, os possíveis efeitos da P4 no desencadeamento do comportamento maternal ocorreram. A organização do comportamento maternal foi estabelecida durante a gestação. Isto é provável porque os efeitos da gonadectomia após o parto foram relativamente leves. De fato, após o parto, o comportamento maternal parece ser mantido pelos filhotes. Neste estudo, nós impedimos o aumento da P4 que

normalmente ocorre a partir do 3º DPP, e o comportamento maternal foi pouco afetado e os filhotes cresceram normalmente.

A ovariectomia reduziu o comportamento de lambe os filhotes, mas nenhuma diferença no peso corporal dos filhotes foi detectada, indicando que os filhotes de mães OVX mamaram adequadamente. Na verdade, a ovariectomia de fêmeas lactantes não alterou os comportamentos de cuidados com a prole. Estudos prévios tem mostrado que os mecanismos envolvidos na expressão do comportamento de lambe os filhotes são diferentes dos mecanismos de outros comportamentos maternais (Stern, 1997). De acordo com Champagne et al. (2001), parece que a ocitocina modula especificamente o comportamento de lambe. Assim, os hormônios gonadais podem modular este comportamento por afetar funções da ocitocina.

O comportamento agressivo maternal, como parte do comportamento maternal, parece também se desencadeado por mudanças do padrão endócrino no final da gestação, parto e lactação (Mayer and Rosenblatt, 1993). Ferreira et al. (2002) sugerem que o cuidado maternal contribui para a expressão da agressão maternal. Os resultados deste estudo mostraram certamente afeta o comportamento agressivo no 6º DPP, sem alterar os comportamentos de investigação social e locomoção, avaliados durante o teste. Nosso resultados são diferentes dos encontrados por Albert et al. (1992c) em que a ovariectomia não alterou a agressão maternal. Existem diferenças metodológicas entre o nosso trabalho e este realizado por Albert et al. (1992c) no qual fêmeas lactantes foram testadas quanto ao comportamento agressivo maternal duas vezes antes do parto e no 3º, 10º, 17º e 24º DPP. Além disso, um macho permanecia na caixa-residência durante a gestação, sendo removido 15 min antes dos testes de agressão, assim como os filhotes nos testes realizados após o parto. Outra diferença metodológica é que como intruso foram usadas fêmeas pequenas, injetadas com 0.25 mg de diazepam para diminuir seu comportamento defensivo. Nosso trabalho inclui diversos comportamentos para avaliação a agressão, enquanto o de Albert et al. (1992c) considera apenas o número de mordidas e ataques que a fêmea dirige ao intruso. Furthermore, Huntingford (1989) diz que o ataque dirigido a um intruso não é uma resposta reflexa a um único estímulo, mas

depende da avaliação das possibilidades de ganhar ou de ser lesado e do valor do recurso disputado. Assim, é possível que o intruso, sendo macho, possa ter inibido respostas agressivas de fêmeas OVX.

Alguns autores relatam que, em ratos, durante a lactação o comportamento agressivo aumenta e a ansiedade/medo diminui (Ferreira et al., 2002; Lonstein and Gammie, 2002). Nossos resultados mostram que a ovariectomia realizada no 1º DPP reduziu a agressão maternal, mas não produziu mudanças importantes relacionadas com o comportamento de ansiedade/medo no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. De todos os parâmetros analisados nestes dois testes, houve apenas aumento da latência de deslocar-se para o centro do campo aberto das ratas OVX quando comparadas com ratas SHAM.

Trabalhos prévios correlacionam os hormônios gonadais com a modulação do comportamento de ansiedade/medo em ratas mostrando que fêmeas no proestro (a tarde do proestro é caracterizada por altas concentrações de E2 e P4) demonstram redução da ansiedade/medo quando testadas no labirinto em cruz elevado (Frye et al., 2000; Myers et al., 1989) ou no teste “claro/escuro” (Zuluaga et al., 2005). Zuluaga et al. (2005) observaram que redução da ansiedade semelhante é observada no 17º dia de gestação quando as concentrações dos hormônios gonadais E2 e P4 são altas. Juntos, estes dados sugerem que os hormônios gonadais são importantes para a redução do comportamento de ansiedade/medo em ratas não lactantes.

A redução plasmática de E2 e P4 não provocou mudanças comportamentais importantes em ratas OVX nos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto. A principal alteração foi o aumento da latência para se deslocarem ao centro do campo aberto, o que pode indicar uma elevação dos níveis de ansiedade/medo. Embora restrito a apenas uma mudança comportamental, este resultado está de acordo com a idéia de que a P4 reduz a ansiedade (Mora et al., 1996, Frye et al., 2000). Em relação à modulação do comportamento de ansiedade/medo em ratas lactantes, Pereira et al. (2005) ressaltam a importância da presença dos filhotes e a experiência da maternidade, mostrando que ratas virgens OVX que tiveram comportamento maternal induzido

pelo processo de sensibilização são menos ansiosas no labirinto em cruz elevado quando comparadas com fêmeas virgens OVX não sensibilizadas. No entanto, Ferreira et al. (2002) demonstram que o comportamento maternal induzido sem tratamento hormonal em ratas virgens OVX, não foi suficiente para produzir redução da ansiedade igual à que é demonstrada por lactantes no labirinto em cruz elevado. Eles sugerem a participação de fatores endócrinos, como a P4 e seus metabólitos, na redução da ansiedade/medo demonstrada por ratas lactantes.

Os hormônios gonadais têm marcantes efeitos na secreção de gonadotropinas e PRL. Os esteróides gonadais parecem modular a secreção de PRL por alterarem a atividade de neurônios hipotalâmicos responsáveis pelo controle dos lactotrofos (Smith et al., 1974). De todos os hormônios adenohipofisários, a regulação da secreção da PRL é única e complexa. O hipotálamo exerce uma ação inibitória tônica sobre a secreção deste hormônio pela adenohipófise, através da liberação de dopamina (DA), o mais potente inibidor de PRL fisiológico. A DA é liberada por neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) nos vasos portais hipofisários e age diretamente sobre os lactotrofos da adenohipófise inibindo a síntese e a secreção de PRL. O papel do E2 e P4 sobre a secreção de PRL ainda não está claro, no entanto, muitas observações indicam que a P4 inibe a secreção de PRL (para uma revisão ver Freeman et al., 2000). Nossos resultados estão de acordo com esta idéia, uma vez que observamos aumento significativo da secreção de PRL em fêmeas lactantes OVX. Existem, também, evidências de que a PRL sozinha ou na presença de E2 aumenta a produção de P4 (para uma revisão ver Freeman et al., 2000). Considerando essas possibilidades juntamente com nossos resultados, parece existir um feedback negativo entre as secreções de P4 e PRL, e, por isso, a redução da P4 pela gonadectomia causou o aumento significativo da secreção de PRL.

Por outro lado, durante a lactação o estímulo mais importante para a secreção de PRL é a sucção dos mamilos em função da amamentação, quando os TIDA mostram baixos níveis de atividade (para uma revisão ver Freeman et al., 2000). De fato, resultados prévios (Giovenardi et al., 2000) mostram que fêmeas

no final da lactação (18º DPP), que acolhem e amamentam filhotes mais jovens (8 dias de idade), apresentam aumento da concentração plasmática de PRL comparadas com fêmeas do mesmo período pós-parto (18º DPP), mas que amamentam filhotes com 18 dias de idade, quando as atividades de amamentação são menos intensas do que no início do período de lactação. Estes resultados reforçam a importância da sucção na secreção de PRL durante a lactação. Como os filhotes de fêmeas OVX aparentemente amamentaram com a mesma frequência do que os das mães do grupo controle, a estimulação pelos filhotes provavelmente não foi o principal fator responsável pelo aumento da concentração plasmática de PRL em fêmeas OVX. Assim, podemos inferir que a redução de P4 tenha sido a causa mais provável para o aumento da PRL.

Resultados indicam que durante a lactação os hormônios gonadais modulam a manutenção do comportamento maternal e o desencadeamento da agressão maternal, no entanto, eles não parecem ser essenciais para estas funções. A gonadectomia feita no 1º DPP reduziu a frequência destes comportamentos, mas eles continuaram acontecendo e os filhotes ganharam peso normalmente. A redução significativa dos hormônios gonadais provocou um moderado aumento da ansiedade/medo de fêmeas lactantes e aumentou a secreção de PRL. Resultados indicam que ambos os hormônios gonadais não são essenciais para o aumento das atividades maternas dirigidas aos filhotes, aumento da agressividade contra intrusos que se aproximam da área do ninho e redução da ansiedade/medo observados em ratas lactantes, ou que estes hormônios exercem seus efeitos antes do parto. A primeira hipótese é improvável, considerando que estudos bem documentados mostram que os hormônios gonadais de fato exercem importantes efeitos sobre estes comportamentos. Nós podemos concluir que os hormônios gonadais promovem alterações nos comportamentos maternos atuando durante a gestação e o parto. Além disso, durante a lactação, os hormônios gonadais parecem exercer um efeito inibitório sobre a secreção de PRL.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

a. A gonadectomia realizada em ratas lactantes no 1º dia pós-parto provocou a diminuição do comportamento maternal expresso pela redução da freqüência do comportamento de lambe os filhotes e aumento do número de vezes que os filhotes foram encontrados fora do ninho. Por outro lado, não houve alteração da freqüência dos comportamentos de amamentar, recolher filhotes e construir ninho;

b. A retirada das gônadas provocou redução do comportamento agressivo maternal pela diminuição da freqüência de ataques frontais e tendência à redução da freqüência de mordidas, mas não alterou parâmetros como investigação social, postura agressiva, locomoção e ataques laterais.

c. A retirada das gônadas de ratas lactantes no 1º dia pós-parto não alterou o comportamento de ansiedade/medo no labirinto em cruz, mas provocou aumento deste no teste do campo aberto;

d. A ovariectomia provocou aumento significativo nas concentrações plasmáticas de PRL nas ratas lactantes.

e. Além disso, a retirada dos ovários das ratas lactantes não alterou o ganho de peso dos filhotes até o desmame no 21º dia pós-parto.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação continuarei realizando experimentos relacionados ao assunto que foi aqui discutido, tendo como objeto de estudo o comportamento de fêmeas no período de lactação.

Sendo assim, os próximos passos serão:

a. Verificar se as alterações comportamentais observadas nas mães no período neonatal (redução da frequência do comportamento de lambar, aumento da frequência de filhotes fora do ninho e redução da agressão maternal), em função da OVX, provocam alterações nos filhotes machos quando adultos, quanto à ansiedade/medo, resposta aos estresse, comportamento sexual e à produção e maturação espermática.

b. Analisar se a P4 provoca as alterações comportamentais em ratas lactantes via ação de seu metabólito 3α - 5α -THP, através da administração de um inibidor da enzima 5α -redutase (finasteride) ou de um antagonista dos receptores $GABA_A$ (picrotoxin).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akwa y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT. The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolona in rat. *Behav Brain Res* 1999;106:119-25.

Albert DJ, Dyson EM, Petrovic DM, Walsh ML. Activation of aggression in female rats by normal males and by castrated males with testosterone implants. *Physiol Behav* 1988;44:9-13.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Aggression by a female rat cohabiting with a sterile male declines within 27 h following ovariectomy. *Physiol Behav* 1993a;53:379-82.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in male and female rats: Experiential, hormonal and neural foundations. *Neurosci Biobehav Rev* 1992a;16:177-92.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in the female rat: testosterone plus estradiol implants prevent the decline in aggression following ovariectomy. *Physiol Behav* 1991;49:673-7.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Interaction of estradiol, testosterone, and progesterone in the modulation of hormone-dependent aggression in the female rat. *Physiol Behav* 1992b; 52:773-9.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Influence of combined estradiol and testosterone implants on the aggressiveness of nonaggressive female rats. *Physiol Behav* 1993b;53:709-13.

Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Ovariectomy does not attenuate aggression by primiparous lactating female rats. *Physiol Behav* 1992c;52:1043-46.

Albert DJ, Petrovic DM, Walsh ML. Ovariectomy attenuates aggression by female rats cohabiting with sexually active sterile males. *Physiol Behav* 1989;45:225-8.

Albert DJ, Walsh ML. Aggression in the lactating female rat: the decline is not dependent on the physical development of the pups. *Physiol Behav* 1995;58:477-81.

Ben-Jonathan N. Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* 1985;6:564-89.

Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of γ -amino-butyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav Neurosci* 1991;105:653-62.

Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK. Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABAA receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;45:423-8.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neurosci Biobehav Rev* 1991;14:455-62.

Blanchard DC, Blanchard RJ, Tom P, Rodgers RJ. Diazepam changes risk assessment in a anxiety/defense test battery. *Psychopharmacol* 1990;101:511-8.

Blanchard RJ, Blanchard DC. The organization and modeling of animal aggression. In: Brain PF, Benton D (eds). *The biology of aggression*. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Sijthoff and Noordhoff 1981.

- Brain PF. Differentiating types of attack and defensive in rodents. In: Brain PF, Benton D (eds). *Multidisciplinary Approaches to Aggression Research* Amsterdam, Elsevier 1981;53-78.
- Bridges R. Biochemical basis of paternal behavior in the rat. In: Rosenblatt JS, Snowdon CT (eds). *Parental care: evolution, mechanisms and adaptive significance*, vol 25. New York: Academic Press;1996:215-42.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8003-7.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinol* 1974;94:1704-8.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5335-40.
- Caligaris L, Taleisnik S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, sex and daily rhythm. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983;102:505-10.
- Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12736-41.
- Champagne AF, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 2003;79:359-371.

- Cheney DL, Uzunov D, Costa E, Guidotti A. Gas chromatographic-mass fragmentographic quantitation of 3 α -hydroxi-5 α -pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats. *J Neurosci* 1995;15:4641-50.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M et al. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gammaaminobutyric acid type a receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13284-9.
- Consiglio AR, Borsoi A, Pereira GAM, Lucion AB. Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. *Physiol Behav* 2005;85:354-62.
- Corpechot C, Young J, Calcel M, Wehrey C, Velt JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VVK, Banner C, Sjoval J, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids 3 α -hydroxi-5 α -pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinol* 1993;133:1003-9.
- De Almeida, RM; Giovenardi, M; Silva, SP; Oliveira, VP; Stein, DJ. The effect of 5-HT_{2a/2c} receptor agonist microinjected into central amygdaloid nucleus and median preoptic area on maternal aggressive behavior in rats. *Rev Bras Psiquiatr* 2006;28:130-4.
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD. Intraespecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 1978;23:206-18.
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD. Postpartum aggression in rats: I. Effects of hypophysectomy. *J Comp Physiol Psychol* 1980;94:484-94.
- Escalada J, Caciado L, Ortego J, Melian E, Sánchez-Franco F. Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinol* 1996;137:631-7.

- Escalada J, Sánchez-Franco F, Velasco B e Cacicdo L. Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin and GH-releasing hormone. *Endocrinol* 1997;138:3435-43.
- Ferreira A, Hansen S. Sensory control of maternal aggression in *Rattus Norvegicus*. *J Comp Psychol* 1986;100:173-7.
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, Fernández-Guasti B. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav* 2002;77:197-204.
- Flannelly KJ, Flannelly L. Time course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1987;101:101-3.
- Fleming AS, Luebke C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol Behav* 1981;27:863-8.
- Fleming AS, Vaccarino F, Tombosso L, Chee P. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science* 1979;203:372-4.
- Fleming AS, Vaccarino F, Luebke C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol Behav* 1980;25:731-43.
- Fleming AS, Cheung US, Myhal N, Kessler Z. Effects of maternal hormones on timidity and attraction to pup-related odors in female. *Physiol Behav* 1989;46:449-53.
- Ford JJ, Melampy RM. Gonadotropin levels in lactating rats. Effect of ovariectomy. *Endocrinology* 1973;93:540-7.
- Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. Angiotensinergic neurons physiologically inhibit prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating

hormone, but not adrenocorticotrophic hormone, release in ovariectomized rats. *Peptides* 1997;18:971-6.

Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11391-5.

Freeman ME, Kanycska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 2000;80:1523-1631.

Frye CA, Bayon LE, Pursnani NK, Purdy RH. The neurosteroids, progesterone and 3alpha,5alpha-THP, enhance sexual motivation, receptivity, and proceptivity in female rats. *Brain Res* 1998;808:72-83.

Frye CA, Mermelstein PG, DeBold JF. Evidence for a non-genomic action of progestins on sexual receptivity in hamster ventral tegmental area but not hypothalamus. *Brain Res* 1992;578:87-93.

Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:587-96.

Frye CA, Vongher JM. Progesterone has rapid and membrane effects in the facilitation of female mouse sexual behavior. *Brain Res* 1999;815:259-69.

Frye CA, Vongher JM. Ventral tegmental area infusions of inhibitors of the biosynthesis and metabolism of 3alpha,5alpha-THP attenuate lordosis of hormone-primed and behavioural oestrous rats and hamsters. *J Neuroendocrinol* 2001;13:1076-86.

- Frye CA. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Res Rev* 2001b;37:201-22.
- Frye CA, Walf AA. Hippocampal 3 α ,5 α -THP may alter depressive behavior of pregnant and lactating rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78:531-40.
- Fraile I, Mcewen BS, Pfaff DW. Progesterone inhibition of aggressive behaviors in hamsters. *Physiol Behav* 1987;39:225-9.
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Naftolin F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 1996;17:180-211.
- Gammie SC. Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2005;4:119-35.
- Gandelman R, Simon NG. Postpartum fighting in the rat: nipple development and the presence of young. *Behav Neurosci Biol* 1980;28:350-60.
- Genazzani AR, Petraglia F, Bernardi F, Casarosa E, Salvestroni C, Tonnetti A, Nappi RE, Luisi S, Palumbo M, Purdy RH, Luisi M. Circulating levels of allopregnanolone in humans: gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2099-3013.
- Gibbs DM, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion *In Vivo*. *Endocrinology* 1978;102:1895-1900.
- 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.

- Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HTM, Lucion AB. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Medic Biol Research* 2000;33:1-6.
- Giovenardi M, Frey RM, Scherem MA, Franci CR, Lucion AB. Perfil hormonal de ratas lactantes. Livro de resumos da XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental 2002;pp128.
- Giovenardi M, Padoim MJ, Cadore LP, Lucion AB. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav* 1998;63:351-9.
- Graham JD, Clark CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 1997;18:502-19.
- Grattan DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res* 2001;133:153-71.
- Grota LJ, Ader R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. *Animal Behav* 1969;17:722-9.
- Grota LJ, Ader R. Behavior of lactating rats in a dual chambered maternity cage. *Hormon Behav* 1975;5:275-82.
- Gudelsky GA, Nansel DD, Porter JC. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 1981;108:440-4.
- Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:346-53.
- Hansen S, Ferreira A. Effects of bicuculline infusions in the ventromedial hypothalamus and amygdaloid complex on food intake and affective behavior in mother rat. *Behav Neurosci* 1986;3:410-15.

- Hensteschel K, Fleckenstein A, Toney TW, Lawson DM, Moore KE, Lookingland KJ. Prolactin regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons; immunoneutralization studies. *Brain Res* 2000;852:28-36.
- Holt JA, Richerds JS, Midgley RA, Reichert LE. Effect of prolactin on LH receptor in rat luteal cells. *Endocrinology* 1976;98:1005-13.
- Huntingford FA. Animals fight but do not make war. In: Groebel J, Hinde RA. *Aggression and war – their biological and social bases*. Cambridge, Cambridge University Press 1989.
- Hurst JL. Behavioral variation in wild house mice *Mus domesticus* Ruddy: a quantitative assessment of female social organization. *Anim Behav* 1987;35:1846-57.
- Ichikawa S, Sawada T, Nakamura Y, Morioka H. Ovarian secretion of pregnane compounds during the estrous cycle and pregnancy in rats. *Endocrinol* 1974;94:1615-20.
- Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 1991;49:245-50.
- Kellogg CK, Barrett KA. Reduced progesterone metabolites are not critical for plus-maze performance of lactating female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:441-48.
- Kolonie JM, Stern JM, Barfield RJ. Maternal aggression in rats: effects visual or auditory deprivation of the mother and dyadic pattern of ultrasonic vocalizations. *Behav Neural Biol* 1994;62:41-9.
- Lambert JJ, Balelli D, Peden DR, Wardy AW, Peters JA. Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress Neurobiol* 2003;71:67-80.

- Lonstein JS, Gammie SC. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:869-88.
- Lucion AB, Charchat H, Pereira GA, Rasia-Filho AA. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. *Physiol Behav* 1996;60: 1419-23.
- Lucion AB, De Almeida RM. On the dual nature of maternal aggression in rats. *Aggress Behav* 1996;22:365-73.
- Macleod RM, Lehmeier JE. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology* 1974;94:1077-85.
- Mani SK, Blaustein JD, O'Malley BW. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm Behav* 1997;31:244-55.
- Mann PE, Bridges RS. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Prog. Brain Res* 2001;133:251-62.
- Mann, PE. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. *Physiol Behav* 2006; 88:333-8.
- Matthews-Felton T, Corodimas KP, Rosenblatt JS, Morrell JI. Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav Neurosci* 1995;109:1172-88.
- Mayer AD, Reibisk S, Siegel HI, Rosenblatt JS. Maternal aggression in rats: Changes over pregnancy and lactation in a Sprague-Dawley strain. *Aggress Behav* 1987;13:29-43.
- Mayer AD, Rosenblatt JS. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm. Behav* 1987;21:253-67.

- Mayer AD, Monroy MA, Rosenblatt JS. Prolonged estrogen-progesterone treatment of nonpregnant ovariectomized rats: factors stimulating home-cage and maternal aggression and short-latency maternal behavior. *Hormon Behav* 1990;24:342-64.
- Mayer AD, Rosenblatt JS. Persistent effects on maternal aggression of pregnancy but not of estrogen/progesterone treatment of nonpregnant ovariectomized rats revealed when initiation of maternal behavior is delayed. *Horm Behav* 1993;27:132-55.
- McCarthy MM, Felzenberg E, Robbins A, Pfaff DW, Schwartzgiblin S. Infusions of diazepam and allopreganolone into the midbrain central gray facilitate open-field behavior and sexual receptivity in female rats. *Horm Behav* 1995;29:279-95.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van tol HHM, Watson SJ, Civelli O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7625-8.
- Moguilevsky JA, Carbone S, Szwarcfarb B. Changes in the effect of γ -aminobutyric acid on prolactin secretion during sexual maturation in female rats. *Endocrinology* 1992;131:458-62.
- Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK, Voogt JL. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopaminergic neurons. *Brain Res Bull* 1997;42:435-41.
- Mohankumar PS, Mohankumar SM, Arbogast L, Quadri SK, Voogt JL. Effects of chronic hyperprolactinemia on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Proc Soc Experim Biol Medic* 1998;217:461-5.
- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocr* 1996;21:609-20.

- Morgan HD, Fleming AS, Stern JM. Somatosensory control of the onset and retention of maternal responsiveness in primiparous Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav* 1992;51:549-55.
- Myers MM, Brunelli SA, Squire JM, Shindeldecker RD, Hofer MA. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Dev Psychobiol* 1989;22:29-53.
- Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1977;91:146-64.
- Numan M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr Suppl* 1994;397:19-28.
- Numan M, Insel TR. *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer 2003.
- Numan M. Maternal Behavior. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press 1994:221-302.
- Numan M, Roach JK, Del Cerro MCR, Guillamón A, Segovia S, Sheeham TP, Numan MJ. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Res* 1999;830:358-71.
- Oliveira MC, Moraes JY, Barros HMT, Barbosa-coutinho LM. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:521-5.
- Ostermeyer MC. Maternal aggression. In: Elwood RW. (eds) *Parental behavior of rodents*. Chichester, UK: Willey 1983;151-79.
- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992;6:2311-22.

- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-67.
- Pereira M, Uriarte N, Agrati D, Zuluaga MJ, Ferreira A. Motivational aspects of maternal anxiety in lactating rats. *Psychopharmac* 2005;180: 241-8.
- Petralia SM, Jahagirdar V, Frye CA. Inhibiting biosynthesis and/or metabolism of progestins in the ventral tegmental area attenuates lordosis of rats in behavioural oestrus. *J Neuroendocrinol* 2005;17:545-52.
- Pfaff D, Keiner M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol* 1973;151:121-58.
- Rainbow TC, Parsons B, McEwen BS. Sex differences in rat brain oestrogen and progestin receptors. *Nature* 1982;300:648 -9.
- Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* 1978;200:1173-5.
- Rhodes ME, Frye CA. Inhibiting progesterone metabolism in the hippocampus of rats in behavioral estrus decreases anxiolytic behaviors and enhances exploratory and antinociceptive behaviors. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2001;1:287-96.
- Rodriguez-Sierra JF, Howard JL, Pollard GT, Hendricks SE. Effect of ovarian hormones on conflict behavior. *Psychoneuroendocr* 1984;9:293-300.
- Rosenblatt JS. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 1967;156:1512-14.

- Roseblatt JS, Hazelwood S, Poole J. Maternal behavior in male rats: Effects of medial preoptic area lesion and presence of maternal aggression. *Hormon Behav* 1996;30:201-15.
- Rupprecht R, di Michele F, Hermann B, Strohle A, Lancel M, Romeo E, Holsboer, F. Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev* 2001;37:59-67.
- Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocr* 2003; 28:139-68.
- Russel JA, Douglas AJ, Windle RJ, Ingram CD. (eds) *The maternal behavior: neurobiological and neuroendocrine adaptation and disorders in pregnancy and post partum*. Amsterdam: Elsevier Science BV 2001.
- Severino GS, Fossati IAM, Padoim MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav* 2004;81:489-98.
- Shaar CJ, Clements JA. The role of catecholamines in the release of anterior pituitary *In Vitro*. *Endocrinology* 1974;95:1202-12.
- Sheehan T, Numan M. Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats. *Neuroendocrinol* 2002; 75:12-23.
- Smith HE, Smith RG, Toft DO, Neergaard JR, Burrows EP, O'Malley BW. Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. *J Biol Chem* 1974;249:5924-32.
- Smith MS, Neill JD. Inhibition of gonadotropin secretion during in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod* 1977;17:255-61.

- Smith MS. A comparison of pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone during lactation and the estrous cycle of the rat. *Endocrinol* 1978;102:114-120.
- Sodersten P, Eeneroth P. Suckling and serum prolactin and LH concentrations in lactating rats. *Journal of Endocrinol* 1984,102:251-6.
- Stern JM, Jonhson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in norway rats. I Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav* 1990;47:993-1011.
- Stern JM. Maternal behavior: sensory, hormonal and neural determinants. In: Brush F, Levine S (eds). *Psychoneuroendocrinology*. New York: Academic Press; 1989:105-226.
- Stern JM. Multisensory regulation of maternal behavior and masculine sexual behavior: a revised view. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:183-200.
- Stern JM. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. *Dev Psychobiol* 1997;31:19-37.
- Stern JM. Somatosensation and maternal care in Norway rats. In Roseblatt JS, Snowden CT (eds) *Parental care: evolution, mechanisms and adaptive significance (Advances in the study of parental behavior, vol. 25)*. Academic, New York 1996;25:243-94.
- Shull JD, Gorski J. Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17 beta-estradiol dose. *Endocrinol* 1989;124:279-85.
- Svare B, Gandelman R. Suckling stimulation induces aggression in virgin female mice. *Nature*; 1976a;260:606-8.

- Taya K, Sesamoto S. Changes in FSH, LH and Prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. *Endocrinol Jpn* 1981;28:187-96.
- Taya K, Greenwald GS. Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Jpn* 1982;29:453-9.
- Tucker HA. Lactation and its hormonal control. In: Knobil E, Neill JD (eds.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press 1991;pp1065-89.
- van de Poll N, van Zanten S, de Jorge FH. Effects of testosterone, estrogen, and dihydrotestosterone upon aggressive and sexual behavior of female rats. *Hormon Behav* 1986;20:418-31.
- Wang MW, Crombie DI, Hayes JS, Heap RB. Aberrant maternal behaviour in mice treated with a progesterone receptor antagonist during pregnancy. *J Endocrinol* 1995;145:371-7.
- Zuluaga MJ, Agrati D, Pereira M, Uriarte N, Fernandez-Guasti A, Ferreira A. Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiol Behav* 2005;84:279-86.
- Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinol* 1999;140:3843-52.